

УДК 616.718.4-003.93:[615.461:615.382]:616-092.9

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872023225-32>

## Гістологічна оцінка репаративного остеогенезу в дефектах стегнових кісток критичного розміру у щурів різного віку після пластики кістковими алоімплантатами, насиченими факторами росту плазми крові

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

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

*The increase in injuries and gunshot wounds because of the war in Ukraine makes it imperative to find methods for optimizing bone regeneration and filling large-size bone defects. Aim. Study morphological features of reparative osteogenesis when critical size femoral bone defects in rats in the early reproductive and mature stages are filled with allografts saturated with blood plasma growth factors (GF). Methods. Defects (3 × 3 mm) were created in the distal femoral metaphysis of 60 white laboratory rats, 3-months-old (n = 30) and 12-months-old (n = 30). The defects were filled with bone allografts saturated with GF in the two experimental groups (AlloG+GF), and unsaturated bone allografts in the two control groups (AlloG). All groups contained 15 rats of each age. At 14, 28 and 90 days after the surgery, 5 rats from each group were sacrificed, and histological analyses were performed. Results. In the AlloG groups, excessive formation of connective tissue was observed 14 and 28 days after the surgery, most evident in the 3-month-old rats. In the AlloG+GF groups, bone formation was delayed at 14 days independent of age, while at 28 and 90 days, the area of bone trabeculae did not differ from the values in the AlloG groups. Throughout the experiment, decreases in allograft area (almost all of it was replaced by bone after 90 days) and connective tissue (completely absent in 3-month-old rats after 90 days) were observed in both AlloG+GF groups. The area of bone trabeculae increased in the period from 14 to 28 days. Conclusion. Saturating allografts with blood plasma growth factors facilitates an increase in the rate at which allografts are replaced by bone tissue, independent of the recipient's age. However, excessive formation of connective tissues in the defect 14 and 28 days after the surgery, especially in 3-month-old rats, may negatively affect the mechanical properties of the bone, which should be considered in clinical practice. Key words. Bone regeneration, allograft, growth factors, modeling on animals, histology.*

*Збільшення кількості травм і вогнепальних поранень внаслідок війни в Україні обумовлює пошук шляхів оптимізації регенерації кістки та необхідність пластики великих за розмірами дефектів кісток. Мета. Вивчити морфологічні особливості репаративного остеогенезу в критичних дефектах стегнових кісток щурів репродуктивного раннього та зрілого пізнього вікових періодів за умов пластики алогенними кістковими імплантатами, насиченими факторами росту плазми крові (ФР). Методи. Використано 60 білих лабораторних щурів 3-місячного (n = 30) та 12-місячного (n = 30) віку, яким відтворювали дефект у дистальному метафізі стегнової кістки (3 × 3 мм). Дефект заповнювали: у дослідних групах (АлоІ+ФР) — кістковими алоімплантатами, насиченими ФР; у контрольних (АлоІ) — алоімплантатами. У кожній групі було по 15 тварин кожного віку. Через 14, 28 і 90 днів після втручання щурів виводили з експерименту, проводили гістологічний аналіз. Результати. У групах АлоІ виявлено надлишкове утворення сполучної тканини в ділянці дефекту через 14 і 28 днів після операції з більшим проявом у молодших щурів. У дослідних групах визначено затримку кісткоутворення на 14-ту добу не залежно від віку, а на 28-му і 90-му — показники відносної площі кісткових трабекул не відрізнялися від показників груп АлоІ. Упродовж експерименту у щурів обох вікових груп АлоІ+ФР зменшувалися відносні площі алоімплантата (процес його перебудови майже завершився на 90-ту добу) та сполучної тканини (до повної відсутності в 3-місячних щурів на 90-ту добу), а кісткових трабекул — збільшувалися (із 14-ї до 28-ї). Висновки. Насичення кісткових алоімплантатів факторами росту плазми крові сприяє швидкій їхній перебудові зі заміщенням на 90-ту добу кістковою тканиною пластинчастої структури незалежно від віку реципієнта. Проте надлишкове утворення сполучної тканини в ділянці дефекту через 14 і 28 днів, особливо в молодших тварин, може негативно позначитися на механічних властивостях кістки, що слід урахувати в клінічних умовах.*

**Ключові слова.** Регенерація кістки, алоімплантат, фактори росту, моделювання на тваринах, гістологія

## Вступ

Пошук шляхів оптимізації регенерації кістки зумовлений необхідністю пластики великих за розмірами дефектів кісток, які утворюються внаслідок травм, вогнепальних поранень, видалення пухлин кісток, у разі ревізійного ендопротезування, хірургічних утручань на хребті. Згідно з останніми публікаціями під час війни України з росією через застосуванням високоенергетичної зброї (балістична травма) серед постраждалих (і військових, і цивільних) збільшилася кількість осіб із переломами довгих кісток, ускладнених утворенням значних дефектів [1]. За інформацією ООН, на 15 серпня 2022 р. кількість поранених серед цивільних громадян становила 7 698 осіб, але реальна цифра ймовірно вища [2].

Для оптимізації процесу регенерації кістки використовують кістковий матеріал авто- та алогенного походження, який має остеоіндуктивні й остеоіндуктивні властивості. Оскільки використання кісткових автотрансплантатів обмежене через їхній незначний об'єм, невідповідну розмірам дефекту форму та необхідність додаткових хірургічних утручань, поширеною практикою є застосування для заповнення кісткових дефектів синтетичних або алокісткових імплантатів [3]. На жаль, останні частково втрачають остеоіндуктивні й остеоіндуктивні якості в процесі виготовлення, стерилізації та зберігання [4]. Проте вони забезпечують механічну міцність кістки в ділянці використання, що забезпечує раннє навантаження на оперовану ділянку скелета, та є матрицею для формування кісткової тканини. Підвищити остеоіндуктивні властивості алоімплантатів уявляється можливим шляхом їхнього насичення біологічними агентами, зокрема факторами росту.

Одним із перспективних підходів є застосування збагаченої тромбоцитами плазми або фібрину завдяки вмісту в них факторів росту (тромбоцитарного (PDGF), росту ендотелію судин (VEGF), трансформувального (TGF)), які сприяють прискоренню ангиогенезу [5], міграції та проліферації клітин [6] і, відповідно, регенерації кістки [7]. Рідка складова центрифугату крові, крім факторів росту, містить адгезивні білки (фібронектин і вітронектин), котрі підвищують біосумісність матеріалу [8]. До того ж нею легше, ніж фібрином, просочувати біоімплантати.

*Мета:* вивчити морфологічні особливості репаративного остеогенезу в критичних дефектах

стегнових кісток щурів репродуктивного раннього та зрілого пізнього вікових періодів за умов пластики алогенними кістковими імплантатами, насиченими факторами росту плазми крові.

## Матеріал і методи

Виконання дослідження ухвалено комітетом із біоетики при ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 191 від 22.04.2019) відповідно до 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).

### *Тварини*

У роботі використано 60 білих лабораторних щурів 3-місячного ( $n = 30$ ) та 12-місячного ( $n = 30$ ) віку, яким відтворювали дефект у метафізі стегнової кістки. Тварин розподілили на чотири групи залежно від віку та використаного для заповнення дефектів матеріалу:

– дослідні (групи Алоімплантат+ФР) — кістковий алоімплантат, насичений факторами росту плазми крові (ФР) (по 15 тварин кожного віку),

– контрольні (групи Алоімплантат) — кістковий алоімплантат (по 15 тварин кожного віку), гістологічні дослідження цієї групи опубліковані нами раніше [9].

Додатково використано 15 щурів 6-місячного віку як донорів для виготовлення алоімплантатів, 6 — для отримання факторів росту плазми крові.

### *Хірургічні втручання*

Операції виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистриження шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком Бетадин® передньо-латеральним 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 [10]. Раніше ми обґрунтували, що розмір такого дефекту для дистального метафіза стегнової кістки щура становить: діаметр дефекту 3 мм, глибина 3 мм [9]. Циліндричні кірково-губчасті алоімплантати відповідного розміру розміщували в ділянці дефекту щурів контрольних груп. У дослідних групах перед встановленням алоімплантати витримували впродовж 20 хв у 0,2 мл плазми крові з факторами

росту. Далі, після введення в порожнину дефекту алоімплантата, решту об'єму плазми крові вводили шприцом в імплантат і ділянку хірургічного втручання. Після місцевої обробки антибіотиком зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком.

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

#### *Виготовлення кісткових алоімплантатів*

Алоімплантати виготовляли з метафізів донорської стегнової або великогомілкової кісток 6-місячних щурів ( $n = 15$ ), які видаляли після введення летальної дози анестетика (тіопентал натрію 90 мг/кг внутрішньом'язово), відповідно до «Методики отримання кісткових алоімплантатів» (Остеоматрикс Ситенко алогенний («ОМС-А»), сертифікат відповідності № UA. TR. 101-21-2016). Стерилізацію алоімплантатів проводили з використанням радіаційного випромінювання в дозі від 15 до 25 кГр [9, 11].

#### *Отримання факторів росту плазми крові*

Виконували забір 8 мл венозної крові у вакуумну пробірку на 8,5 мл із антикоагулянтом. Вакуумну пробірку з кров'ю центрифугували у лабораторній клінічній центрифугі ОПн-3.02 «ДАСТАН» (ИЛГК.061214.009, ГОСТ 12.2.025-76) 1500 об/хв протягом 10 хв. Після закінчення маніпуляції пастерівськими піпетками надосадову фракцію прибирали, а залишену на дні пробірки плазму використовували для подальших досліджень.

#### *Гістологічні дослідження*

Після виведення тварин з експерименту виділені прооперовані стегнові кістки очищували від м'яких тканин і фіксували протягом 4 діб у 10 % нейтральному формаліні. Декальцинацію проводили у 5 % розчині трихлороцтової кислоти, промивали в етиловому спирті, вирізали метафізи з ділянкою дефекту, зневоднювали в ізопропіловому спирті. Просочували в суміші ізопропілового спирту та парафіну, потім — серії парафінів, заливали в парафін. Виготовлені гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином.

Структуру клітин і міжклітинної речовини в ділянці модельованого дефекту 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).

#### *Гістоморфометрія*

У ділянці дефекту вимірювали площі новоутворених кісткової та сполучної тканин та імплантатів (на 7 центральних зрізах у кожній тварини) з використан-

ням програмного забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013), потім розраховували їхній відносний вміст (%) від загальної площі дефекту.

#### *Статистичні методи*

Результати вимірювань наведені як середнє та стандартне відхилення. Нормальність розподілу перевіряли з використанням методу Колмогорова-Смірнова. Порівняння результатів виконували за методом t-критерій Стьюдента. Аналіз даних виконано за допомогою програми «IBM SPSS Statistics 20». Різницю вважали статистично значущою за умови якщо  $p < 0,05$ .

## **Результати**

#### *Після імплантації 14 діб*

У 3-місячних щурів групи Алоімплантат+ФР у ділянці дефекту виявлено кістковий імплантат у процесі перебудови, сполучну тканину, яка розміщувалася між його трабекулами та подекуди по ділянках його периметру, та новоутворену кісткову тканину грубоволокнистої структури (рис. 1, а).

У сполучній тканині спостерігали клітини остеобластичного та фібробластичного диферонів, судини капілярного типу, помірно заповнені еритроцитами. Щільність клітин була високою. Функціональну активність фібробластів відображала наявність у них гіпохромних ядер з ядерцями, розвинутої цитоплазми. У новоутворених кісткових трабекулах густина остеоцитів була значною. Навколо деяких із них не відмічено лакун, що дає змогу стверджувати про їхню участь у репаративному остеогенезі. По зовнішній поверхні новоутворених кісткових трабекул, а також місцями на поверхні алоімплантата (як зовнішній, так і внутрішній) розміщувалися функціонально активні остеобласти. Також на поверхні алоімплантата відмічали багатоядерні клітини чужорідних тіл типу остеокластів, які беруть участь у його перебудові.

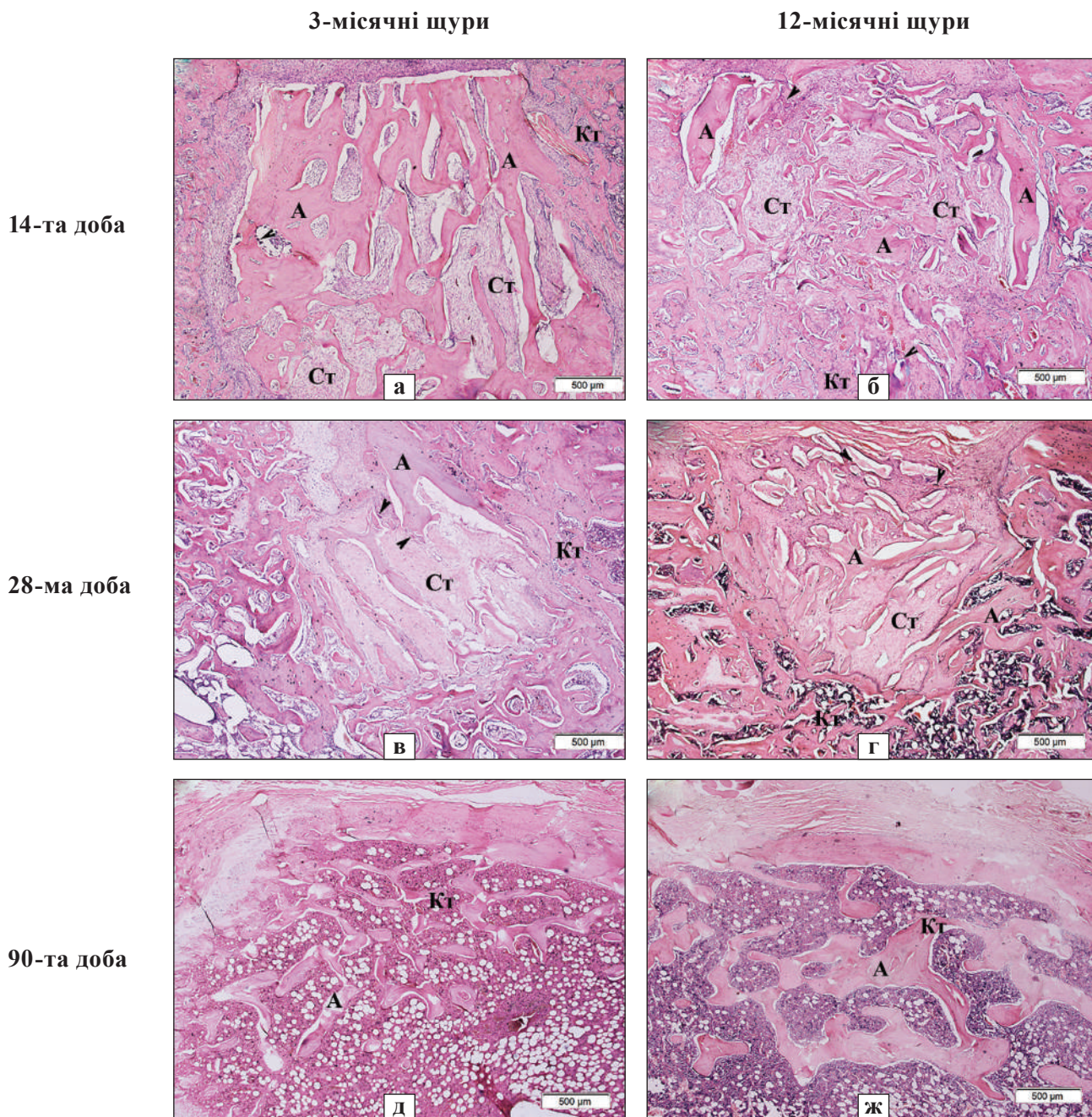
За результатами гістоморфометрії відносна площа сполучної тканини в зоні дефекту становила ( $28,51 \pm 8,83$ ) % і була більшою у 2,9 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткових трабекул ( $8,86 \pm 3,17$ ) % і кісткового мозку ( $43,33 \pm 9,80$ ) % — меншими у 2,1 разу ( $p < 0,001$ ) та 1,2 разу ( $p = 0,022$ ) відповідно порівняного з групою такого самого віку з алоімплантатом без ФР (група Алоімплантат). Водночас площа алоімплантата не відрізнялася (рис. 2).

У 12-місячних щурів групи Алоімплантат+ФР за вмістом зона дефекту не відрізнялася від щурів молодшої групи: у ній виявлено кістковий алоімплантат у процесі перебудови, сполучну та новоутворену кісткову тканини (рис. 1, б). Порівняно

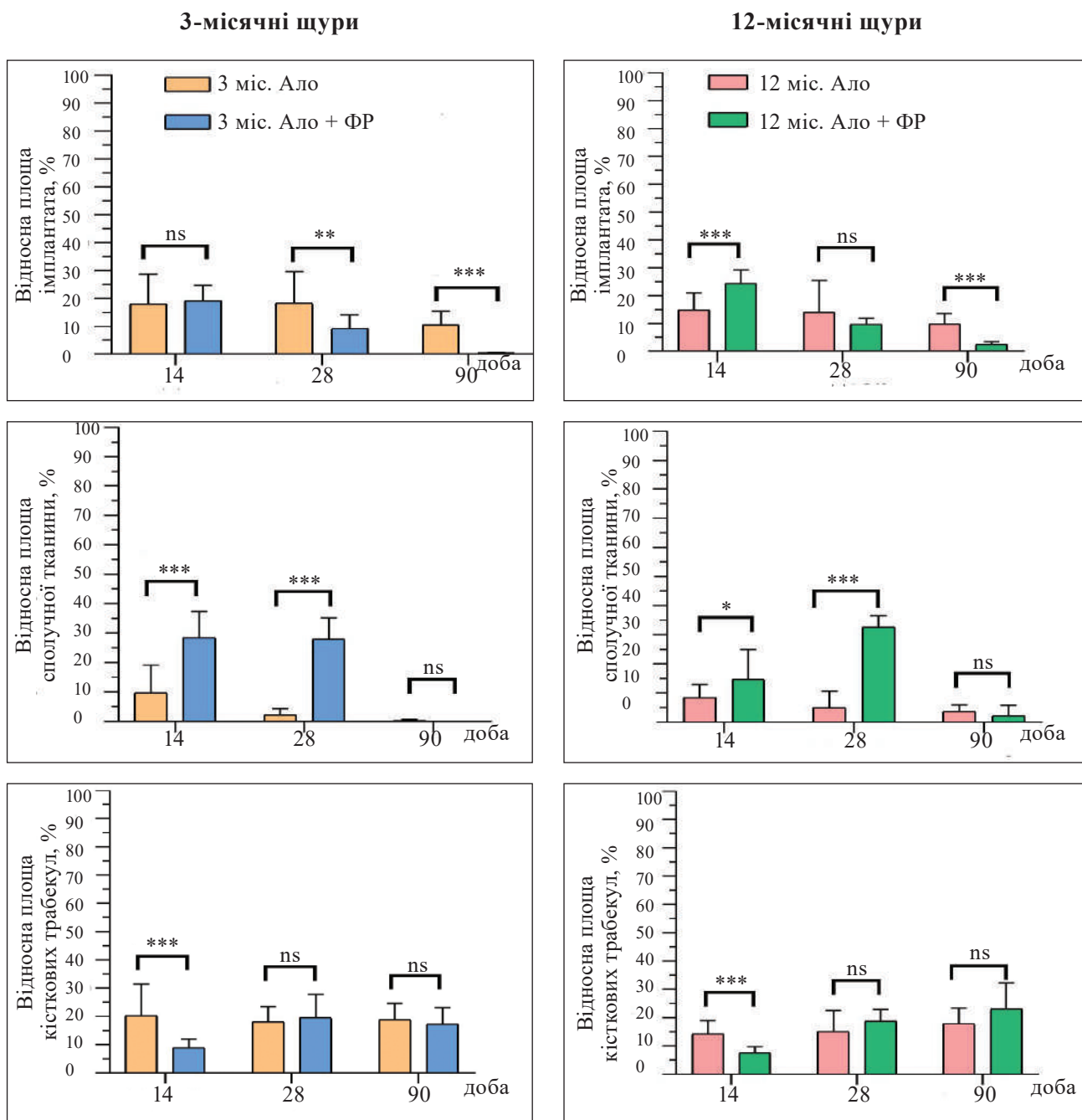
з 3-місячними щурами на цей термін відносна площа алоімплантата дорівнювала ( $24,36 \pm 4,83$ ) % і виявилася більшою в 1,3 разу ( $p = 0,003$ ), кісткового мозку ( $53,18 \pm 9,34$ ) % — в 1,2 разу ( $p = 0,002$ ), сполучної тканини ( $14,83 \pm 10,18$ ) % — меншою в 1,9 разу ( $p < 0,001$ ). Сполучна тканина розташовувалася в середині алоімплантата, між його трабекулами. Утворення кісткових трабекул, відносна площа яких не відрізнялася від показника 3-місячних тварин, зафіксовано з боку дефекту

і в губчастій кістці, і в кірковому шарі. Як і у молодших щурів, на окремих трабекулах алоімплантата виявлені остеокласти.

Так само як у 3-місячних щурів, у 12-місячних відносна площа сполучної тканини виявилася більшою в 1,8 разу ( $p = 0,014$ ), кісткових трабекул та кісткового мозку — меншою в 1,9 разу ( $p < 0,001$ ) та 1,2 разу ( $p < 0,001$ ) відповідно порівнянню з показниками групи Алоімплантат такого самого віку (рис. 2).



**Рис. 1.** Гістологічна картина ділянки дефекту в метафізі стегнової кістки 3-місячних (а, в, д) і 12-місячних (г, д, ж) щурів на 14, 28 та 90-ту доби після введення алоімплантата (А), насиченого факторами росту плазми крові. Показано фрагменти алоімплантата, території сполучної тканини (Ст), новоутворена кісткова тканина (Кт), багатоядерні клітини типу остеокластів (стрілки) на поверхні алогенного матеріалу. Гематоксилін та еозин



**Рис. 2.** Відносні площі алоімплантата і новоутворених тканин у ділянці критичного дефекту стегнової кістки щурів 3- та 12-місячного віку залежно від насичення факторами росту плазми крові (ФР) на 14, 28 та 90-ту доби 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 на кожен термін спостереження виконано за методом t-критерію Стьюдента

*Після імплантації 28 днів*

На цей термін спостереження у 3-місячних щурів дослідної групи в центральній ділянці дефекту розташовувалися фрагменти алоімплантата у вигляді тоненьких трабекул, між якими утворилася сполучна тканина різного ступеня зрілості. Решта частина дефекту, у тому числі й в кірковому шарі, була заповнена новоутвореними дрібнопетлястими кістковими

трабекулами з ретикуло-фіброзною тканиною та червоним кістковим мозком між ними (рис. 1, в). Порівняно з 14-ю добою спостереження відносна площа алоімплантата зменшилася у 2,1 разу ( $p < 0,001$ ) і становила ( $9,31 \pm 4,91$ ) %, а кісткових трабекул — збільшилася в 2,2 разу ( $p < 0,001$ ) і дорівнювала ( $19,50 \pm 8,30$ ) %, водночас площі сполучної тканини та кісткового мозку значуще не змінилися.

Порівняно з групою Алоімплантат такого самого віку на цей термін дослідження відносна площа алоімплантата виявилася меншою в 1,9 разу ( $p = 0,003$ ), кісткового мозку — в 1,4 разу ( $p < 0,001$ ) і становила ( $43,21 \pm 3,31$ ) %, сполучної тканини — більшою у 12,7 разу ( $p < 0,001$ ) і дорівнювала ( $27,98 \pm 7,23$ ) %, відносна площа кісткових трабекул — не відрізнялася (рис. 2).

У 12-місячних щурів дослідної групи гістологічна картина зони дефекту була аналогічною до описаної в 3-місячних тварин на цей термін (рис. 1, г). У ній виявлялися фрагменти алоімплантата, на деяких його трабекулах містилися остеобласти. Кісткова тканина формувалася з боку кісткового мозку та кортексу. Порівняно з попереднім терміном дослідження відносна площа алоімплантата зменшилася у 2,5 разу ( $p < 0,001$ ) і дорівнювала ( $9,67 \pm 2,23$ ) %, кісткового мозку ( $38,87 \pm 4,04$ ) % — в 1,4 разу ( $p < 0,001$ ), сполучної тканини ( $32,70 \pm 3,84$ ) %, навпаки, збільшилася — у 2,2 разу ( $p < 0,001$ ), кісткових трабекул ( $18,76 \pm 4,08$ ) % — у 2,5 разу ( $p < 0,001$ ). Порівняно з 3-місячними щурами на цей термін площа сполучної тканини була більшою в 1,2 разу ( $p = 0,013$ ), кісткового мозку — в 1,1 разу ( $p < 0,001$ ), інші показники не відрізнялися (рис. 2).

Порівняно з 12-місячними щурами групи Алоімплантат на цей термін спостереження відносна площа сполучної тканини виявилася більшою в 6,6 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткового мозку — меншою в 1,7 разу ( $p < 0,001$ ), проте і площа алоімплантата, і кісткових трабекул не відрізнялися (рис. 2).

#### *Після імплантації 90 діб*

У щурів обох вікових дослідних груп кістковий алоімплантат майже повністю замістився кістковою тканиною пластинчастої структури. Залишки алоімплантата виявлено серед перестроєваних кісткових трабекул (рис. 1, д, ж). Його відносна площа не перевищувала 1–3 % (3-місячні щури — ( $0,45 \pm 0,21$ ) %, 12-місячні — ( $2,56 \pm 0,88$ ) %) від загальної площі дефекту та зменшилася порівняно з 14-ю добою в 42,9 разу ( $p < 0,001$ ) і 9,6 разу ( $p < 0,001$ ) у молодших і старших тварин відповідно. При цьому показник площі алоімплантата в 12-місячних щурів був більшим за показник у 3-місячних у 5,7 разу ( $p < 0,001$ ). Травмований кірковий шар був відновлений у 3-місячних щурів до початкової структури, у 12-місячних у ньому відмічали невеличкі осередки сполучної тканини.

Порівняно з 14-ю добою спостереження відносна площа кісткових трабекул та кісткового мозку збільшилася в 3-місячних щурів в 1,9 разу ( $p < 0,001$ )

і становила ( $17,21 \pm 5,90$ ) % і ( $82,35 \pm 5,04$ ) % відповідно, у 12 місячних — у 3,0 разу ( $p < 0,001$ ) та 1,4 разу ( $p < 0,001$ ) і дорівнювала ( $23,01 \pm 9,32$ ) % і ( $72,17 \pm 11,07$ ) % відповідно. Сполучна тканина не виявлена в зоні дефекту 3-місячних щурів на цей термін, а у 12-місячних її площа хоча й зменшилася порівняно з 14-ю добою в 6,6 разу ( $p < 0,001$ ), а з 28-ю — в 14,5 разу ( $p < 0,001$ ), усе ще складала ( $2,26 \pm 3,62$ ) % від загальної площі дефекту.

Порівняно з групами відповідного віку з використанням для пластики дефекту алоімплантата без ФР у 3-місячних щурів відносна площа алоімплантата в зоні дефекту на 90-ту добу спостереження була меншою у 23,6 разу ( $p < 0,001$ ), а кісткового мозку — більшою в 1,2 разу ( $p < 0,001$ ), інші показники не відрізнялися. У 12-місячних щурів відносна площа алоімплантата була меншою в 3,9 разу ( $p < 0,001$ ), інші показники не відрізнялися (рис. 2).

### **Обговорення**

У поданому дослідженні, виконаному з використанням лабораторних щурів різного віку (3 і 12 місяців на початку експерименту), вивчено можливість покращити остеоіндуктивні й остеокондуктивні властивості структурних алогенних кісткових імплантатів, стерилізованих за допомогою  $\gamma$ -випромінювання, шляхом насичення факторами росту плазми крові. Через збільшення внаслідок військових конфліктів (зокрема, повномасштабної війни між росією та Україною [1]) постраждалих із великими дефектами кісток, які не загоюються самостійно, за модель ми обрали дефекти критичного розміру (глибина 3 мм, діаметр 3 мм) у дистальному метафізі стегнової кістки [9].

Кісткові алоімплантати використовують для біорекострукції великих дефектів кісток після травм, видалення пухлин, під час операцій на хребті й ендопротезування великих суглобів тощо. Вони мають переваги перед автотрансплантатами, оскільки їхнє отримання не потребує виконання додаткового хірургічного втручання та запобігає проблеми з донорською ділянкою [12, 13]. Головним недоліком кісткових алоімплантатів називають низькі остеоіндуктивні та міцнісні якості внаслідок оброблення після отримання від донора — заморожування, висушування або оброблення розчином на основі гліцерину [14, 15]. Негативно впливає на міцність алоімплантата й  $\gamma$ -випромінювання [16], що пов'язують із руйнуванням молекулярної структури колагену [17], яке позначається й на остеоіндуктивних властивостях.

Отже, становить інтерес не лише розроблення методів консервування, оброблення та стерилізації алоімплантатів, а й пошук шляхів покращення їхніх остеокондуктивних та остеоіндуктивних якостей. За для цього ми використали фактори росту плазми крові, отримані шляхом центрифугування крові за 1500 об/хв, якими насичували алоімплантат перед встановленням у порожнині дефекту і після додатково вводили в ділянку травматичного ушкодження. Уважають, що використання саме рідкої складової центрифугату крові (отримують шляхом центрифугування крові без антикоагулянту в нескляній пробірці за приблизно від 1300 до 2400 об/хв [18, 19]) дає змогу просочувати біоімплантати. До того ж, вона містить, крім факторів росту, білки фібронектин і вітронектин, які підвищують біосумісність матеріалу [8]. Визначено, що отримані в такий спосіб фактори росту чинять вплив на проліферацію та диференціацію фібробластів ясен та остеобластів [20, 21], а їхнє поєднання з алогенним матеріалом *in vitro* збільшує життєздатність, міграцію та проліферацію остеобластів людини [22].

У нашому дослідженні у щурів обох вікових дослідних груп (дефект заповнений алоімплантатом, насиченим факторами росту плазми крові) порівняно з серією експерименту, де за остеопластичний матеріал використано алоімплантат без факторів росту, визначено надлишкове утворення сполучної тканини в ділянці дефекту через 14 і 28 діб після операції з більшим проявом у 3-місячних щурів. Імовірно, це обумовлено високим вмістом інтерлейкінів (ІЛ): ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10 у використаному центрифугату крові, зокрема ІЛ-4, який впливає на диференціацію та міграцію фібробластів [23]. При цьому затримку кісткоутворення виявлено в щурів обох вікових груп лише на 14-ту добу, а на 28-му і 90-ту — показники відносної площі кісткових трабекул не відрізнялися від показників групи Алоімплантат [9]. Протягом експерименту у щурів обох вікових груп відносна площа алоімплантата зменшувалася і процес його перебудови, на відміну від груп Алоімплантат [9], майже завершився на 90-ту добу. Також із плином часу (із 28-ї до 90-ї доби) зменшувалася відносна площа сполучної тканини (до повної відсутності в 3-місячних щурів на 90-ту добу), а кісткових трабекул (із 14-ї до 28-ї) та кісткового мозку (із 28-ї до 90-ї) — збільшувалася. Анатомічна будова стегнових кісток відповідала нормальній в усіх випадках.

Отже, на підставі проведеного гістологічного дослідження визначено, що насичення алоімплан-

тата факторами росту, отриманими шляхом центрифугування крові за 1500 об/хв, сприяє скорішій його перебудові зі заміщенням на 90-ту добу кістковою тканиною пластинчастої структури незалежно від віку реципієнта. Проте слід урахувати в клінічних умовах надлишкове утворення сполучної тканини в ділянці дефекту через 14 і 28 діб (особливо в реципієнтів молодшого віку), що може негативно позначитися на механічних властивостях кістки й обмежити навантаження на неї.

## Висновки

Насичення кісткових алоімплантатів факторами росту плазми крові сприяє скорішій їхній перебудові (порівняно з серією експерименту, де за остеопластичний матеріал використано лише алоімплантат) зі заміщенням на 90-ту добу кістковою тканиною пластинчастої структури незалежно від віку реципієнта. Проте надлишкове утворення сполучної тканини в ділянці дефекту через 14 і 28 діб (з найбільшим проявом у молодших тварин) може негативно позначитися на механічних властивостях кістки, що слід урахувати в клінічних умовах.

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

## Список літератури

1. Kazmirchuk, A., Yarmoliuk, Y., Lurin, I., Gybalo, R., Buriyanov, O., Derkach, S., & Karpenko, K. (2022). Ukraine's Experience with Management of Combat Casualties Using NATO's Four-Tier "Changing as Needed" Healthcare System. *World Journal of Surgery*, 46(12), 2858–2862. <https://doi.org/10.1007/s00268-022-06718-3>
2. Holt, E. (2022). Ukraine invasion: 6 months on. *Lancet (London, England)*, 400(10353), 649–650. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01635-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01635-X)
3. Nappe, C. E., Rezuc, A. B., Montecinos, A., Donoso, F. A., Vergara, A. J., & Martinez, B. (2016). Histological comparison of an allograft, a xenograft and alloplastic graft as bone substitute materials. *Journal of Osseointegration*, 8(2), 20–26. <https://doi.org/10.23805/jo.2016.08.02.02>
4. Sohn, H. S., & Oh, J. K. (2019). Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials Research*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0157-y>
5. Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*, 91, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.06.013>
6. Crane, J. L., & Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 466–472. <https://doi.org/10.1172/JCI70050>
7. Popsuishapka, K., Ashukina, N., & Radchenko, V. (2017). Determination of the role of fibrin-enriched platelets in the process of regenerating the defect of the vertebral body (experimental study). *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*, 3, 32–38. <https://doi.org/10.15674/0030-59872017332-38>
8. Serafini, G., Lopreiato, M., Lollobrigida, M., Lamazza, L., Mazzucchi, G., Fortunato, L., Mariano, A., Scotto d'Abus-

- co, A., Fontana, M., & De Biase, A. (2020). Platelet Rich Fibrin (PRF) and Its Related Products: Biomolecular Characterization of the Liquid Fibrinogen. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 1099. <https://doi.org/10.3390/jcm9041099>
9. Ashukina, N., Maltseva, V., Vorontsov, P., Danyschuk, Z., Nikolchenko, O., & Korzh, M. (2022). Histological evaluation of the incorporation and remodeling of structural allografts in critical size metaphyseal femur defects in rats of different ages. *Romanian Journal of Morphology and Embryology=Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 63(2), 349-356. <https://doi.org/10.47162/RJME.63.2.y>
  10. 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. <https://doi.org/10.1155/2014/348635>
  11. Korzh, M. O., Vyrva, O. Y., Vorontsov, P. M., Khmyzov, S. O., Serbin, M.Y., Timchenko, D. S., Kuryata, O. P., & Maksymenko, O. M. (2015). *Method for producing biomaterials from bone tissue*. Ukrainian patent № 108813. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=213067&chapter=biblio>
  12. Golovina, Ya. O. (2022). A systematic approach to the surgical treatment of patients with long bone tumors using bone segmental alloimplants. *Orthopaedics, traumatology and prosthetics*, (1-2), 26-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-598720221-2226-33>
  13. 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>
  14. Samsell, B., Softic, D., Qin, X., McLean, J., Sohoni, P., Gonzales, K., & Moore, M. A. (2019). Preservation of allograft bone using a glycerol solution: A compilation of original preclinical research. *Biomaterials Research*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0154-1>
  15. Graham, R. S., Samsell, B. J., Proffer, A., Moore, M. A., Vega, R. A., Sary, J. M., & Mathern, B. (2015). Evaluation of glycerol-preserved bone allografts in cervical spine fusion: A prospective, randomized controlled trial. *Journal of Neurosurgery: Spine*, 22(1), 1-10. <https://doi.org/10.3171/2014.9.SPINE131005>
  16. Nguyen, H., Morgan, D. A. F., & Forwood, M. R. (2007). Sterilization of allograft bone: Effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell and Tissue Banking*, 8(2), 93-105. <https://doi.org/10.1007/s10561-006-9020-1>
  17. Pendleton, M. M., Emerzian, S. R., Liu, J., Tang, S. Y., O'Connell, G. D., Alwood, J. S., & Keaveny, T. M. (2019). Effects of ex vivo ionizing radiation on collagen structure and whole-bone mechanical properties of mouse vertebrae. *Bone*, 128. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115043>
  18. Miron, R. J., Xu, H., Chai, J., Wang, J., Zheng, S., Feng, M., Zhang, X., Wei, Y., Chen, Y., Mourão, C. F. de A. B., Sculean, A., & Zhang, Y. (2020). Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clinical Oral Investigations*, 24(3), 1171-1182. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02981-2>
  19. El Bagdadi, K., Kubesch, A., Yu, X., Al-Maawi, S., Orłowska, A., Dias, A., Booms, P., Dohle, E., Sader, R., Kirkpatrick, C. J., Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2019). Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 45(3), 467-479. <https://doi.org/10.1007/s00068-017-0785-7>
  20. Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224-247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
  21. Sumida, R., Maeda, T., Kawahara, I., Yusa, J., & Kato, Y. (2019). Platelet rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor κB ligand ratio in osteoblasts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7560>
  22. Kyyak, S., Blatt, S., Pabst, A., Thiem, D., Al-Nawas, B., & Kämmerer, P. W. (2020). Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin – A comparative in vitro study. *Journal of Biomaterials Applications*, 35(1), 83-96. <https://doi.org/10.1177/0885328220914407>
  23. Serezani, A. P. M., Bozdogan, G., Sehra, S., Walsh, D., Krishnamurthy, P., Sierra Potchanant, E. A., Nalepa, G., Goenka, S., Turner, M. J., Spandau, D. F., & Kaplan, M. H. (2017). IL-4 impairs wound healing potential in the skin by repressing fibronectin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1), 142-151.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.012>

Стаття надійшла до редакції 22.05.2023

## HISTOLOGICAL EVALUATION OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN CRITICAL SIZE FEMORAL BONE DEFECTS IN RATS OF DIFFERENT AGES AFTER INTRODUCTION OF ALLOGRAFTS SATURATED WITH BLOOD PLASMA GROWTH FACTORS

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

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

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