

УДК 616-018.3-003.93-053.9-092.9(048.8)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872021392-100>

Вікові аспекти регенерації кістки (огляд літератури)

М. О. Корж, П. М. Воронцов, Н. О. Ашукіна, В. Є. Мальцева

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

The number of elderly people is constantly increasing all over the world. They are most often the patients who need orthopedic surgeries like arthroplasty, osteosynthesis and others. It is known that the process of bone regeneration depends on the patient's age. However, certain characteristics of bone regeneration process depend on the age remain unclear, which is important for developing the best strategies for treatment of elderly patients. Objective. To identify age-related features of bone regeneration and to establish possible ways of influencing them in order to optimize the bone regeneration in elderly patients. Methods. Literature search was performed in the PubMed database. Inclusion criteria were original experimental and clinical studies in English. The search depth is accepted for 20 years. Results. It has been experimentally and clinically shown that bone tissue regeneration slows down with age, which is more pronounced in women. According to scientific information, this involves two signaling pathways — Notch and Wnt/ β -Catenin, the activity of which is suppressed with age. However, the regulation of regeneration is a cascade of signaling pathways and macromolecules. The expression of growth factors after fracture changes at older age compared to a younger one. In particular, a decrease in the expression of TGF β -1 was clinically revealed. In addition, in older patients after fracture, an increase in macrophage colony-stimulating factor and VEGF was recorded. It has been experimentally established that a combination of a slowdown in bone tissue regeneration with a decrease in the content of Indian Hedgehog, Sonic Hedgehog, BMP-2, 4, -7 proteins and MMP-9 in bone callus has been established. Among the ways to overcome the delayed bone regeneration in elderly patients can be the use of modern technologies of cell and gene therapy, inhibitors of macrophages, biologically active factors at certain stages of bone regeneration. For cell therapy, it is important to take into account the age of the cell donor because of the high probability of functional disorders in cells from older donors. Key words. Bone healing, aging, bone fracture, growth factor, mesenchymal stem cell.

Кількість людей похилого віку постійно збільшується у всьому світі. Саме вони найчастіше є пацієнтами, яким виконують ортопедичні операції — ендопротезування, остеосинтез тощо. Відомо, що процес регенерації кістки залежить від віку людини та, імовірно, уповільнюється з його збільшенням. Проте залишаються нез'ясованими певні особливості процесу відновлення кістки залежно від віку, що важливо для розроблення кращих стратегій лікування пацієнтів похилого віку. Мета. Виявити вікові особливості репаративного остеогенезу та встановити можливі шляхи впливу на них для оптимізації регенерації кістки в пацієнтів похилого віку. Методи. Пошук літератури виконано у базі даних PubMed. Критеріями включення були оригінальні експериментальні та клінічні дослідження англійською мовою. Глибина пошуку прийнята 20 років. Результати. Експериментально та клінічно показано, що регенерація кісткової тканини уповільнюється з віком і має більший прояв у жінок. За науковою інформацією, у цьому задіяні два сигнальних шляхи — Notch і Wnt/ β -катенін, активність яких пригнічується з віком. Проте регуляція регенерації — це каскад сигнальних шляхів і макромолекул. Експресія факторів росту після перелому змінюється у старшому віці порівняно з молодшим. Зокрема, клінічно виявлено зниження експресії TGF β -1. Крім того, у пацієнтів старшого віку після перелому зафіксовано підвищення макрофагального колонієстимулювального фактора і VEGF. Експериментально встановлено поєднання уповільнення регенерації кісткової тканини зі зниженням вмісту в кістковому мозолі білків Indian Hedgehog, Sonic Hedgehog, BMP-2, -4, -7 та желатинази MMP-9. Серед шляхів подолання сповільненої регенерації кістки в пацієнтів похилого віку може бути використання сучасних технологій клітинної та генної терапії, інгібіторів макрофагів, біологічно активних чинників на певних стадіях репаративного остеогенезу. Для клітинної терапії важливим є врахування віку донора клітин через високу ймовірність функціональних порушень у клітинах від донорів старшого віку.

Ключові слова. Загоєння кістки, вік, переломи кісток, фактори росту, мезенхімальні стовбурові клітини

Вступ

Кожного року у світовій популяції збільшується відсоток людей похилого та старечого віку, особливо в розвинених країнах. За інформацією ВОЗ, кількість людей старших за 65 років у 2019 р. становила 703 млн, серед них жінок на 23 % більше, ніж чоловіків [1]. У 2050 р. загальна кількість осіб віком старше за 65 років імовірно складатиме 1,5 млрд [1]. Саме в людей старших вікових груп виконують значну кількість ортопедичних операцій — ендопротезування, остеосинтез переломів кісток тощо. Сьогодні вже відомо, що процес регенерації кістки залежить від віку людини та, імовірно, уповільнюється з його збільшенням [2, 3]. Проте залишаються нез'ясованими певні особливості процесу відновлення кістки залежно від віку, що важливо для розроблення кращих стратегій лікування пацієнтів похилого віку.

Регенерація кістки — складний процес, успіх якого обумовлений злагодженою дією багатьох біологічних і фізичних чинників. До біологічних належать: фактори росту, мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), малодиференційовані клітини ендосту та періосту, власне клітини кісткової тканини. Порушення/відсутність будь-якого з них на будь-якій стадії регенераторного процесу може призвести до таких негативних наслідків, як незрощення, утворення несправжніх суглобів, повторний перелом, розхитування компонентів ендопротезів.

Фактори росту — це сигнальні молекули, які впливають на проліферацію, диференціацію й апоптоз кісткоутворювальних клітин: кісткові морфогенетичні протеїни (Bone Morphogenetic Proteins — BMPs), фактор росту тромбоцитів (PDGF), фактор росту фібробластів (FGF), трансформувальні фактори росту (TGF), фактор росту ендотелію судин (VEGF). Роль останнього також пов'язана зі стимуляцією утворення кровеносних судин, які є невід'ємною ланкою репаративного остеогенезу [4]. Біосинтез клітинами факторів росту може варіювати з віком, що негативно впливатиме на репаративний остеогенез.

Малодиференційовані клітини, зокрема МСК кісткового мозку, які мігрують у зону ушкодження кістки, здатні до проліферації та диференціації в остеогенному напрямку [5]. Їхня недостатня кількість чи змінені структурно-функціональні особливості, обумовлені віком, також можуть негативно позначитися на відновленні кістки.

Мета роботи: виявити вікові особливості репаративного остеогенезу та встановити можливі

шляхи впливу на них для можливої оптимізації регенерації кістки в пацієнтів похилого віку.

Матеріал і методи

Пошук літератури виконано у базі даних PubMed з використанням ключових слів Mesh за таким пошуковими запитами: («Bone Regeneration / analysis» OR «Bone Regeneration / etiology» OR «Bone Regeneration/immunology» OR «Bone Regeneration / physiology» OR «Fracture Healing / etiology» OR «Fracture Healing / immunology» OR «Fracture Healing / physiology») AND («Age Factors» OR «Aging») та («Osteoblasts» OR «Osteoclasts») AND («Age Factors» OR «Aging»). Критеріями включення були оригінальні експериментальні та клінічні дослідження англійською мовою. Глибина пошуку прийнята 20 років.

Результати та їх обговорення

Загалом для аналізу відібрано 63 роботи. У частині з них констатовано взаємозв'язок між віком суб'єкта (тварини чи людини) та результатом регенерації кістки на певний термін спостереження. Їх ми об'єднали в наступному підрозділі.

Уповільнення регенерації кістки з віком

Установлено, що в самиць Sprague-Dawley щурів 26-тижневого віку повне зрощення діафізарного закритого перелому з інтрамедулярним фіксатором відбулося вдвічі пізніше (8–10 проти 4 тижнів) за показниками рентгенографії порівняно зі щурами 6-тижневого віку [6]. Регенерація двобічного перелому виростка нижньої щелепи в самців 36-тижневих щурів Sprague-Dawley також була уповільнена порівняно з 3-тижневими [7]. Так само в самців щурів Wistar віком 2 та 18 міс. із двобічним дефектом у нижній щелепі через 3 та 6 тижнів встановлено меншу кількість нової кістки у дефекті старших щурів [8]. У мишей лінії C57BL/6 віком 25 міс. визначено менший розмір кісткового мозоля порівняно з 5-місячними через 20 діб після перелому великогомілкової кістки [9].

Особливістю регенерації кісток із віком виявилася пригнічення кісткоутворення в кістковомозковому каналі великогомілкової або стегнової кісток після видалення кісткового мозку в гетерозиготних 7,5-місячних мишей, 7,5-місячних мутантних мишей *Runx2* (синтез *Runx2* скорочений удвічі), чого не спостерігали в мишей віком 2,5 міс. [10]. Загоєння критичного дефекту черепа діаметром 3; 4; 5 мм у самців мишей CD-1 віком 6 або 60 днів через 8 тижнів також відрізнялося: у молодших мишей радіографічно дефекти всіх

розмірів були більш заповненими ($\approx 36\%$) порівняно зі старшими ($\approx 5\%$) [11]. Одним із пояснень цього може бути виявлена M. Kwan і співавт. [12] у тім'яній кістці мишей віком 60 днів підвищена експресія склеростину, біологічна роль якого визначається як негативний регулятор остеобластогенезу, що пригнічує здатність МСК до остеогенного диференціювання, у порівнянні з мишами віком 6 днів. У супереч цьому D. Joiner і співавт. [13] не встановили різниці за обсягом регенерату залежно від віку самців щурів лінії Sprague-Dawley віком 6 та 12 міс. через 12 тижнів після виконання кіркового дефекту в стегновій кістці. Проте в регенераті старших щурів щільність остеоцитів була нижчою, а мінералізація — вищою порівняно з молодшими.

Показано, що в жінок уповільнення регенерації кістки спостерігається частіше, ніж у чоловіків, тобто стать можна розглядати як один із чинників ризику. Зокрема, у самиць мишей лінії SAMP6 віком 10 міс. із прискореним старінням та остеопорозом перебудова кісткового мозоля на 5-й тиждень після перелому стегнової кістки була повільнішою порівняно з мишами з лінії, стійкої до старіння SAMR1 [14]. Водночас для самців мишей SAMP6 того самого віку не встановлено такої різниці. Цікаво, що в експерименті M. Egermann і співавт. [15] не виявили різниці у відновленні кістки після гістологічного дослідження та за показниками мікро-КТ у самиць мишей SAMP6, але віком 5 міс., порівняно з контрольними мишами SAMR1 через 4 та 6 тижнів після остеотомії з фіксацією пластиною. У 12-місячних самиць Sprague-Dawley щурів зафіксовано затримку регенерації на 6-й тиждень після остеотомії стегнової кістки з фіксацією порівняно з самцями [16]. На противагу зазначеному D. M. Pien і співавт. [17] в експерименті на щурах лінії Wistar віком 1 і 3 міс. визначили більший об'єм кісткової тканини та відсоток остеоінтеграції навколо титанового імплантата у великогомілкової кістці у старших щурів-самців через місяць після імплантації, а у самиць різного віку різниця була відсутня.

Установлено, що на регенерацію кісткової тканини впливає зниження рівня естрогенів із віком. У щурів після оваріоектомії спостерігали затримку формування кісткової тканини в альвеолярній лунці після видалення зуба порівняно з інтактними тваринами [18].

У клінічних умовах відмічено, що частота вторинного зміщення після перелому дистального відділу променевої кістки була вищою приблизно

в 1,5 рази в пацієнтів старших за 65 років порівняно з особами віком 18–44 роки в діапазоні до 8 тижнів після накладання гіпсової пов'язки [3]. У випадку переломів таранної кістки у дітей частота переломів зі зміщенням і частота ускладнень також збільшується з віком [19]. Кількість незрощень після перелому діафіза плечової кістки також зростала в пацієнтів старших за 55 років порівняно з молодшими [2].

Біологічно активні чинники

Уповільнення загоєння перелому з віком пов'язують зі зниженням експресії мРНК генів, асоційованих із окисною функцією мітохондрій та функціонуванням нервових клітин [20, 21]. У самиць 6-тижневих щурів рівень експресії генів мРНК, які відповідають за перенесення електронів і цикл трикарбонових кислот, був у 2 рази вищим порівняно з 52-тижневими щурами на 6 тиждень після закритого перелому стегнової кістки [20]. Також в експерименті на мишах після перелому стегнової кістки встановлено залежну від віку різну експресію генів мРНК, які відповідають за функціонування нервових клітин [21].

Результати декількох досліджень указують на вплив віку на експресію факторів росту та прозапальних цитокінів після перелому. С. G. Eriksen і співавт. [22] встановили, що в культивованих остеобластах, отриманих від осіб віком 73–85 років, експресія мРНК OPG і TGF- β 1 була нижчою, а мРНК інтерлейкіну-6 (IL-6) — вищою порівняно з особами 21–27 років. У клінічному дослідженні рівень TGF- β 1 у сироватці крові пацієнтів старше 50 років після перелому довгих кісток був нижчим порівняно з молодшими особами на 24 тиждень після хірургічного втручання, а у жінок — нижчим за чоловіків [23]. Показано, що протягом 6 міс. після перелому довгих кісток середній вміст у сироватці крові макрофагального колонієстимулювального фактора та VEGF вищий в осіб старшого віку та жінок [24]. R. A. Meyer і співавт. [25] в експериментальному дослідженні виявили, що повільніша регенерація діафізарного дефекту стегнової кістки самиць щурів Sprague-Dawley віком 12 міс. супроводжувалася нижчим рівнем експресії мРНК білків Indian Hedgehog та BMP-2 порівняно з молодшими щурами віком 6 тижнів. В. Yue і співавт. [26] також підтвердили зниження вмісту BMP-2 у кірковому шарі стегнової кістки самців щурів Wistar із віком (вік 1; 9; 24 міс.). Зниження експресії BMP-2, -4, -7, FGF-2 та його рецептора FGFR-1 встановлено в кістковому мозолі мишей віком 60 днів через 2 тижні після відтворення критичного дефекту

черепу порівняно з молодшими тваринами віком 6 днів [27]. Hedgehog є сигнальним шляхом, задіяним у ранній мінералізації кісткового мозоля в молодих C57BL/6 мишей після перелому великогомілкової кістки [28]. Білок Sonic hedgehog порізно функціонує в 5- та 60-тижневих мишей після перелому ребра [29]. У старших мишей спостерігали пригнічення експресії білка Sonic hedgehog порівняно з молодшими. Крім того, у старих мишей цей шлях стимулював утворення остеокластів, а в молодих — остеобластів [29].

Ще однією з ланок механізму уповільнення регенерації кісток з віком є пригнічення передаваних сигналів Notch мезенхімальними клітинами. У культурі мезенхімальних клітин, отриманих у мишей C57BL/6 віком 5- та 25 міс., P. L. Mutyaba і співавт. [30] виявили пригнічення базальної сигнальної активності Notch у старших мишей. Експресія різних білків, які регулюють васкуляризацію у ділянці перелому, також змінюється з віком. Зокрема, у кістковому мозолі мишей віком 1; 6; 18 міс. на 3-тю добу після перелому великогомілкової кістки встановлено експресію фактора, індукованого гіпоксією-1 альфа (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF1 α), та транскриптів VEGF лише у 1-місячних мишей [31].

Експресія матриксних металопротеїназ (ММР): желатинази (ММР-9) та колагенази (ММР-13) через тиждень після перелому була вищою в молодших мишей, а через 3 тижні, навпаки, у 18-місячних тварин порівняно з іншими віковими групами. Достатній рівень матриксних металопротеїназ важливий на стадії ремоделювання хрящового регенерату в кістковий. Щільність судин у ділянці перелому через тиждень виявилася більшою саме у місячних щурів [31]. У іншій роботі в щурів лінії Sprague-Dawley віком 12 тижнів через тиждень після остеотомії стегнової кістки з фіксацією відмічено вищу експресію ММР-9 у кістковому мозолі порівняно з мишами віком 52 тижні, а експресія ММР-13 не відрізнялася між віковими групами [32]. Це відображує зміну біосинтезу ММР із віком.

Визначено, що в регенерації кісткової тканини задіяний один із підтипів рецепторів простагландину E₂, а саме EP₄, який відіграє важливу роль у формуванні кісткової тканини та підтримці кісткового гомеостазу протягом життя. Автори показали, що в старих мишей віком 15–16 міс. із відсутнім рецептором EP₄ через 2 тижні після перелому стегнової кістки зафіксовано менший об'єм кісткового мозоля, а через 4 тижні — неповне зрощення перелому порівняно з мишами ди-

кого типу. Визначено, що порушення формування кісткової тканини було наслідком пригнічення остеобластогенезу та, відповідно, зниження мінералізації [33].

У старих мишей віком 46–52 тижнів виявлено участь екто-5'-нуклеотидази (CD73), яка активує остеобласти та є регулятором росту скелета, у регенерації дефекту в кірковому шарі великогомілкової кістки. Установлено пригнічення формування кісткового матриксу в нокаутних CD73-мишей [34].

Wnt/ β -катенін (β -catenin) сигнальний шлях також задіяний у регенерації перелому. В експерименті на мишах із геном Catnb^{lox(ex3)} віком 6 і 12 міс. після активації тамоксифеном сигнального шляху Wnt/ β -катенін регенерація дірчастого дефекту в метафізі стегнової кістки була швидшою, із кращою васкуляризацією й остеогенною диференціацією порівняно з мишами дикого типу обох вікових груп [35]. Також завдяки активації сигнального шляху Wnt/ β -катенін було підвищено рівень MMP-9 і VEGF у регенераті, які, згідно з іншими експериментальними дослідженнями, знижуються під час регенерації кістки з віком [24, 32, 33].

Клітини кісткової тканини

Важливим для регенерації кісткової тканини є функціональний стан її клітин (остеобластів, остеоцитів і остеокластів), який також змінюється з віком. Остеобласти утворюються з МСК періосту, ендосту, кісткового мозку, проте з віком диференціація останніх відбувається частіше в адипоцити, ніж в остеобласти [36, 37]. Інші клітини також впливають на диференціацію остеобластів. В експериментальних дослідженнях отримано нові дані, що мегакаріоцити також стимулюють диференціацію остеобластів, але з віком ця здатність знижується [38].

Установлено зменшення кількості остеоцитів у процесі старіння в мишей C57BL/6 віком 22 міс. порівняно з 5-місячними. Це спричинює порушення зв'язків у лакунарно-каналцевої системі та погіршення реакції остеоцитів на зовнішні стимули [39]. До того ж доведено зниження механочутливості остеоцитів із віком у 22-місячних мишей порівняно з 5-місячними [40]. Однією з причин цього явища, імовірно, є повільне відновлення порушень плазматичної мембрани, які виникають для запуску передавання механічного стимулу [41]. В остеоцитах у кірковому шарі кісток мишей віком 24 міс. в умовах старіння підвищується експресія ліганду рецептора активатора ядерного фактора карра-В (RANKL),

який активує диференціацію остеокластів із моноцитів/макрофагів і призводить до втрати маси кісткової тканини в кірковому шарі; у губчастій кістці збільшення остеокластів не спостерігали, але втрата маси кісткової тканини також відбувалася [42]. Імовірною причиною цього є старіння остеокластів і пригнічення їхньої функції [43]. В експериментальному дослідженні на мишах підтверджено роль старіючих остеоцитів у підвищенні пористості кіркового шару. Зокрема, у мишей після видалення проапоптотичних білків *Bax* і *Bak* підвищується тривалість життя остеобластів і остеоцитів, що призвело на 22-й міс. життя до підвищення маси губчастої кісткової тканини в стегновій кістці. Але в кортексі зафіксовано протилежні результати — зменшилась маса внаслідок формування великих порожнин. Автори дослідження цей факт пов'язують зі старінням остеоцитів, що супроводжувалося активацією резорбтивної функції остеокластів шляхом підвищеної експресії остеоцитами *RANKL* і *VEGF*. Підвищення пористості кіркового шару кістки може бути причиною невертебральних переломів у пацієнтів [44].

Білковий склад кісткового матриксу кіркового шару кістки, який змінюється з віком, чинить вплив на активність остеокластів. Під час культивування моноцитів людини на кірковій кістці корів віком 8 міс. і 9 років вищу активність остеокластів зафіксували на зразку від старшої тварини віком 9 років, а вміст α/β -СТХ у матриксі був вищим у 3 рази порівняно з молодшим (8 міс.) зразком [45]. *In vitro* виявлено, що з віком зростає здатність остеокластів, отриманих у здорових жінок старечого віку, до злиття, що збільшує їхню резорбційну активність і призводить до втрати кісткової маси [46].

Ще одним механізмом, який негативно впливає на кістку, є порушення функціонування мітохондрій. У мишей активність остеокластів посилювалася з віком унаслідок дисфункції мітохондрій, спричиненої мутаціями соматичної мітохондріальної ДНК, що пригнічувало мінералізацію кісткового матриксу остеобластами. Вікова втрата кісткової маси виявилася значуще більшою у мишей з активними мутаторами мітохондріальної ДНК порівняно з диким типом [47]. Також остеокласти старих мишей віком 18–24 міс. *in vitro* синтезують склеростин, який пригнічує мінералізацію кісткового матриксу на відміну від остеокластів молодих мишей віком 6 тижнів або 12 міс. [48].

Оптимізація регенерації кістки

Існують припущення, що позитивний генотип *IL-1* може сприяти регенерації перелому. О. I. Weiss

і співавт. [49] не встановили кращих результатів глибини зондування та якості клінічного прикріплення після пародонтального лікування кістковозаміщувальними трансплантатами в 13 осіб з позитивним генотипом *IL-1* порівняно з 31 особою з негативним генотипом *IL-1*.

Мезенхімальні стовбурові клітини та біологічно активні чинники

Використання клітинної терапії є одним із перспективних напрямів оптимізації репаративного остеогенезу. Вік донора клітин для культивування може впливати на їхній регенераторний потенціал. Визначено, що в культивованих клітинах від старших кролів [50] і мишей [51] знижений темп проліферації, остеогенний [51] і хондрогенний потенціал [50] порівняно з тваринами-донорами молодшого віку. У оваріектомізованих мишей, яким вводили в стегнову кістку культивовані клітини жирової тканини, попередньо індуковані до диференціації в остеобласти, від 1- або 10-місячних мишей-донорів, спостерігали через 4 міс. значніше підвищення мінеральної щільності кісткової тканини у випадку, коли донор клітин був молодшим [51]. Усупереч цьому, Т. Morihara і співавт. [50] не виявили різниці між загоєнням остеохондрального дефекту на 12-й тиждень у виростку стегнової кістки самців кролів віком 8–10 міс. або 4–5 років за умов трансплантації їм хондрогенних клітин від донорів різного віку (8–10 міс. або 4–5 років). У клінічному дослідженні не встановили залежності від віку остеогенної диференціації МСК, отриманих із кісткового мозку 20 пацієнтів, яким виконали тотальне ендопротезування стегнової кістки [52]. Можливо це пов'язано з невеликою кількістю учасників, вік 15 з них перевищував 50 років. Проте експериментально встановлено, що МСК кісткового мозку щурів 6-тижневого та 9-місячного віку однаково реагують на *platelet-released supernatant* (PRS), підвищуючи мітогенну активність і хемотаксичну рухомість [53]. Це підтверджує можливість успішного використання факторів росту для стимуляції проліферації та міграції МСК у людей старшого віку після перелому. Також у щурів старших за 2 роки та за умов остеопорузу використання *recombinant human platelet-derived growth factor-BB* із трикальційфосфатним/коллагеновим ін'єкційним матриксом сприяло збільшенню міцності кісткового мозоля на скручування на 5-й тиждень після перелому великогомілкової кістки порівняно з щурами без лікування [54]. Використання титанових імплантатів, оброблених рекомбінантним *TGFβ-2* людини

сприяло утворенню кісткового мозоля в плечовій кістці собак Beagle віком 1–2 та 10–12 років. [55]. Проте в старших собак Beagle зафіксовано утворення тонших кісткових трабекул із ширшим остеїдом на 4-й тиждень після імплантації порівняно з молодшими [55].

Генна терапія є ще одним із підходів до лікування дисрегенеративної кістки. Використання МСК із трансдукованим геном білка BMP-2, вміст якого знижується з віком, разом із трикальційфосфатною керамікою [25, 26] сприяло прискоренню регенерації сегментарного дефекту стегнової кістки в самців щурів лінії Wistar віком 24 міс. порівняно з групою без використання клітин із трансдукованим BMP-2 [26].

Макрофаги відіграють важливу роль у регенерації перелому в похилому віці. J. A. S. Shantz і співавт. [56] виявили, що у самців старих мишей C57BL/6L (вік 78 тижнів) збільшується об'єм кісткового мозоля та підвищується утворення кісткової тканини після закритого нестабільного перелому великогомілкової кістки за умов уживання препарату пексидартиніб (Pexidartinib, PLX3397), який блокує активацію макрофагів, порівняно з мишами без PLX3397. Водночас у молодих мишей (вік 12 тижнів) із лікуванням PLX3397 збільшення кісткового мозоля не зафіксовано порівняно з контрольними мишами [56]. Імовірно, блокування певного типу макрофагів, а саме типу M1, який є прозапальним та може негативно впливати на регенерацію кістки, є вирішальним в оптимізації регенерації кістки з віком. У недавньому дослідженні у старих мишей віком 24 міс. у місці перелому встановлено підвищену експресію генів макрофагів M1, збільшення площі хрящової тканини та зменшення площі кісткової порівняно з 3-місячними мишами через 10 днів після закритого перелому великогомілкової кістки [57]. Введення інгібітора PLX3397 старим мишам приводило до підвищення площі кісткової тканини через 10 і 21 день після перелому порівняно з нелікованими тваринами. У молодих мишей використання PLX3397 не зафіксовано вираженого ефекту [57]. Ще одне підтвердження різного впливу макрофагів на регенерацію кістки з віком отримано у химерних мишей віком 12 міс., яким трансплантували кістковий мозок від 4-тижневих тварин і спостерігали більший розмір кісткового мозоля та швидше утворення кісткової тканини порівняно зі старими мишами, де донор кісткового мозку був їхнього віку [58]. В аналогічному експерименті з молодшими мишами такої залежності не зафіксовано. У цьому експерименті

остеобласти і хондроцити були клітинами реципієнта, а прозапальні клітини — донора [58]. Інше дослідження також підтверджує важливу роль прозапальних клітин у регенерації кістки з віком. У старих 12-місячних мишей, яким трансплантували в критичний дефект черепа МСК від молодих або старих донорів, отримані з м'язів людини та трансдуковані Lenti-BMP2 / зеленим флуоресцентним білком, кількість кісткової тканини була меншою, ніж у молодших 9-місячних тварин, що супроводжувалося високим рівнем RANKL у крові, який активує диференціацію остеокластів із макрофагів [59].

Тип M2 макрофагів є протизапальним і стимулює ангиогенез через синтез IL-10, рецептор IL-1 типу α і TGF- β . Із віком кількість таких макрофагів зменшується, що, за результатами дослідження на самицях щурів Sprague Dawley віком 3 та 12 міс., призводить до уповільнення регенерації після остеотомії стегнової кістки в старших щурів [60]. Натомість трансплантація попередників макрофагів CD14 покращує регенерацію кістки у 12-місячних щурів [60].

Аполіпропротеїн Е (ApoE) може бути однією з терапевтичних мішеней для лікування дисрегенеративної кістки з віком. Рівень його зростає в крові з віком, що пригнічує формування кістки через вплив на остеобласти [61]. У 24-місячних мишей ApoE -/- зафіксовано краще формування кісткової тканини та мінералізація кісткового мозоля після перелому великогомілкової кістки порівняно з мишами дикого типу [61].

Використання ало- і ксеноімплантатів є одним із методів для лікування дизрегенеративної кістки. Проте на ефективність застосування цього методу впливають вік донора та реципієнта. Люфілізовані демінералізовані ксеноімплантати, отримані від людей-донорів старшого віку й імплантовані мишам у м'яз, показали нижчу здатність до стимулювання утворення нової кістки порівняно з ксеноімплантатами від молодших донорів, що пов'язують із нижчим вмістом морфогенетичних білків із віком [62]. Використання ксеногенного демінералізованого матриксу в експерименті на самцях щурів Wistar віком 3 та 18 міс. сприяло регенерації дефекту виростка стегнової кістки на 45-ту добу в обох вікових групах порівняно з незаповненим дефектом, проте площа кісткового регенерату була вищою в молодших щурів порівняно зі старшими [63].

Висновки

Таким чином, експериментально та клінічно показано, що регенерація кісткової тканини вповільнюється з віком, що має більший прояв у жінок. За науковою інформацією, у цьому задіяно два сигнальних шляхи — Notch і Wnt/ β -катенін, активність яких пригнічується з віком. Проте регуляція регенерації — це каскад сигнальних шляхів і макромолекул. Експресія факторів росту після перелому змінюється у старшому віці порівняно з молодшим. Зокрема, клінічно виявлено зниження експресії TGF β -1. Крім того, у пацієнтів старшого віку після перелому зафіксовано підвищення макрофагального колоніестимулювального фактора і VEGF. Експериментально встановлено поєднання уповільнення регенерації кісткової тканини зі зниженням вмісту в кістковому мозолі білків Indian Hedgehog, Sonic Hedgehog, BMP-2, -4, -7 та желатинази MMP-9. Серед шляхів подолання сповільненої регенерації кістки в пацієнтів похилого віку може бути використання сучасних технологій клітинної та генної терапії, інгібіторів макрофагів, біологічно активних чинників на певних стадіях репаративного остеогенезу. Для клітинної терапії важливим є врахування віку донора клітин через високу ймовірність функціональних порушень у клітинах від донорів старшого віку.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

- United Nations Department of Economic. World Population Ageing 2019. — 2020. — DOI: 10.18356/6a8968ef-en.
- Humeral shaft fracture healing rates in older patients / F. H. Pollock, J. P. Maurer, A. Sop [et al.] // *Orthopedics*. — 2020. — Vol. 43 (3). — P. 168–172. — DOI: 10.3928/01477447-20200213-03.
- Effect of patient age on the radiographic outcomes of distal radius fractures subject to nonoperative treatment / E. C. Makhni, T. J. Ewald, S. Kelly, C. S. Day // *Journal of Hand Surgery*. — 2008. — Vol. 33 (8). — P. 1301–1308. — DOI: 10.1016/j.jhsa.2008.04.031.
- Stegen S. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration / S. Stegen, N. van Gastel, G. Carmeliet // *Bone*. — 2015. — Vol. 70. — P. 19–27. — DOI: 10.1016/j.bone.2014.09.017.
- Иновационные методы оптимизации регенерации кости: обогащенная тромбоцитами плазма (сообщение 1) (обзор литературы) / Н. А. Корж, П. М. Воронцов, И. В. Вишнякова, Е. М. Самойлова // *Ортопедия, травматология и протезирование*. — 2017. — № 3. — С. 123–135. — DOI: 10.15674/0030-598720173123-135.
- The effect of age on gene expression in adult and juvenile rats following femoral fracture / B. J. Desai, M. H. Meyer, S. Porter [et al.] // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2003. — Vol. 17 (10). — P. 689–698. — DOI: 10.1097/00005131-200311000-00005.
- Effect of ageing on healing of bilateral mandibular condyle fractures in a rat model / H. Tatsumi, K. Hideshima, T. Kanno [et al.] // *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. — 2014. — Vol. 43 (2). — P. 185–193. — DOI: 10.1016/j.ijom.2013.07.742.
- Periodontal healing may be affected by aging: A histologic study in rats / B. B. Benatti, J. B. C. Neto, M. Z. Casati [et al.] // *Journal of Periodontal Research*. — 2006. — Vol. 41 (4). — P. 329–333. — DOI: 10.1111/j.1600-0765.2006.00872.x.
- Fractures in geriatric mice show decreased callus expansion and bone volume / L. A. Lopas, N. S. Belkin, P. L. Mutyaba [et al.] // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. — 2014. — Vol. 472 (11). — P. 3523–3532. — DOI: 10.1007/s11999-014-3829-x
- Tsuji K. Aged mice require full transcription factor, Runx2/Cbfa1, gene dosage for cancellous bone regeneration after bone marrow ablation / K. Tsuji, T. Komori, M. Noda // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2004. — Vol. 19 (9). — P. 1481–1489. — DOI: 10.1359/JBMR.040601.
- Applications of a mouse model of calvarial healing: Differences in regenerative abilities of juveniles and adults / O. O. Aalami, R. P. Nacamuli, K. A. Lenton [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. — 2004. — Vol. 114 (3). — P. 713–720. — DOI: 10.1097/01.PRS.0000131016.12754.30.
- Differential expression of sclerostin in adult and juvenile mouse calvariae / M. D. Kwan, N. Quarto, D. M. Gupta [et al.] // *Plastic and Reconstructive Surgery*. — 2011. — Vol. 127 (2). — P. 595–602. — DOI: 10.1097/PRS.0b013e3181fed6d0.
- Aged male rats regenerate cortical bone with reduced osteocyte density and reduced secretion of nitric oxide after mechanical stimulation / D. M. Joiner, R. J. Tayim, J. D. McElderry [et al.] // *Calcified Tissue International*. — 2014. — Vol. 94 (5). — P. 484–494. — DOI: 10.1007/s00223-013-9832-5.
- Increased osteoblast and osteoclast activity in female senescence-accelerated, osteoporotic SAMP6 mice during fracture healing / T. Histing, D. Stenger, S. Kuntz [et al.] // *Journal of Surgical Research*. — 2012. — Vol. 175 (2). — P. 271–277. — DOI: 10.1016/j.jss.2011.03.052.
- Influence of defective bone marrow osteogenesis on fracture repair in an experimental model of senile osteoporosis / M. Egermann, P. Heil, A. Tami [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. — 2010. — Vol. 28 (6). — P. 798–804. — DOI: 10.1002/jor.21041.
- Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: Is osteoclast activity the key to age-related impaired healing? / M. Mehta, P. Strube, A. Peters [et al.] // *Bone*. — 2010. — Vol. 47 (2). — P. 219–228. — DOI: 10.1016/j.bone.2010.05.029.
- Pien D. M. Influence of age and gender on peri-implant osteogenesis. Age and gender on peri-implant osteogenesis / D. M. Pien, D. G. Olmedo, M. B. Guglielmotti // *Acta Odontol. Latinoam*. — 2001. — Vol. 14 (1–2). — P. 9–13. — PMID: 2004130410.
- An osteopenic/osteoporotic phenotype delays alveolar bone repair / C. H. Chen, L. Wang, U. Serdar Tulu [et al.] // *Bone*. — 2018. — Vol. 112. — P. 212–219. — DOI: 10.1016/j.bone.2018.04.019.
- Is the midterm progress of pediatric and adolescent talus fractures stratified by age? / C. Kruppa, T. Snoap, D. L. Sietsema [et al.] // *Journal of Foot and Ankle Surgery*. — 2018. — Vol. 57 (3). — P. 471–477. — DOI: 10.1053/j.jfas.2017.10.031.
- Meyer M. H. Altered expression of mitochondrial genes in response to fracture in old rats / M. H. Meyer, R. A. Meyer // *Acta Orthopaedica*. — 2006. — Vol. 77 (6). — P. 944–951. — DOI: 10.1080/17453670610013277.
- Meyer M. H. Altered mRNA expression of genes related to nerve cell activity in the fracture callus of older rats: A randomized, controlled, microarray study / M. H. Meyer, W. Etienne, R. A. Meyer // *BMC Musculoskeletal Disorders*. — 2004. — Vol. 5. — DOI: 10.1186/1471-2474-5-24.

22. Eriksen C. G. The expression of IL-6 by osteoblasts is increased in healthy elderly individuals: Stimulated proliferation and differentiation are unaffected by age / C. G. Eriksen, H. Olsen, L. B. Husted [et al.] // *Calcified Tissue International*. — 2010. — Vol. 87 (5). — P. 414–423. — DOI: 10.1007/s00223-010-9412-x.
23. Is the expression of Transforming Growth Factor-Beta1 after fracture of long bones solely influenced by the healing process? / G. Kaiser, A. Thomas, J. Köttstorfer [et al.] // *International Orthopaedics*. — 2012. — Vol. 3 (10). — P. 2173–2179. — DOI: 10.1007/s00264-012-1575-9.
24. The influence of non-osteogenic factors on the expression of M-CSF and VEGF during fracture healing / J. Köttstorfer, G. Kaiser, A. Thomas [et al.] // *Injury*. — 2013. — Vol. 44 (7). — P. 930–934. — DOI: 10.1016/j.injury.2013.02.028.
25. Gene expression in older rats with delayed union of femoral fractures / R. A. Meyer, M. H. Meyer, M. Tenholder [et al.] // *Journal of Bone and Joint Surgery — Series A*. — 2003. — Vol. 85 (7). — P. 1243–1254. — DOI: 10.2106/00004623-200307000-00010.
26. BMP2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats / B. Yue, B. Lu, K. R. Dai [et al.] // *Calcified Tissue International*. — 2005. — Vol. 77 (6). — P. 395–403. — DOI: 10.1007/s00223-005-0180-y.
27. Global age-dependent differences in gene expression in response to calvarial injury / D. C. Wan, M. D. Kwan, D. M. Gupta [et al.] // *Journal of Craniofacial Surgery*. — 2008. — Vol. 19 (5). — P. 1292–1301. — DOI: 10.1097/SCS.0b013e3181843609.
28. Exogenous hedgehog antagonist delays but does not prevent fracture healing in young mice / X. Liu, J. A. McKenzie, C. W. Maschhoff [et al.] // *Bone*. — 2017. — Vol. 103. — P. 241–251. — DOI: 10.1016/j.bone.2017.07.017.
29. Expression and role of Sonic Hedgehog in the process of fracture healing with aging / K. Matsumoto, T. Shimo, N. Kurio [et al.] // *In Vivo*. — 2016. — Vol. 30 (2). — P. 99–105.
30. Notch signaling in mesenchymal stem cells harvested from geriatric mice / P. L. Mutyaba, N. S. Belkin, L. Lopas [et al.] // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2014. — Vol. 28 (Suppl. 1). — DOI: 10.1097/BOT.0000000000000064.
31. Effect of age on vascularization during fracture repair / C. Lu, E. Hansen, A. Sapozhnikova [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. — 2008. — Vol. 26 (10). — P. 1384–1389. — DOI: 10.1002/jor.20667.
32. Interaction of age and mechanical stability on bone defect healing: An early transcriptional analysis of fracture hematoma in rat / A. Ode, G. N. Duda, S. Geissler [et al.] // *PLoS One*. — 2014. — Vol. 9 (9). — DOI: 10.1371/journal.pone.0106462.
33. Osteopenia and impaired fracture healing in aged EP4 receptor knockout mice / M. Li, D. R. Healy, Y. Li [et al.] // *Bone*. — 2005. — Vol. 37 (1). — P. 46–54. — DOI: 10.1016/j.bone.2005.03.016.
34. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates bone formation and remodeling during intramembranous bone repair in aging mice / V. Bradaschia-Correa, A. M. Josephson, A. J. Egol [et al.] // *Tissue and Cell*. — 2017. — Vol. 49 (5). — P. 545–551. — DOI: 10.1016/j.tice.2017.07.001.
35. Different effects of Wnt/ β -catenin activation and PTH activation in adult and aged male mice metaphyseal fracture healing / D. Liu, H. Qin, J. Yang [et al.] // *BMC Musculoskeletal Disorders*. — 2020. — Vol. 21 (1). — DOI: 10.1186/s12891-020-3138-3.
36. Inhibition of osteoblast differentiation but not adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells by sera obtained from aged females / B. M. Abdallah, M. Haack-Sørensen, T. Fink, M. Kassem // *Bone*. — 2006. — Vol. 39 (1). — P. 181–188. — DOI: 10.1016/j.bone.2005.12.082.
37. Aging alters bone-fat reciprocity by shifting in vivo mesenchymal precursor cell fate towards an adipogenic lineage / L. Singh, T. A. Brennan, E. Russell [et al.] // *Bone*. — 2016. — Vol. 85. — P. 29–36. — DOI: 10.1016/j.bone.2016.01.014.
38. Aging negatively impacts the ability of megakaryocytes to stimulate osteoblast proliferation and bone mass / K. A. Maupin, E. R. Himes, A. P. Plett [et al.] // *Bone*. — 2019. — Vol. 127. — P. 452–459. — DOI: 10.1016/j.bone.2019.07.010.
39. Degeneration of the osteocyte network in the C57BL/6 mouse model of aging / L. A. M. Tiede-Lewis, Y. Xie, M. A. Hulbert [et al.] // *Aging (Albany, NY)*. — 2017. — Vol. 9 (10). — P. 2187–2205. — DOI: 10.18632/aging.101308.
40. Mechanosensitive Ca²⁺ signaling and coordination is diminished in osteocytes of aged mice during ex vivo tibial loading / A. E. Morrell, S. T. Robinson, M. J. Silva, X. E. Guo // *Connective Tissue Research*. — 2020. — Vol. 61 (3–4). — P. 389–398. — DOI: 10.1080/03008207.2020.1712377.
41. Decreased pericellular matrix production and selection for enhanced cell membrane repair may impair osteocyte responses to mechanical loading in the aging skeleton / M. L. Hagan, K. Yu, J. Zhu [et al.] // *Aging Cell*. — 2020. — Vol. 19 (1). — DOI: 10.1111/acel.13056.
42. Osteocyte RANKL is required for cortical bone loss with age and is induced by senescence / H. N. Kim, J. Xiong, R. S. MacLeod [et al.] // *JCI Insight*. — 2020. — Vol. 5 (19). — DOI: 10.1172/jci.insight.138815.
43. Elimination of senescent osteoclast progenitors has no effect on the age-associated loss of bone mass in mice / H. N. Kim, J. Chang, S. Iyer [et al.] // *Aging Cell*. — 2019. — Vol. 18 (3). — DOI: 10.1111/acel.12923.
44. Dysapoptosis of osteoblasts and osteocytes increases cancellous bone formation but exaggerates cortical porosity with age / R. L. Jilka, C. A. O'Brien, P. K. Roberson [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2014. — Vol. 29 (1). — P. 103–117. — DOI: 10.1002/jbmr.2007.
45. Osteoclasts prefer aged bone / K. Henriksen, D. J. Leeming, I. Byrjalsen [et al.] // *Osteoporosis International*. — 2007. — Vol. 18 (6). — P. 751–759. — DOI: 10.1007/s00198-006-0298-4.
46. Fusion potential of human osteoclasts in vitro reflects age, menopause, and in vivo bone resorption levels of their donors — a possible involvement of dc-stamp / A. M. J. Møller, J. M. Delaisse, J. B. Olesen [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2020. — Vol. 21 (17). — P. 1–16. — DOI: 10.3390/ijms21176368.
47. Mitochondrial dysfunction impairs osteogenesis, increases osteoclast activity, and accelerates age related bone loss / P. F. Dobson, E. P. Dennis, D. Hippos [et al.] // *Scientific Reports*. — 2020. — Vol. 10 (1). — DOI: 10.1038/s41598-020-68566-2.
48. Sclerostin is expressed in osteoclasts from aged mice and reduces osteoclast-mediated stimulation of mineralization / K. Ota, P. Quint, M. Ruan [et al.] // *Journal of Cellular Biochemistry*. — 2013. — Vol. 114 (8). — P. 1901–1907. — DOI: 10.1002/jcb.24537.
49. Effect of the Interleukin-1 genotype on outcomes of regenerative periodontal therapy with bone replacement grafts / O. I. Weiss, J. Caton, T. Blieden [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2004. — Vol. 75 (10). — P. 1335–1342. — DOI: 10.1902/jop.2004.75.10.1335.
50. Tissue-engineered repair of osteochondral defects: Effects of the age of donor cells and host tissue / T. Morihara, F. Harwood, R. Goomer [et al.] // *Tissue Engineering*. — 2002. — Vol. 8 (6). — P. 921–929. — DOI: 10.1089/107632702320934029.
51. The effect of diminished osteogenic signals on reduced osteoporosis recovery in aged mice and the potential therapeutic use of adipose-derived stem cells / H. Y. Liu, J. F. Chiou, A. T. H. Wu [et al.] // *Biomaterials*. — 2012. — Vol. 33 (26). — P. 6105–6112. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.024.
52. Isolation, characterisation and osteogenic potential of human bone marrow stromal cells derived from the medullary cavity of the femur / E. Leonardi, V. Devescovi, F. Perut [et al.] // *La*

- Chirurgia degli organi di movimento. — 2008. — Vol. 92 (2). — P. 97–103. — DOI: 10.1007/s12306-008-0057-0.
53. Bone marrow stromal cells of young and adult rats respond similarly to platelet-released supernatant and Bone Morphogenetic Protein-6 in vitro / S. Cei, B. Kandler, A. Fugl [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2006. — Vol. 77 (4). — P. 699–706. — DOI: 10.1902/jop.2006.050155.
 54. Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix / J. O. Hollinger, A. O. Onikepe, J. MacKrell [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. — 2008. — Vol. 26 (1). — P. 83–90. — DOI: 10.1002/jor.20453.
 55. Aging does not lessen the effectiveness of TGF β 2-enhanced bone regeneration / D. R. Sumner, T. M. Turner, M. Cohen [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. — 2003. — Vol. 18 (4). — P. 730–736. — DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.730.
 56. Modulation of macrophage activity during fracture repair has differential effects in young adult and elderly mice / J. A. S. Shantz, Y. Y. Yu, W. Andres [et al.] // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2014. — Vol. 28 (Suppl. 1). — DOI: 10.1097/BOT.0000000000000062.
 57. Age-related changes to macrophages are detrimental to fracture healing in mice / D. Clark, S. Brazina, F. Yang [et al.] // *Aging Cell*. — 2020. — Vol. 19 (3). — DOI: 10.1111/acel.13112.
 58. Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice / Z. Xing, C. Lu, D. Hu [et al.] // *Journal of Orthopaedic Research*. — 2010. — Vol. 28 (8). — P. 1000–1006. — DOI: 10.1002/jor.21087.
 59. Influences of donor and host age on human muscle-derived stem cell-mediated bone regeneration / X. Gao, A. Lu, Y. Tang [et al.] // *Stem Cell Res. Ther.* — 2018. — Vol. 9 (1). — DOI: 10.1186/s13287-018-1066-z.
 60. Compromised bone healing in aged rats is associated with impaired M2 macrophage function / J. Loffler, F. A. Sass, S. Filter [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2019. — Vol. 10. — DOI: 10.3389/fimmu.2019.02443.
 61. Lowering circulating apolipoprotein e levels improves aged bone fracture healing / R. Huang, X. Zong, P. Nadesan [et al.] // *JCI Insight*. — 2019. — Vol. 4 (18). — DOI: 10.1172/jci.insight.129144.
 62. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender / Z. Schwartz, A. Somers, J. T. Mellonig [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 1998. — Vol. 69 (4). — P. 470–478. — DOI: 10.1902/jop.1998.69.4.470.
 63. Characterization of bone defect repair in young and aged rat femur induced by xenogenic demineralized bone matrix / P. Torricelli, M. Fini, G. Giavaresi [et al.] // *Journal of Periodontology*. — 2002. — Vol. 73 (9). — P. 1003–1009. — DOI: 10.1902/jop.2002.73.9.1003.

Стаття надійшла до редакції 09.08.2021

AGE-RELATED FEATURES OF BONE REGENERATION (LITERATURE REVIEW)

M. O. Korzh, P. M. Vorontsov, N. O. Ashukina, V. E. Maltseva

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

✉ Mykola Korzh, MD, Prof. in Traumatology and Orthopaedics: mykola.korzh47@gmail.com

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

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

✉ Valentyna Maltseva, Phd in Biol. Sci.: maltseva.val. evg@gmail.com