

УДК 616.71-007.21-089.843-092.9:[611.018.1"712.4":611.013.395]](048.3)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-598720223-480-90>

## **Морфологія загоєння критичного дефекту кістки за умов використання алогенних кісткових імплантатів у комбінації з мезенхімальними стромальними клітинами залежно від віку реципієнта в експерименті**

**Н. О. Ашукіна, П. М. Воронцов, В. Є. Мальцева, З. М. Данищук, О. А. Нікольченко, К. М. Самойлова, В. С. Гусак**

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

*Mesenchymal stem cells (MSC) can be used to facilitate reparative osteogenesis. In the case of critical-size defects, MSC can attach to allogenic bone implants (AlloI) that serve as a matrix. Objective. Analyze the morphological features of reparative osteogenesis in critical-size defects in femurs of rats (3 and 12 months old) when the defects are filled with MSC along with AlloI. Methods. 60 white lab rats, 3 months (n=30) and 12 months (n=30) old were used. Defects (3mm in depth, 3mm in diameter) were created in the femoral metaphysis of each rat, and filled with AlloI in the control groups and with AlloI and adipose-derived MSC in the experimental groups. Each group contained 15 rats of a particular age. 14, 28, and 90 days after the surgery, histological studies were conducted. Results. The area of AlloI decreased with time. 14 days after the surgery, in the experimental group, the area of AlloI was 1.6 times greater in 3-month-old (3mo) rats than in 12-month-old (12mo) rats. In comparison to the control, the area of AlloI was greater 14 days after surgery in 3mo rats and 28 days after surgery in 12mo rats. 14 and 28 days after the operation, the area of connective tissue was greater in rats of both experimental groups than in the control. For the 3mo rats, the same was true 90 days after the operation. The area of newly formed bone was 1.6 times lower in 3mo rats than in 12mo rats 14 days after the operation. 90 days after the operation, the area was 2.3 greater in 3mo rats. For 12mo rats, the highest area of bone tissue occurred 14 days after the surgery, and subsequently did not significantly change or differ from the control. For 3mo rats, the area of bone tissue was lower than control 14 and 28 days after the surgery, but greater than control 90 days after the surgery. Conclusions. The use of MSC along with AlloI to fill traumatic bone defects causes slower bone formation and excessive formation of connective tissue, independent of the age of the recipient. Key words. Animal model, critical-sized bone defect, age, bone regeneration, alloimplant, mesenchymal stromal cells.*

*Мезенхімальні стромальні клітини (МСК) використовують для оптимізації репаративного остеогенезу. Каркасом для їхнього прикріплення можуть бути алогенні кісткові імплантати (АлоІ). Мета. Проаналізувати перебіг репаративного остеогенезу в дефектах критичного розміру стегнових кісток щурів (вік 3 і 12 міс.) за умов пластики АлоІ із МСК. Методи. Використано 60 білих лабораторних щурів віком 3 міс. (n = 30) і 12 міс. (n = 30). Дефект (глибина 3 мм, діаметр 3 мм) у метафізі стегнової кістки заповнили в контрольних групах АлоІ (по 15 щурів кожного віку), у дослідних — АлоІ із МСК із жирової тканини (по 15 тварин кожного віку). Через 14, 28 і 90 днів після операції виконано гістологічні дослідження. Результати. Відносна площа АлоІ протягом експерименту зменшувалася. У досліді на 14-ту добу в 3-місячних щурів вона виявилася більшою в 1,6 раза, ніж у 12-місячних, а порівняно з контролем була більшою в молодших щурів на 14-ту добу, у старших — на 28-му. Відносні площі сполучної тканини за умов використання АлоІ та МСК у тварин обох вікових груп були більшими на 14- та 28-му доби, а у 3-місячних щурів — і на 90-ту, ніж у разі застосування АлоІ окремо. Відносна площа новоутворених кісткових трабекул у щурів віком 3 міс. на 14-ту добу була нижчою в 1,6 раза, на 90-ту — більшою у 2,3 раза, ніж у 12-місячних тварин. В останніх площа кісткової тканини досягла вищого показника на 14-ту добу і надалі значуще не змінювалася та не відрізнялася від контролю цього віку. У 3-місячних щурів на 14- та 28-му доби показник був нижчим приблизно в 1,5 раза, а на 90-ту — більшим в 1,9 раза порівняно з контролем цього віку. Висновки. Введення МСК разом із АлоІ у випадках свіжих травматичних ушкоджень кісток спричинює уповільнення кісткоутворення незалежно від віку реципієнта і надлишкове формування сполучної тканини.*

**Ключові слова.** Модель на тваринах, дефект кістки критичного розміру, вік, регенерація кістки, алоімплантат, мезенхімальні стромальні клітини

## Вступ

Регенерація кістки — складний процес, який залежить від багатьох фізичних і біологічних чинників. Важливим серед останніх є стан кісткової тканини на момент виникнення травми, а саме: функціональна активність її клітин — остеобластів, остеоцитів, остеокластів, наявність достатньої кількості мезенхімальних стромальних клітин (МСК), малодиференційованих клітин ендосту та періосту. Із віком дисбаланс кісткового гомеостазу призводить до погіршення якості кістки та порушення її здатності до відновлення. Процес регенерації кістки уповільнюється [1–3], що підвищує ризик незадовільних результатів після реконструктивних утручань на скелеті (ендопротезування кульшового та колінного суглобів; заміщення дефектів кісток після видалення пухлин, вогнепальних поранень і травматичних ушкоджень; хірургія хребта тощо). У клінічних умовах зафіксовано, що вторинні зміщення після перелому дистального відділу променевої кістки траплялися частіше в 1,5 раза в пацієнтів старших за 65 років порівняно з особами віком 18–44 роки в діапазоні до 8 тижнів після накладання гіпсової пов'язки [2]. Більшою виявилася частота незрощень переломів діафіза плечової кістки у хворих старших за 55 років порівняно з молодшими [1]. Із огляду на постійне збільшення у світовій популяції людей старших за 65 років, загальною кількістю яких у 2050 р. може сягнути 1,5 млрд [4], розроблення ефективних методик оптимізації регенерації кістки є актуальною проблемою в ортопедії та травматології.

МСК, які мігрують у зону ушкодження кістки, здатні до проліферації та диференціації в остеогенному напрямку. На моделі перелому великогомілкової кістки мишей доведено, що через 8 тижнів ( $85 \pm 10$ ) % остеобластів у кістковій мозолі походять із МСК кісткового мозку [5], що свідчить про критичну роль цих клітин в остеорепації. Відповідно, недостатня кількість МСК чи змінені структурно-функціональні особливості, обумовлені віком, можуть негативно позначитися на відновленні кістки. В експериментах на мишах 2- і 24-місячного віку встановлено вікове зменшення кількості МСК і клітин-попередників остеобластів у неушкоджених і травмованих кістках [6], зниження їхніх здібностей утворювати колонії *in vitro* та диференціюватися в хондрогенному та остеогенному напрямках, а також збільшення в старих клітинах генів, які пов'язані зі зменшенням кісткоутворення та підвищенням

остеорезорбції [7]. Визначено, що перетворення під час старіння червоного кісткового мозку на жовтий, тобто накопичення в ньому адипоцитів, значно погіршує загоєння переломів у мишей через зменшення участі в процесі МСК кісткового мозку. У регенераті збільшується площа хрящової тканини, зменшується мінералізованої, відповідно, знижується мінеральна щільність кісткової тканини в ділянці перелому [8]. Окрім того, встановлено зниження здатності до міграції МСК (отриманих від старих донорів порівняно з молодими) у відповідь на сигнальні фактори ушкодження тканини [9]. Порушення цієї функції МСК призводить до обмеження їхньої участі у відновлювальних процесах і ставить під загрозу загоєння тканин. Виходячи зі вказаного, логічним є введення в зону незрощення або уповільненого зрощення перелому, значних за розмірами дефектів кістки додаткових культивованих МСК, які мають значний репаративний потенціал. Як свідчать нещодавно опубліковані огляди літератури [9, 10], результати багатьох досліджень на тваринах і клінічних спостережень підтверджують можливість успішного використання МСК для оптимізації репаративного остеогенезу. Використання для їхнього культивування різноманітних матриць дає змогу зберегти тканинспецифічні властивості клітин, створити трансплантат необхідної форми та розмірів, полегшує процес трансплантації та утримання клітин у зоні ушкодження кістки.

Це є особливо важливим у випадку великих за розмірами дефектів кісток, які не загоюються самостійно, коли ін'єкцій лише МСК може бути замало, оскільки відсутній каркас, до якого вони можуть прикріпитися. Як такий каркас можна використати аутологічні або алогенні кісткові трансплантати. Аутологічні трансплантати залишаються «золотим стандартом» в ортопедичній хірургії. Проте мала кількість вилученого матеріалу, додаткове хірургічне втручання та неможливість отримання в пацієнтів із важкими травмами обмежують їхнє використання. Альтернативою є кісткові алоімплантати, які внаслідок технічного оброблення позбавлені живих клітин та з успіхом застосовуються для оптимізації репаративного остеогенезу [11]: вони забезпечують механічну міцність у ділянці використання та є матрицею для формування кісткової тканини. Використовувані в ортопедичній і травматологічній практиці кісткові алоімплантати можуть бути структурними (кортикальні, губчасті, кортикально-губчасті) та безструктурними (чіпси) [12]. Головним їхнім

недоліком називають низькі остеоіндуктивні якості. Розв'язати це питання уявляється можливим шляхом одночасного введення алоімплантатів, факторів росту або МСК. Необхідність використання біологічно активних чинників для прискорення репаративного остеогенезу виникає не лише у випадках утворення дефектів кістки критичного розміру, а й в разі, коли власний резерв клітин-попередників остеобластів зменшується, а процес кісткового ремоделювання зміщується в бік остеорезорбції, призводячи до втрати кісткової тканини та погіршення якості кістки, що відбувається в пацієнтів похилого та старечого віку.

*Мета:* проаналізувати морфологічні особливості репаративного остеогенезу в критичних дефектах стегнових кісток щурів репродуктивного раннього та зрілого пізнього вікових періодів за умов пластики алогенними кістковими імплантатами з МСК.

## Матеріал і методи

Експериментальне дослідження проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986) [13, 14]. План експериментальних досліджень ухвалено комітетом із біоетики при ДУ «ПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 191 від 22.04.2019).

### *Дизайн дослідження*

У роботі використано 60 білих лабораторних щурів 3-місячного ( $n = 30$ ) та 12-місячного ( $n = 30$ ) віку, яким виконали дефект у метафізі стегнової кістки та заповнили його в контрольних групах кістковим алоімплантатом (по 15 тварин кожного віку), у дослідних — кістковим алоімплантатом із культивованими МСК (також по 15 тварин кожного віку).

Матеріал для виготовлення імплантатів отримано з донорської стегнової або великогомілкової кісток 6-місячних щурів ( $n = 15$ ), які видаляли після введення летальної дози анестетика (тіопентал натрію 90 мг/кг внутрішньом'язово). Отримані імплантати з метафізів вищезазначених кісток оброблено за методикою «ОМС-А» (сертифікат відповідності № UA. TR. 101-21-2016), яка передбачає дегідратацію та звільнення від органічної складової.

*Хірургічні втручання* виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після гоління шерсті на лівому коліні й оброблення антисептиком Бетадин® передньолатеральним доступом відкривали ділянку дистального метафіза стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект критичного розміру — мінімальний дефект, який не загоюється самостійно протягом життя тварини чи впродовж експерименту [15]. Ми обрали діаметр дефекту 3 мм, глибину 3 мм, що перевищує мінімальний розмір критичного дефекту для щурів [16] і при цьому відсутня необхідність додаткової фіксації. Циліндричні кортикально-губчасті алоімплантати відповідного розміру розміщували в ділянці дефекту. Після місцевої обробки антибіотиком пошарового зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком.

Через 14, 28 і 90 діб після операції по 5 тварин із кожної групи виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом.

### *Отримання алогенних МСК*

Жирову тканину отримували зі сальника щурів, переміщували зі стерильної пробірки типу Falcon 15 мл із середовищем DMEM (Biowest, Lo102-500, Франція) у співвідношенні об'єму тканини та ферментів 1 : 5. У стерильній чашці Петрі подрібнювали тканину на шматочки близько  $2 \times 2$  мм, які піддавали дезагрегації в суміші ферменту колагенази I типу (Worthington, 49P19751, США) у концентрації 0,075 мг/мл і буферного розчину Dulbecco's без кальцію та магнію (Biowest, LO615-500, Франція) (співвідношення об'єму тканини та ферментів 1 : 10) та інкубували в термостаті за 37 °C упродовж 60 хв. Після цього фрагменти жирової тканини центрифугували (центрифуга Nuve NF800R, Туреччина) за 1200 g 5 хв і отримали дві фракції. У верхньому світлому шарі розташовуються адипоцити, а в осаді — клітини стромальної васкулярної фракції з домішкою гемопоетичних.

Надосадову рідину відібрали за допомогою стерильної серологічної піпетки, а осад ресуспендували у 20 мл середовища DMEM (Biowest Lo102-500, Франція). Далі отримані клітини по  $3,0 \times 10^5$  розсіяли в культуральні флакони 25 см<sup>2</sup> (TPP, 20200482, Швейцарія) із додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки (Biowest, SOOCT100R, Франція), фільтровану два рази крізь фільтри шприцеві 0,22 мкм Millex®GV (Merck Millipore Ltd, SLGP033RB), та 0,01 % гентаміцину сульфату.



Культуральні флакони із клітинами розташовували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі EC 160 (Туреччина) за температури 37 °С, вмісту CO<sub>2</sub> 5 % у повітрі та 95 % вологості.

Через 24 год культуральне середовище з неприкріпленими клітинами злили, флакон із прикріпленими — промили середовищем DMEM. Після чого додали свіже середовище DMEM із 10 % фетальної бичачої сироватки і 0,01 % гентаміцину сульфату і змінювали його кожні 3 доби.

Після утворення монослою клітин на 9-ту добу їх знімали шляхом інкубації упродовж 5 хв у підігрій до 37 °С суміші 0,25 % трипсину (Boiwest, X0915-100, Франція) з 0,02 % розчином Версену (ТОВ «ВЕТЛАЙН АГРОСАЄНС», Україна) у співвідношенні 1 : 9, ресуспендували в культуральному середовищі й осаджували центрифугуванням за 1000 об/хв упродовж 10 хв. Оцінили концентрацію клітин у камері Горяєва за допомогою мікроскопа MC-100X MICROS і знову розсіяли по  $3,0 \times 10^5$  клітин у кожен культуральний флакон.

Через 7; 8; 9 діб культивування клітини зняли та перенесли в стерильні мікропробірки в кількості  $1,0 \times 10^6$  на 0,5 мл культурального середовища (DMEM із додаванням 10 % фетальної бичачої сироватки) для просочування імплантатів і введення в дефекти щурів. Життєздатність клітин оцінювали на кожному етапі після зняття з культурального флакона за допомогою фарбування трипановим синім.

#### *Гістологічні дослідження*

У щурів виділяли прооперовані стегові кістки, очищували від м'яких тканин і фіксували протягом 4 діб у 10 % нейтральному формаліні. Після промивання водопровідною водою кістки декальцинували у 5 % розчині трихлороцтової кислоти [17], промивали в етиловому спирті, вирізали метафізи з ділянкою дефекту, зневоднювали в ізопропіловому спирті зростаючої концентрації. Просочували в суміші ізопропілового спирту та парафіну, потім — серії парафінів, заливали в парафін. Зрізи виготовляли на санному мікротомі Reichert (Австрія), забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Структуру клітин і міжклітинної речовини в ділянці модельованого дефекту та навколо імплантованого кісткового матеріалу аналізували у світловому мікроскопі Olympus BX63 (Японія). Для фотографування використано цифрову камеру DP73 (Olympus) і програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013).

*Гістоморфометрію* площ тканин регенерату в ділянці імплантації виконано з використанням програмного забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013). Вимірювали площі новоутворених тканин (кісткової та сполучної) та імплантатів (на 7 центральних зрізах у кожній тварини), потім розраховували їхній відносний вміст (%) від загальної площі дефекту.

#### *Статистичні методи*

Аналіз отриманих результатів виконаний із використанням програми «IBM SPSS Statistics 20». Результати вимірювань наведені як середнє та стандартне відхилення. Нормальність розподілу перевіряли з використанням методу аналізу Колмогорова-Смірнова. Порівняння показників груп різного віку або груп з/без використання МСК виконували за методом t-критерій Стьюдента (порівняння двох груп). Різницю вважали статистично значущою за умови якщо  $p < 0,05$ .

## **Результати та їх обговорення**

### *Морфологія культури мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини щура*

Через 12 діб культивування (другий пасаж після пересіву) на всій поверхні культурального флакона виявлено утворення монослою фібробластів. Вони формували вузлики різного розміру — від малих (8–10 клітин) до великих (20–40) (рис. 1, а). У вузликах розташовувалися дрібніші витягнуті фібробласти, між вузликами — більші полігональні. Ядра в них були великими, містили конденсований хроматин, 2–3 ядерця. У цитоплазмі більшості фібробластів виявлено гранулярний вміст. Спостерігали клітини з двома ядрами та фігури мітозу (рис. 1, б). Виявлені структурні особливості клітин свідчать про їхню життєздатність і проліферативну активність.

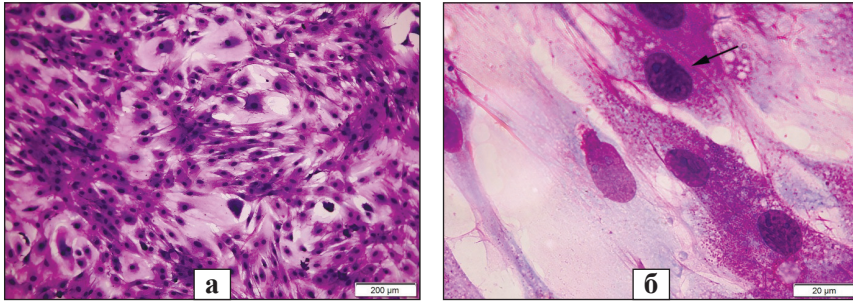
### *Морфологія дистального метафіза стегової кістки щурів*

#### *14 діб після імплантації*

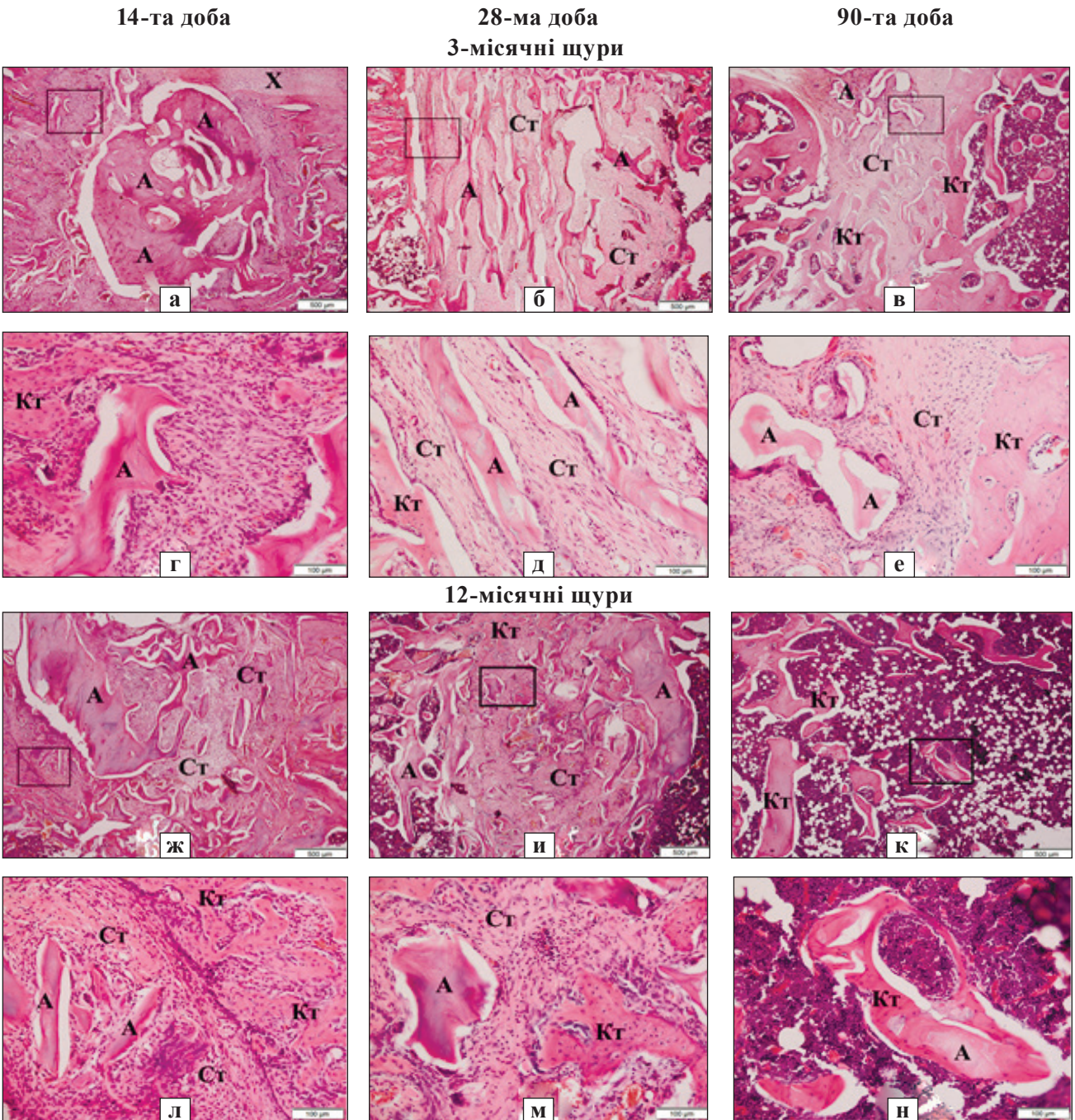
На цей термін дослідження у 3-місячних щурів майже всю площу критичного дефекту займав алогенний кістковий імплантат (рис. 2, а). Його відносна площа виявилася більшою в 1,7 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з групою тварин цього віку без використання МСК (рис. 3).

Навколо алоімплантата розміщувалася грубо-волокниста кісткова тканина, переважно з боку кістково-мозкової порожнини та протилежного кіркового шару. Новоутворені кісткові трабекули характеризувалися високою щільністю остецитів, на їхній поверхні траплялися поодинокі остеокласти, що свідчить про ремоделювання новоутвореної кісткової тканини (рис. 2, г).

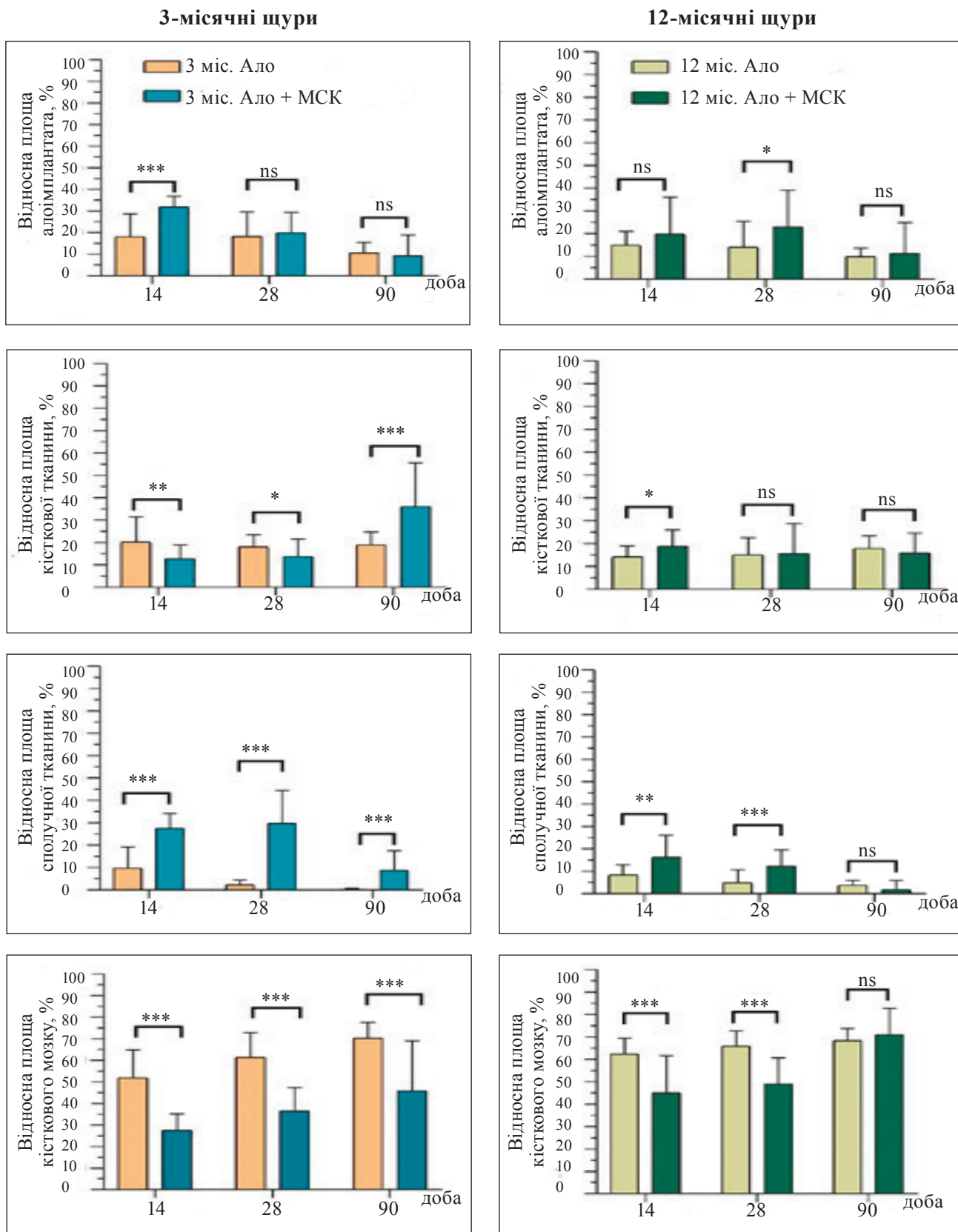




**Рис. 1.** Культура МСК із жирової тканини щура: а) формування вузликів різного розміру; б) конденсований хроматин в ядрах МСК, клітина на стадії телофази мітозу (стрілка). Забарвлення за Романовським-Гімзою



**Рис. 2.** Гістологічна картина ділянки дефекту в стегновій кістці 3-місячних (а–е) і 12-місячних (ж–н) щурів на 14, 28 та 90-ту доби після введення алоімплантата (А) із МСК. Показано фрагменти алоімплантата, території сполучної тканини (Ст), хондроїду (Х), новоутворена кісткова тканина (Кт). Рисунок г, д, е — фрагменти рисунків а, б, в відповідно, а рисунки л, м, н — рисунків ж, з, и відповідно. Гематоксилін та еозин



**Рис. 3.** Відносні площі алоімплантата (Ало) і новоутворених тканин у ділянці критичного дефекту стегнової кістки щурів 3- (3 міс) та 12-місячного (12 міс) віку залежно від використання мезенхімальних стромальних клітин (МСК) на 14, 28 та 90-ту добу після введення алоімплантата. ns — немає статистично значущої різниці; \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ . Показники наведені як середнє та стандартне відхилення. Порівняння груп з/без використання МСК на кожен термін спостереження виконано за методом t-критерію Стьюдента



До того ж, багатоядерні клітини типу остеокластів виявлено на алогенному кістковому матеріалі, що відображає його перебудову. У більшості щурів на цей термін, крім новоутвореної кісткової тканини, виявлено значні території пухкої сполучної. На поверхні материнського кортексу визначено утворення хондроїду.

За результатами гістоморфометрії встановлено суттєво більшу в 2,8 разу ( $p < 0,001$ ) відносну площу сполучної тканини, а новоутворених кісткових трабекул і кісткового мозку — меншу в 1,6 разу ( $p = 0,014$ ) та 1,9 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно порівняно з групою без МСК цього віку (рис. 3).

У 12-місячних щурів у ділянці імплантації виявилися залишки алогенного матеріалу, оточені переважно сполучною тканиною. На їхній поверхні розташовувалися багатоядерні клітини типу остеокластів. Новоутворену кісткову тканину, яка за структурою не відрізнялась від описаної в 3-місячних тварин, виявлено також на межі з материнською кісткою (рис. 2, ж, к).

Відносна площа алогенного кісткового імплантата в зоні дефекту виявилася меншою в 1,6 разу ( $p = 0,004$ ) порівняно з 3-місячними щурами (рис. 4) та не відрізнялася від показників тварин цього віку без використання МСК (рис. 3). Відносні площі сполучної тканини та кісткового мозку були меншими в 1,7 ( $p < 0,001$ ) та 1,6 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно, а кісткових трабекул — більшими в 1,5 разу ( $p = 0,007$ ) порівняно з 3-місячними щурами (рис. 4). Порівняно з групою щурів 12-місячного віку без використання МСК відносні площі сполучної тканини та кісткових трабекул виявилися більшими в 1,7 ( $p = 0,003$ ) та 1,3 разу ( $p = 0,026$ ) відповідно, а кісткового мозку — меншою в 1,5 разу ( $p < 0,001$ ) (рис. 3).

#### *28 днів після імплантації*

У 3-місячних щурів у ділянці дефекту визначено фрагменти алогенного кісткового матеріалу, оточені переважно сполучною тканиною різного ступеня зрілості. У ній розташовувалися кровоносні судини капілярного типу, фіброласти з гіпохромними ядрами, фіброцити, довга вісь яких була спрямована вздовж кісткових трабекул алоімплантата. На поверхні його фрагментів виявлено шар остеобластів, що свідчить про остеоіндуктивні властивості. Новоутворена кістка містилася по периметру дефекту на межі з материнською та формувала кірковий шар, представлений губчастою кістковою тканиною (рис. 2, б, д).

За результатами гістоморфометрії, відносна площа алогенного кісткового імплантата в зоні де-

фекту не відрізнялася від показника тварин цього віку без використання МСК. Як і на 14-ту добу спостереження, порівняно з групою без МСК цього віку зафіксовано в 13,5 разу ( $p < 0,001$ ) більшу відносну площу сполучної тканини, а відносні площі кісткових трабекул і кісткового мозку — менші в 1,3 ( $p = 0,049$ ) та 1,7 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно. Порівняно з 14-ю добою спостереження відносна площа імплантата зменшилася в 1,6 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткового мозку — збільшилася в 1,3 ( $p = 0,004$ ). Показники сполучної тканини та кісткових трабекул значуще не змінилися (рис. 3).

У 12-місячних щурів у ділянці дефекту фрагменти алоімплантата розташовувалися між полів сполучної тканини остеогенного типу. У ній містилися переважно клітини остеобластичного та фібробластичного диферонів, кровоносні судини капілярного типу різного діаметра, навколо деяких із них визначено лімфоцитарну інфільтрацію. Новоутворені кісткові трабекули з великою густиною остеокитів та шаром активних остеобластів на поверхні розташовувалися переважно по периметру дефекта, але й траплялися в його центральних ділянках. Кортекс був сформований губчастою кістковою тканиною (рис. 2, и, м).

Відносна площа алоімплантата не відрізнялася від показника 3-місячних щурів, але була більшою в 1,6 разу ( $p = 0,049$ ) порівняно з тваринами цього віку без використання МСК. Відносна площа сполучної тканини виявилася меншою у 2,4 ( $p < 0,001$ ), кісткового мозку — більшою в 1,3 разу ( $p = 0,001$ ), а кісткових трабекул — суттєво не відрізнялася від показників 3-місячних щурів (рис. 4). Порівняно з групою тварин того самого віку без використання МСК відносна площа сполучної тканини була більшою у 2,5 ( $p = 0,001$ ), кісткового мозку — меншою в 1,3 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткових трабекул — не відрізнялася. Усі оцінені площі тканин та імплантата на 28-му добу статистично значуще не відрізнялися від показників на 14-ту добу (рис. 3).

#### *90 днів після імплантації*

У 3-місячних щурів у ділянці дефекту зберігалася сполучна тканина та фрагменти алогенного кісткового алоімплантата (рис. 2, в, е), відносна площа якого, як і на 28-му добу, не відрізнялася від показника тварин цього віку без використання МСК. Відносні площі сполучної тканини та новоутворених кісткових трабекул були більшими в 43,4 ( $p < 0,001$ ) та 1,9 разу ( $p = 0,001$ ) відповідно, а кісткового мозку — меншими

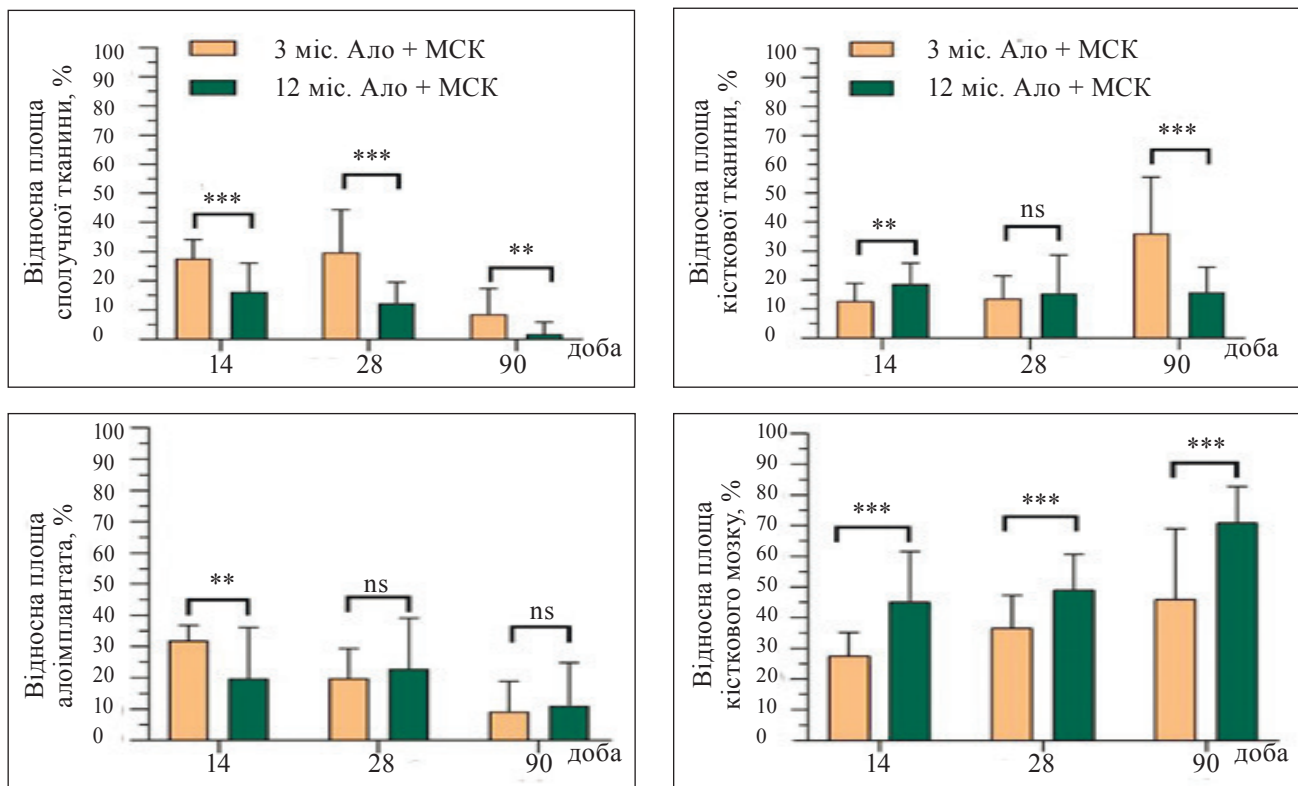
в 1,5 разу ( $p < 0,001$ ) порівняно з групою без МСК цього віку. Порівняно з 14-ю добою після імплантації відносна площа імплантата зменшилася в 3,4 ( $p < 0,001$ ), сполучної тканини — в 3,2 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткових трабекул та кісткового мозку — збільшилася у 2,8 ( $p < 0,001$ ) та 1,6 разу ( $p = 0,003$ ) відповідно. Порівняно з 28-ю добою площа імплантата зменшилася у 2,2 ( $p = 0,001$ ), сполучної тканини — в 3,4 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткових трабекул — збільшилася у 2,6 разу ( $p < 0,001$ ), площа кісткового мозку статистично значуще не змінилася (рис. 3).

У 12-місячних щурів в ділянці дефекту сполучної тканини майже не виявлено. Невеличкі фрагменти кісткового алоімплантата були оточені знов сформованою кісткою (рис. 2, к, н). Відносна площа алогенного кісткового імплантата значуще не відрізнялася від показників групи тварин цього самого віку без використання МСК і від групи 3-місячних щурів з використанням МСК. Відносні площі сполучної тканини та кісткових трабекул були меншими в 4,8 ( $p = 0,003$ ) та 2,3 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно, а кісткового мозку — більшою в 1,5 разу ( $p < 0,001$ ) порівня-

но з 3-місячними щурами та значуще не відрізнялися від показників 12-місячних тварин без використання МСК. Порівняно з 14-ю добою відносна площа сполучної тканини зменшилася у 8,9 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткового мозку — зросла в 1,6 разу ( $p < 0,000$ ), кісткових трабекул та імплантата — статистично значуще не змінилася. Порівняно з 28-ю добою відносна площа імплантата зменшилася у 2,1 разу ( $p = 0,017$ ), сполучної тканини — в 6,8 ( $p < 0,001$ ), кісткового мозку — збільшилася в 1,4 разу, кісткових трабекул — значуще не змінилася (рис. 3, 4).

### Обговорення

У проведеному дослідженні на щурах аналізували залежність інкорпорації та ремоделювання структурних кісткових алоімплантатів від віку (3 і 12 місяців на початку експерименту) та використання мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини. За модель обрано дефекти критичного розміру (глибина 3 мм, діаметр 3 мм) у дистальному метафізі стегнової кістки. Дефекти в метафізах довгих кісток щурів аналогічного розміру використовують для оцінювання ефективності остеопластичних матеріалів [15, 16, 18, 19].



**Рис. 4.** Зміна відносної площі алоімплантата (Ало), у разі його використання з мезенхімальними стромальними клітинами (МСК), і новоутворених тканин у ділянці критичного дефекту стегнової кістки щурів 3- (3 міс) та 12-місячного (12 міс) на 14, 28 та 90-ту добу після введення алоімплантата. ns — немає статистично значущої різниці; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ . Показники наведені як середнє та стандартне відхилення. Порівняння груп 3- та 12-місячного віку на кожен термін спостереження виконано за методом t-критерію Стьюдента



Для дистального метафіза стегнової кістки щурів мінімальний розмір критичного дефекту названий діаметром і глибиною 2,5 мм [16], а в разі діаметра 3,5 мм та глибини 4 мм автори [20] пропонують уже виконувати стабілізацію пластиною. Тобто обраний нами розмір дефекту, з одного боку, перевищує мінімальний критичний, з іншого, — не потребує використання додаткових засобів фіксації, які також впливають на перебіг репаративного остеогенезу.

Під час морфологічного дослідження ми приділили увагу швидкості перебудови імплантата і сформованим у ділянці дефекту тканинам. Визначено поступове зменшення відносної площі алоімплантата протягом експерименту (що свідчить про його перебудову) з утворенням сполучної та кісткової тканин у різних співвідношеннях на 14, 30 та 90-ту доби. Це узгоджується з результатами гістологічних досліджень тканин пацієнтів, де показано, що в процесі інкорпорації кісткових алоімплантатів відбувається їхня неповна перебудова з утворенням сполучної тканини [21–23]. Водночас ми встановили суттєву різницю між віковими групами на 14-ту добу: у 3-місячних щурів відносна площа алоімплантата виявилася більшою в 1,6 разу, ніж у 12-місячних. Відмінною рисою також була більша площа імплантата в молодших щурів на 14-ту добу, а у старших — на 28-му порівняно з групами щурів відповідного віку з використанням для пластики дефектів алоімплантатів без МСК.

Відносні площі сполучної тканини за умов використання алогенних кісткових імплантатів із МСК у тварин обох вікових груп були більшими, ніж у разі застосування алогенних кісткових імплантатів окремо. Це може бути пов'язано з імунною відповіддю на введення алогенних МСК, яка опосередкована функціонуванням Т- та В-лімфоцитів, що призводить до пригнічення формування кістки [24]. Окрім того, відомо, що введення МСК відразу після гострої травми спричинює пригнічення або зміну місцевих і системних відповідей (запальних реакцій) через вивільнення імуносупресивних чинників, таких як трансформувальний фактор росту  $\beta$ , простагландин Е2 та індолеамін-2,3-діоксигеназа 1 [25]. Також МСК секретують білок SDF-1 (stromal cell-derived factor), який впливає на неоагіогенез [26] та, разом з іншими цитокінами, змінює типи імунних клітин, які залучаються до місця ушкодження [25]. Зазначене може призвести як до стимуляції утворення кістки, так і власне сполучної тканини. У нашому дослідженні після

введення алоімплантатів разом із МСК відносна площа сполучної тканини в дефектах 3-місячних щурів на всі терміни експерименту була в середньому в 3 рази більшою порівняно з 12-місячними і суттєво перевищувала показники тварин 3-місячного віку з дефектами, заповненими лише алоімплантатами. У 12-місячних щурів величини відносної площі сполучної тканини в дефектах на 14-ту та 28-му доби після операції перевищували значення, отримані у тварин відповідного віку без використання МСК. Загальною рисою вікових груп було різке зниження площі сполучної тканини на 90-ту добу порівняно з іншими термінами, найбільш вагоме у 12-місячних щурів — у 8,9 рази порівняно з 14-ю добою. Є думка, що саме утворення сполучної тканини навколо імплантата перешкоджає його повній перебудові [27], та насправді, ми визначили наявність фрагментів алогенного матеріалу в дефектах щурів обох вікових груп на кінцевий термін спостереження.

Відносна площа новоутворених кісткових трабекул у 3-місячних щурів на 14-ту добу була нижчою в 1,6 разу, а на 90-ту — більшою у 2,3 разу, ніж у 12-місячних тварин. В останніх площа кісткової тканини досягла вищого показника на 14-ту добу і надалі значуще не змінювалася та не відрізнялася від групи цього віку без введення МСК. У 3-місячних щурів на 14-ту та 28-му доби показник був нижчим приблизно в 1,5 разу, а на 90-ту — більшим в 1,9 разу порівняно з групою цього віку без введення МСК.

Незважаючи на те, що МСК тривалий час досліджують і навіть використовують для покращення регенерації кісток, досі повністю не з'ясовано особливості їхнього впливу на цей процес. А саме, чи беруть участь МСК у морфогенезі під час регенерації або лише є джерелом факторів, які регулюють поведінку та функції інших клітин. У клінічних спостереженнях отримано обнадійливі результати. Показано, що введення аутологічних МСК кісткового мозку разом зі збагаченою тромбоцитами плазмою й алоімплантатом у місце перелому великогомілкової кістки дозволило скоротити термін загоєння перелому у два рази порівняно з групою пацієнтів без використання МСК (1,5 міс. проти 3) [28]. Експериментально доведено здатність МСК, отриманих із жирової тканини, формувати кісткову тканину в мишей у випадку їхнього використання в критичному дефекті черепа не гірше, ніж за умов введення індукованих в остеогенному напрямку МСК [29]. На щурах продемонстровано краще формування кісткової тканини в критичному

дефекті щурів після використання МСК разом із керамікою порівняно з групою без МСК [30]. Наші результати протилежні та ймовірно пов'язані з тим, що мікрооточення в ділянці травми стимулює диференціацію МСК у потрібному для регенерації перелому напрямі [31], але багато залежить від імунної реакції організму реципієнта, яка може призвести до їхньої загибелі [32] або надмірної запальної реакції.

Виходячи з отриманих нами результатів, введення алогенних МСК разом із алогенним кістковим імплантатом спричинює на 14-ту та 28-му доби після імплантації формування значних територій сполучної тканини незалежно від віку щурів. Разом із цим у 12-місячних щурів визначено стимуляцію формування кісткової тканини на ранній термін (14-а доба) порівняно з групою без використання МСК. У молодших щурів суттєвий приріст кісткової тканини встановлено лише на 90-ту добу, але площа сполучної тканини залишилася значуще вищою порівняно з групою цього віку без використання МСК. Усе зазначене може негативно позначитися на механічних властивостях кістки та спричинити повторні переломи. Тому вважаємо, що комбінацію алогенних МСК із алогенним кістковим імплантатом недоцільно використовувати на ранніх стадіях репаративного остеогенезу та без застосування остеоіндукції клітин під час культивування або імуносупресорів, особливо в молодих реципієнтів.

## Висновки

Установлено поступове зменшення відносно площі кісткового алоімплантата протягом експерименту (що свідчить про його перебудову) з утворенням сполучної та кісткової тканин у різних співвідношеннях на 14, 28 та 90-ту доби.

Відносні площі сполучної тканини за умов використання алогенних кісткових імплантатів і МСК у тварин обох вікових груп були більшими на 14 та 28-му доби, а у 3-місячних щурів — і на 90-ту, ніж у разі застосування алогенних кісткових імплантатів окремо.

Введення МСК разом із алотрансплантатом у випадках свіжих травматичних ушкоджень кісток спричинювало уповільнення кісткоутворення, особливо в реципієнтів молодшого віку: на 14-ту та 28-му доби показник був нижчим приблизно в 1,5 рази порівняно з групою цього віку без введення МСК.

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

## Список літератури

1. 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.
2. 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.jhssa.2008.04.031.
3. Age-related features of bone regeneration (literature review) / M. O. Korzh, P. M. Vorontsov, N. O. Ashukina, V. E. Maltseva // *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*. — 2021. — No. 3. — P. 92–100. — DOI: 10.15674/0030-59872021392-100. (in Ukrainian & English)
4. United Nations Department of Economic. World Population Ageing 2019. — 2020. — DOI: 10.18356/6a8968ef-en.
5. Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow / B. O. Zhou, R. Yue, M. M. Murphy [et al.] // *Cell stem cell*. — 2014. — Vol. 15 (2). — P. 154–168. — DOI: 10.1016/j.stem.2014.06.008.
6. Identification and characterization of an injury-induced skeletal progenitor / O. Marecic, R. Tevlin, A. McArdle [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2015. — Vol. 112 (32). — P. 9920–9925. — DOI: 10.1073/pnas.1513066112.
7. Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche / T. H. Ambrosi, O. Marecic, A. McArdle [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 597 (7875). — P. 256–262. — DOI: 10.1038/s41586-021-03795-7.
8. Adipocyte accumulation in the bone marrow during obesity and aging impairs stem cell-based hematopoietic and bone regeneration / T. H. Ambrosi, A. Scialdone, A. Graja [et al.] // *Cell stem cell*. — 2017. — Vol. 20 (6). — P. 771–784.e6. — DOI: 10.1016/j.stem.2017.02.009.
9. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing / H. Lin, J. Sohn, H. Shen [et al.] // *Biomaterials*. — 2019. — Vol. 203. — P. 96–110. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026.
10. Innovative methods for optimization of bone regeneration: mesenchymal bone cells (part 2) (literature review) / N. A. Korzh, P. M. Vorontsov, I. V. Vishnyakova, E. M. Samoilova // *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*. — 2018. — No. 1. — P. 105–116. — DOI: 10.15674/0030-598720181105-116. (in Russian)
11. Roberts T. T. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing / T. T. Roberts, A. J. Rosenbaum // *Organogenesis*. — 2012. — Vol. 8 (4). — P. 114–124. — DOI: 10.4161/org.23306.
12. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery / P. Baldwin, D. J. Li, D. A. Auston [et al.] // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2019. — Vol. 33 (4). — P. 203–213. — DOI: 10.1097/BOT.0000000000001420.
13. 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](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137). 21.
14. 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>.
15. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs / L. Poser, R. Matthys, P. Schawalder [et al.] // *BioMed Research*

- International. — 2014. — Vol. 2014. — Article ID: 348635. — DOI: 10.1155/2014/348635.
16. Local administration of aspirin with  $\beta$ -tricalcium phosphate/poly-lactic-co-glycolic acid ( $\beta$ -TCP/PLGA) could enhance osteoporotic bone regeneration / Z. S. Tao, X. J. Wu, W. S. Zhou [et al.] // *The Journal of Bone and Mineral Metabolism*. — 2019. — Vol. 37. — P. 1026–1035. — DOI: 10.1007/s00774-019-01008-w.
  17. Histological evidence concerning the osseointegration of titanium implants in the fractured rabbit femur / B. A. Bumbu, A. Bumbu, V. Rus [et al.] // *Journal of Histotechnology*. — 2016. — Vol. 39 (2). — P. 47–52. — DOI: 10.1080/01478885.2016.1144842.
  18. The impact of bioceramic scaffolds on bone regeneration in preclinical in vivo studies: a systematic review / G. Brunello, S. Panda, L. Schiavon [et al.] // *Materials (Basel, Switzerland)*. — 2020. — Vol. 13 (7). — Article ID : 1500. — DOI: 10.3390/ma13071500.
  19. Comparisons of efficacy between autograft and allograft on defect repair in vivo in normal and osteoporotic rats / C. H. Dreyer, M. Rasmussen, R. H. Pedersen [et al.] // *BioMed Research International*. — 2020. — Vol. 2020. — Article ID: 9358989. — DOI: 10.1155/2020/9358989.
  20. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats / U. Thormann, S. Ray, U. Sommer [et al.] // *Biomaterials*. — 2013. — Vol. 34. — P. 8589–8598. — DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.036.
  21. Structural bulk allografts in acetabular reconstruction: Analysis of two grafts retrieved at post-mortem / J. P. Hooten, C. A. Engh, R. D. Heekin, T. N. Vinh // *Journal of Bone and Joint Surgery — Series B*. — 1996. — DOI: 10.1302/0301-620x.78b2.0780270.
  22. Cellular mechanisms responsible for success and failure of bone substitute materials / T. Rolvien, M. Barbeck, S. Wenisch [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2018. — Vol. 19 (10). — DOI: 10.3390/ijms19102893.
  23. Incorporation of morselized bone grafts: A study of 24 acetabular biopsy specimens / S. Van Der Donk, P. Buma, T. J. J. H. Slooff [et al.] // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. — 2002. — No. 396. — P. 131–141. — DOI: 10.1097/00003086-200203000-00022.
  24. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats / A. Chatterjea, V. L. LaPointe, J. Alblas [et al.] // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. — 2014. — Vol 18 (1). — P. 134–142. — DOI: 10.1111/jcmm.12172.
  25. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration / W. L. Grayson, B. A. Bunnell, E. Martin [et al.] // *Nature reviews. Endocrinology* / — 2015. — Vol. 11 (3). — P. 140–150. — DOI: org/10.1038/nrendo.2014.234.
  26. SDF-1 secreted by mesenchymal stem cells promotes the migration of endothelial progenitor cells via CXCR4/PI3K/AKT pathway / X. Wang, H. Jiang, L. Guo [et al.] // *Journal of molecular histology*. — 2021. — Vol. 52 (6). — P. 1155–1164. — DOI: 10.1007/s10735-021-10008-y.
  27. Roberts T. T. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing / T. T. Roberts, A. J. Rosenbaum // *Organogenesis*. — 2012. — Vol. 8 (4). — P. 114–124. — DOI: 10.4161/org.23306.
  28. Stem cell-based therapy for prevention of delayed fracture union: a randomized and prospective preliminary study / M. Liebergall, J. Schroeder, R. Mosheiff [et al.] // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. — 2013. — Vol. 21 (8). — P. 1631–1638. — DOI: 10.1038/mt.2013.109.
  29. Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation *in vivo* / X. Li, J. Yao, L. Wu [et al.] // *Artificial organs*. — 2010. — Vol. 34 (1). — P. 46–54. — DOI: 10.1111/j.1525-1594.2009.00795.x.
  30. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells / S. P. Bruder, A. A. Kurth, M. Shea [et al.] // *Journal of orthopaedic research*. — 1998. — Vol. 16(2). — P. 155–162. — DOI: 10.1002/jor.1100160202.
  31. Osteogenic differentiation is synergistically influenced by osteoinductive treatment and direct cell-cell contact between murine osteoblasts and mesenchymal stem cells / M. T. Tsai, D. J. Lin, S. Huang [et al.] // *International orthopaedics*. — 2012. — Vol. 36 (1). — P. 199–205. — DOI: 10.1007/s00264-011-1259-x.
  32. Role of mesenchymal stem cells in bone fracture repair and regeneration. Chapter 7 / Yishan Chen, Junxin Lin, Yeke Yu, Xiaotian Du // *Mesenchymal Stem Cells in Human Health and Diseases* / Eds. Ahmed H. K. El-Hashash. — Academic Press, 2020. — P. 127–143. — DOI: 10.1016/B978-0-12-819713-4.00007-4.

Стаття надійшла до редакції 28.06.2022

## 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

N. O. Ashukina, P. M. Vorontsov, V. Ye. Maltseva, Z. M. Danyshchuk, O. A. Nikolchenko, K. M. Samoylova, V. S. Husak

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

- ✉ Nataliya Ashukina, MD, PhD in Biol. Sci.: natalya.ashukina@gmail.com
- ✉ Petro Vorontsov, MD, PhD in Traumatology and Orthopaedics: vorontsov64@ukr.net
- ✉ Valentyna Maltseva, MD, PhD in Biol. Sci.: maltseva.val.evg@gmail.com
- ✉ Zinaida Danyshchuk, MD: zinada1962@gmail.com
- ✉ Olga Nikolchenko, PhD in Biol. Sci.: o\_nicolchenko@ukr.net
- ✉ Kateryna Samoylova: samoylova\_e@ukr.net
- ✉ Valeriia Husak: husakvaleria@gmail.com