

УДК 616.718.4-001.5-007.23-092.9-085:615.382](045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872026161-69>

Стимуляція періостального кісткоутворення збагаченою тромбоцитами плазмою крові в моделі атрофічного незрощення перелому стегнової кістки щурів

П. М. Воронцов, В. Є. Мальцева, З. М. Данищук,
О. А. Нікольченко, В. В. Ковтун, С. І. Лапонін

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

Objective. To investigate the effect of local injection of platelet-rich plasma (PRP) on periosteal bone formation in a rat model of femoral atrophic non-union. **Methods.** The study was conducted on 11 rats. Atrophic non-union was modelled by performing a mid-shaft femoral osteotomy with intramedullary Kirschner wire fixation, followed by periosteal stripping (2 mm) at both ends of the osteotomized bone and their separation with a silicone spacer. On day 7 post-surgery, 5 animals received a local PRP injection into the injury zone. Radiography was performed at weeks 2 and 4. After 8 weeks, euthanasia was performed, and the operated femurs were harvested for histological analysis. **Results.** In the atrophic non-union model, a loose connective tissue capsule of varying thickness without signs of inflammation was found around the spacer in all rats. Acellular areas were identified within the cortex. The structure of the periosteum and endosteum near the osteotomy site was disrupted. In 5 out of 6 animals, no signs of bone formation were observed near the spacer from either the periosteal or endosteal zones. Following PRP injection, a higher density of capillary-type vessels was observed within the capsule. Areas of cartilage with hypertrophic chondrocytes were identified, indicating endochondral ossification. In 4 rats, formed bone tissue was recorded on the fragments, predominantly on one side, in both periosteal and endosteal zones. The bone tissue was cancellous in the periosteal zone and woven bone in the endosteal zone. **Conclusion.** Local PRP injection into the injury zone on day 7 in a rat model of femoral atrophic non-union with previously disrupted periosteum positively affects periosteal bone formation at the fragment ends. **Keywords:** rat, atrophic non-union, femoral fracture, platelet-rich plasma (PRP), periosteal bone formation, histology, endochondral ossification.

Мета. Вивчити вплив локального введення збагаченої тромбоцитами плазми на періостальне кісткоутворення в моделі атрофічного незрощення перелому стегнової кістки щурів. **Методи.** Дослідження проведено з використанням 11 щурів, яким змодельовали стан атрофічного незрощення перелому шляхом виконання остеотомії в середній третині стегнової кістки з інтрамедулярною фіксацією спицею Кіршнера, руйнування періосту (2 мм) обох країв остеотомованої кістки та відокремлення їх силіконовим спейсером. На 7 добу 5 тваринам після втручання локально вводили PRP у зону ушкодження. Рентгенографію виконували на 2 та 4 тижень. Через 8 тижнів після операції здійснили евтаназію та вилучили оперовану стегнову кістку для гістологічного аналізу. **Результати.** У моделі атрофічного незрощення у всіх щурів навколо спейсера виявлено сполучнотканинну капсулу різної товщини без ознак запалення. У кортексі визначали безклітинні ділянки. Структура періосту й ендосту поблизу зони остеотомії — зруйнована. У 5 з 6 тварин не виявили жодних ознак кісткоутворення поблизу місця розміщення спейсера як з боку періосту, так і ендосту. У разі введення PRP у сполучнотканинній капсулі густіше розміщувалися судини капілярного типу. Визначено ділянки хрящової тканини з гіпертрофованими хондроцитами, що свідчить про процес енхондральної осифікації. У 4 щурів зафіксовано сформовану кісткову тканину на уламках, переважно на одному як у періостальній, так і в ендостальній зонах. Кісткова тканина — губчаста в періостальній зоні та грубоволокниста — в ендостальній. **Висновок.** Введення PRP в зону ушкодження на 7-му добу в моделі атрофічного незрощення перелому з попередньо зруйнованим періостом стегнової кістки щурів позитивно впливає на періостальне кісткоутворення на краях уламків.

Ключові слова. Щур, атрофічне незрощення, перелом стегнової кістки, збагачена тромбоцитами плазма (PRP), періостальне кісткоутворення, гістологія, енхондральна осифікація

Вступ

Незрощення або уповільнене зрощення переломів довгих кісток є одним із серйозних ускладнень, яке призводить до втрати функціональності кінцівок пацієнтів та/або погіршує якість їхнього життя. Причинами, які це викликають вважають наявність дефектів кістки, остеомієліт, високоенергетичні травми, порушення механізмів регенерації кістки, системні захворювання такі як діабет та ін. [1], а також лікування перелому за допомогою металевого фіксатора [2]. Здебільшого виникають незрощення переломів плечової кістки (10–15 %), та стегнової або великогомілкової (до 12,5 %) [2]. В Україні внаслідок воєнних дій частота високоенергетичних травм, які супроводжуються переломами довгих кісток та їхніми дефектами [3, 4], суттєво зросла, через що в майбутньому слід очікувати збільшення відсотка незрощень серед постраждалих.

Головним завданням у разі лікування атрофічних незрощень переломів є досягнення стабільної фіксації, видалення рубцевих тканин, які перешкоджають зрощенню та заміщення утвореного дефекту кістковим ауто- або алотрансплантатом [5]. Крім того набуває розвитку використання під час хірургічного втручання різних посилювачів росту судин і диференціації клітин в остеогенному напрямі. До таких ортобіологічних методів відноситься використання збагаченої тромбоцитами плазми (PRP), аутологічних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку (МСК), кісткових морфогенетичних білків (BMP) [1, 5] або їх комбінацій [6]. Метою використання цих методів є прискорення зрощення перелому, проте ефективність їхнього застосування все ще досліджується як клінічно, так і експериментально. Зокрема через відсутність клінічних досліджень I рівня доказовості [5].

Збагачена тромбоцитами плазма містить у собі тромбоцити, з яких вивільняється декілька факторів росту (тромбоцитарний (PDGF), трансформувальний (TGF- β) та інсуліноподібний (IGF-1), які позитивно впливають на васкуляризацію в зоні незрощення, а потім стимулюють диференціацію MSC у потрібному для загоєння перелому напрямі [7]. Періост відіграє ключову роль у репаративному остеогенезі через вміст остеогенних клітин-попередників і велику кількість судин у своїй структурі. Порушення його будови та біологічної активності розглядається як один із чинників формування атрофічних незрощень [8]. Фактори росту, які містяться у PRP, потенційно

здатні стимулювати клітинну активність періосту, ангиогенез та відновлення його остеогенного потенціалу, про що свідчать результати дослідження, де поєднують стовбурові клітини окістя та PRP для стимуляції регенерації кістки [10]. Проте невідомі точні механізми дії PRP у випадку незрощень переломів і нез'ясованим залишається питання терміну введення [9]. У недавньому системному огляді, де узагальнили результати 24 клінічних досліджень з оглядом на молекулярні та біологічні порушення в регенераті пацієнтів із незрощеннями, виявлено, що в цьому випадку спостерігається пригнічення експресії BMP-7 [11]. Цей білок належить до надродини TGF- β та індукує диференціацію MSC в остеобласти [12]. Також до розвитку незрощення переломів ймовірно залучені сигнальні шляхи BMP і матриксні металопротеїнази [11]. На тканинному рівні через асептичне атрофічне незрощення виникають порушення, механізми розвитку яких також майже не досліджені. Однією з основних відмінностей атрофічного незрощення від гіпертрофічного є загибель клітин у кортексі уламків у зоні незрощення [11]. Тому вплив на MSC, попередників остеобластів, для подальшого формування кісткової тканини та на появу моноцитів, попередників остеокластів, для резорбції материнської кіркової кістки в періостальній зоні може бути перспективним напрямом лікування незрощень. Він може потенційно забезпечити використання ортобіологічних методів, а саме PRP.

Мета: вивчити вплив локального введення збагаченої тромбоцитами плазми на періостальне кісткоутворення в моделі атрофічного незрощення перелому стегнової кістки щурів.

Матеріал і методи

Експериментальні 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 (1986) [13, 14]. План експериментальних досліджень ухвалено комітетом із біоетики при ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 224 від 13.06.2022 р.).

У роботі використано 11 самців білих щурів 6-місячного віку (маса тіла від 325 до 550 г) популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

Усім тваринам змодельовано стан атрофічного незрощення перелому шляхом виконання остеотомії в середній третині стегнової кістки з інтрамедулярною фіксацією спицею Кіршнера, руйнування періосту (2 мм) обох країв остеотомованої кістки за допомогою електрокоагулятора та відокремлення їх силіконовим спейсером. Щурів розподілили на дві групи порівню: 1 — модель атрофічного незрощення перелому ($n = 6$); 2 — модель із локальним введенням PRP у зону ушкодження на 7 добу після втручання ($n = 5$).

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після гоління правого стегна й оброблення ділянки антисептичним засобом Бетадин щурам через латеральний доступ виконали остеотомію середньої третини стегнової кістки за допомогою циркулярної фрези (рис. 1, а). Після цього проводили струминне промивання ділянки хірургічного втручання антисептичним засобом Декасан. Для руйнування періосту обох країв остеотомованої кістки виконували його коагуляцію на 2 мм дистальніше та проксимальніше зони остеотомії за допомогою височастотного генератора електрохірургічного уніполярного HF-1760 Model DTC-03 (рис. 1, б). Потім розводили уламки стегнової кістки, один кінець спиці Кіршнера вводили в кістково-мозковий канал дистального уламку, потім на спицю надягали силіконовий спейсер (діаметр 7 мм) через попередньо зроблений для цього отвір по центру. Далі, розтягуючи м'язи кінцівки, вводили інший кінець спиці в кістково-мозковий канал проксимально уламку і зближали обидві частини остеотомованої кістки зі силіконовим спейсером між ними (рис. 1, в, г).

Спиці Кіршнера були завдовжки від 17 до 22 мм з діаметром 1,5 та 2,0 мм, їх добір виконували під час втручання відповідно до індивідуального розміру та форми каналу кістки тварини (рис. 1, а). Рани обробляли антибіотиком Біцилін, пошарово зашивали м'язи та шкірну рану одинарними вузловими швами (шовний матеріал МЕФІЛ № 2). Шкіру в зоні хірургічного втручання обробляли антисептичним засобом Бетадин.

Через 7 діб після операції 6 щурам ін'єкційно ввели в зону ушкодження 0,3 мл PRP. Цей термін було обрано враховуючи стадійність процесу репаративного остеогенезу, згідно з якою перша — травматичне запалення (тривалість складає приблизно 7 діб) [15]. Через те, що введення PRP може посилювати запалення, ми обрали термін введення після завершення стадії запалення. Крім того, в попередньому дослідженні ми показали, що введення PRP на 7 добу після імплантації кісткового алоїмплантата в дефект критичного розміру стегнової кістки щурів сприяє перебудові імплантата зі заміщенням кісткової тканини в щурів старшого віку, у яких пригнічено кісткоутворення [16]. Для отримання PRP у двох тварин-донорів виконали забір 8 мл венозної крові у вакуумну пробірку на 8,5 мл із антикоагулянтном. Отримані зразки крові центрифугували 10 хв у лабораторній клінічній центрифугі ОПН-3.02 «ДАСТАН» за 1500 об/хв, після цього автоматичним піпет-дозатором зі стерильним накопичувачем відбирали плазму.

Через 4 тижні після хірургічного втручання всіх щурів виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом для гістологічного та біохімічного досліджень. Спосіб евтаназії обумовлений необхідністю отримання крові для біохімічного вивчення.

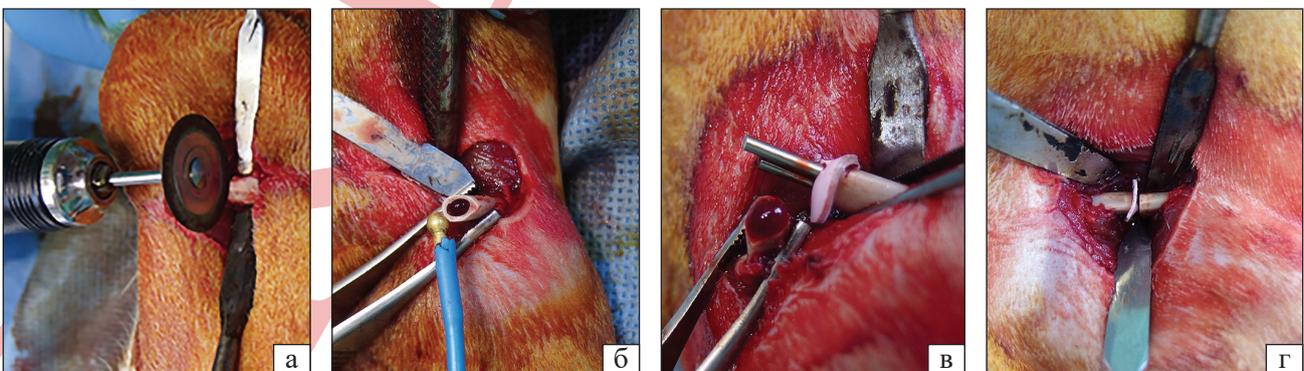


Рис. 1. Етапи проведення хірургічного втручання для моделювання атрофічного незрощення перелому стегнової кістки щурів: а) виконання остеотомії стегнової кістки за допомогою циркулярної фрези; б) руйнування періосту одного з уламків кістки за допомогою коагулятора; в) введення іншого кінця спиці Кіршнера з надітим силіконовим спейсером у проксимальний уламок кістки; г) зведені уламки зі спейсером між ними

Рентгенологічне обстеження проводили всім щурам через 2 та 4 тижні після втручання. Дослідження виконували під загальною анестезією (кетамін 50 мг/кг живої маси, в/м). Цифрові рентгенограми отримували з використанням рентгенологічної діагностичної системи OPERA T90сех.

Для гістологічного дослідження в тварин після декапітації виділяли прооперовані стегнові кістки, очищували від м'яких тканин і фіксували протягом 4-х діб у 10 % нейтральному формаліні. Після промивання проточною водою стегнові кістки декальцинували у 5 % розчині мурашиної кислоти 5 діб і переносили у 70° етиловий спирт. Із кісток видаляли спиці Кіршнера, вирізали фрагмент діяфіза з ділянкою остеотомії. Отримані зразки зневоднювали в ізопропіловому спирті зростаючої концентрації. Просочували в суміші ізопропілового спирту та парафіну, потім — серії парафінів, заливали в парафін. Поздовжні зрізи виготовляли на санному мікротомі Reichert, забарвлювали гематоксиліном і еозином. Аналіз структури клітин і міжклітинної речовини в ділянці остеотомії та навколо неї проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus VX63. Для фотографування використано цифрову камеру DP73 Olympus і програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1».

Статистичний аналіз

Для перевірки впливу PRP на періостальне кісткоутворення використовували дані кожного щура, які класифікували як «кісткоутворення наявне» або «кісткоутворення відсутнє», і результати порівнювали між групами зі застосуванням критерію χ^2 для категоріальних даних. Різницю між групами вважали значущою за умови, якщо $p < 0,05$. Для підрахунку використовували SPSS Statistic.

Результати

Рентгенографічний аналіз. Після моделювання атрофічного незрощення на рентгенограмах усіх щурів з/без введенням збагаченої тромбоцитами плазми на 7 добу положення інтрамедулярного фіксатора (спиці Кіршнера) через 2 тижні було коректним і забезпечувало відновлення осі правої кінцівки, кісткові уламки адаптовані; між ними визначали діастаз, де був розміщений рентгенологічно прозорий силіконовий спейсер (рис. 2, а, б). У щурів моделі незрощення перелому через 4 тижні не виявлено значущих змін порівняно з попереднім терміном спостереження (рис. 2, б), а у разі застосування збагаченої тромбоцитами плазми зафіксовано періостальний регенерат переважно в одному з уламків кістки (рис. 3, г).

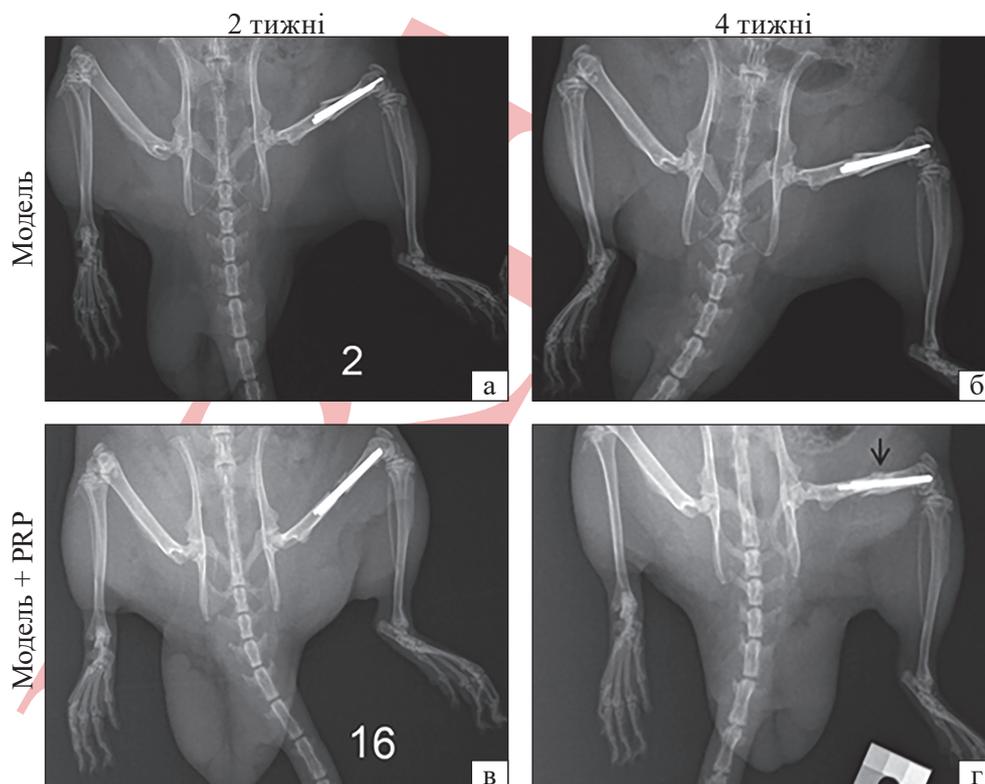


Рис. 2. Рентгенограми щурів з атрофічним незрощенням стегнової кістки з/без введенням PRP на 7 добу через 2 та 4 тижні після хірургічного втручання. Спиці Кіршнера розташовані в кістково-мозковому каналі через 2 тижні (а, в). Модель: Відсутність ознак формування регенерату в зоні остеотомії через 4 тижні (б). Модель+PRP: Періостальний регенерат у дистальному уламку кістки через 4 тижні (г)

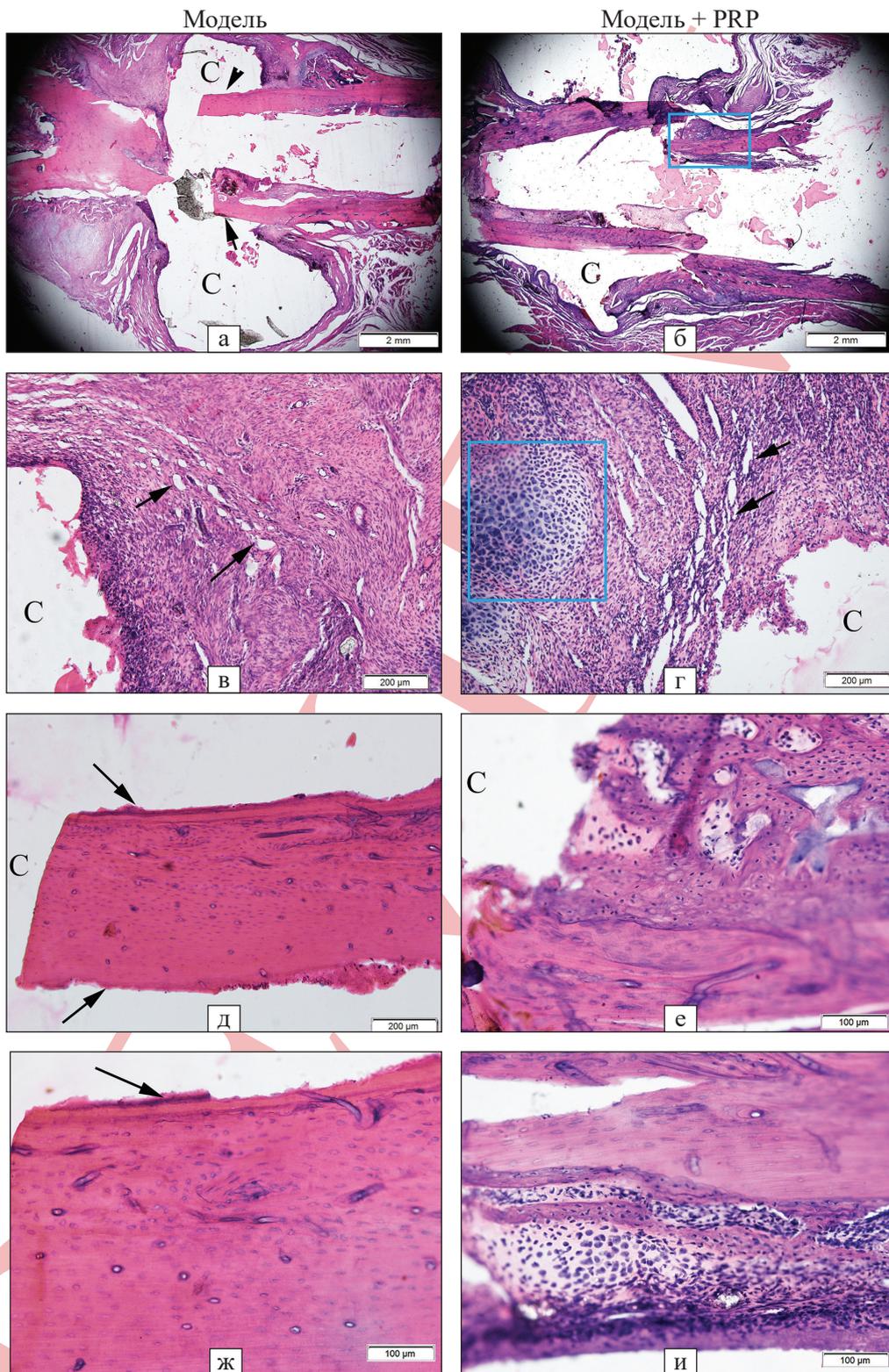


Рис. 3. Ділянки перелому через 4 тижні після остеотомії стегнової кістки шурів із інтрамедулярною фіксацією спицею Кіршнера, відокремленням остеотомованих фрагментів кістки силіконовим спейсером (С) та коагуляцією періосту з/без введенням PRP на 7 добу. Порожнина від спейсера оточена сполучнотканинною капсулою різної ширини (а, б). Модель незрощення (а, в, д, ж): Фрагменти сполучнотканинної капсули, яка оточувала силіконовий спейсер із судинами капілярного типу (стрілки) у товщі капсули (в). Кінці уламків остеотомованої стегнової кістки шурів зі зруйнованим періостом (д). Відсутність новоутворених тканин у періостальній й ендостальній зонах (стрілка) (д). Пусті лакуни без остеоцитів у кірковому матриксі (ж). Модель+PRP (б, г, е, и): Капсула з ознаками енхондральної осифікації (г). Періостальний та ендостальний регенерат на одному з уламків кістки (б). Новосформовані трабекули губчастої кісткової тканини в періостальній зоні (е). Грубоволокниста кісткова тканина в ендостальній зоні (и). Відсутність остеоцитів у лакунах у кістковому матриксі (е, и). Гематоксилін та еозин

Гістологічний аналіз. Модель атрофічного незрощення стегнової кістки. Через 4 тижні після виконання остеотомії на рівні середньої третини діафіза стегнової кістки, інтрамедулярної фіксації за допомогою спиці Кіршнера та встановленням між уламками кістки силіконового спейсера, мікроскопічно досліджувана ділянка складалася з зони, де був розміщений спейсер та уламків материнського кортексу стегнової кістки проксимально та дистально від неї (рис. 3, а). Спейсера не було на гістологічних зразках через розчинення силікону під час депарафінування гістологічних зрізів у ксилолі перед забарвленням. Навколо нього виявлено сполучнотканинну капсулу різної товщини у всіх шурів без ознак запалення (рис. 3, в). Вона була найширшою біля уламків кістки та її ширина зменшувалася з віддаленням від зовнішньої поверхні кістки. Сполучнотканинна капсула з'єднувалася з зовнішньою поверхнею уламків кістки трохи далі від їхніх країв. Вона складалася з паралельно спрямованих пучків колагенових волокон і щільно розміщених поміж них фіброblastів із базофільними ядрами (рис. 3, в). У періості, де капсула була ширшою, у ній подекуди визначали ділянки васкуляризації з судинами капілярного типу різного діаметра (рис. 3, в).

У кірковому матриксі поблизу зони остеотомії визначали безклітинні ділянки без остеоцитів, із переважанням пустих лакун або з детритом у них, зустрічалися ділянки нерівномірно еозинофільно забарвленого матриксу (рис. 3, д, ж). Структури періосту й ендосту поблизу зони остеотомії, де виконували коагуляцію під час хірургічного втручання, не виявляли (рис. 3, д). У одного щура зафіксовано утворення кісткової тканини на кінцях уламків з одного боку, у інших 5 з 6 (83 %) не було ознак кісткоутворення поблизу місця розміщення спейсера як у періості, так і ендості.

Поза зоною ушкодження періосту (> 2 мм від ділянки остеотомії) виявлено новоутворену губчасту кісткову тканину переважно у періості, а у деяких шурів також в ендості, яка складалася з дрібнопетлястих кісткових трабекул та остеоцитів у матриксі. На поверхні кісткових трабекул визначали остеобласти кубоподібної форми з базофільними ядрами. У періості й ендості, там де у кірковому матриксі були відсутні живі остеоцити, зафіксовано остеокласти.

У шурів із моделлю атрофічного незрощення перелому, яким зробили ін'єкцію PRP, через 4 тижні, аналогічно як і у тварин без ін'єкції PRP, виявляли зону остеотомії із двома уламками та

порожнину від спейсера оточену сполучнотканинною капсулою (рис. 3, б). У 80 % (4 із 5) особин зафіксовано сформовану кісткову тканину на уламках, переважно на одному (рис. 3, б) — як у періості, так і в ендості. Виявлено значущість цих змін порівняно з моделлю ($\chi^2(2, n = 11) = 4,41, p = 0,036$). Кісткова тканина була губчастою в періостальній зоні та грубоволокнистою — в ендостальній (рис. 3, е, и). У двох тварин формування кісткового регенерату було інтенсивнішим, ніж в інших з повною перебудовою одного уламка. Так само як і у моделі, кірковий матрикс кінців уламків містив порожні лакуни без остеоцитів, у кожного щура виявлено ділянки на кінцях уламків без новоутворених тканин. Сполучнотканинна капсула мала схожу структуру, як у моделі (рис. 3, г), проте у тварин із виразнішим формуванням тканин у ній густіше розміщувалися судини капілярного типу, а поряд знайдено ділянки хрящової тканини з гіпертрофованими хондроцитами, що свідчить про процес енхондральної осифікації.

Обговорення

У результаті виконання поперечної остеотомії на рівні середньої третини діафіза стегнової кістки щура, фіксацією інтрамедулярно спицею Кіршнера, з коагуляцією періосту та встановленням силіконового спейсера, отримано атрофічне незрощення перелому через 4 тижні після виконання хірургічного втручання. Водночас це лише локальне порушення, тобто зберігається нормальне функціонування періосту на відстані 2 мм від зони ушкодження, що підтверджено наявністю сформованого періостального регенерату з губчастою кістковою тканиною. Гістологічні характеристики ділянки ушкодження відповідають таким у разі атрофічного незрощення перелому [11]: фіброзна капсула навколо спейсера, відсутність періостального й ендостального регенерату, загибель остеоцитів у кірковому матриксі уламків, відсутність остеокластів через пригнічення васкуляризації. Рентгенографічно також визначено відсутність ознак регенеративного процесу в зоні ушкодження.

У схожих моделях атрофічного незрощення переломів у невеликих тварин [17–23], як і в нашій, виконували руйнування періосту, проте водночас із ендостом [24], кістковим мозком [25, 26] для підвищення відтворюваності. Є ще одна модель схожа на нашу, де автори використали латексно-силіконову фольгу [27] для ізоляції уламків, проте наша передбачає простіший спосіб ізоляції уламків одне від одного шляхом використання

силіконового спейсера, який надягається на спицю Кіршнера. Також опубліковано результати використання силіконового вкладиша [28, 29] або полісульфонової пластини [30], проте без коагуляції періосту.

Наш методологічний підхід у створеній моделі забезпечив утворення атрофічного незрощення у 5 з 6 щурів. Гірші результати в однієї тварини ймовірно обумовлені недостатньою коагуляцією періосту, через що на кінцях уламків утворилася нова кісткова тканина. Ураховуючи це можна передбачати успішність запропонованої моделі для вивчення способів лікування атрофічних незрощень переломів.

Клінічна ефективність PRP недостатньо доведена, про що свідчить аналіз 2 системних оглядів [9, 31]. Це обумовлено неоднорідністю існуючих клінічних даних, а також розумінням механізмів впливу PRP у ділянці незрощення. Загалом PRP використовують як у поєднанні з кістковими трансплантатами або МСК, так і у вигляді черезшкірних локальних ін'єкцій у ділянку незрощення перелому. У більшості досліджень застосування PRP мало позитивний ефект на загоєння перелому, лише у 2 його не виявили, а в одному отримали гірший результат під час порівняння з рекомбінантним BMP-7 [9, 31]. Використання PRP під час втручання сприяло швидшому зрощенню перелому та зниженню болю за візуальною аналоговою шкалою у групі з PRP ($n = 16$) порівняно з групою без у пацієнтів із незрощенням переломів діафізи великогомілкової кістки [15]. У разі одноразового черезшкірного введення PRP ($n = 14$) у ділянку оліготрофного незрощення у хворих з діафізарними переломами довгих кісток це пришвидшило \approx на 3 тижні досягнення зрощення (19,07 проти 16,7 тижнів), що на 13 % більше порівняно з використанням інтрамедулярної фіксації з кістковим трансплантатом ($n = 15$) [17]. У нашому дослідженні ми передбачаємо, що такий вплив PRP може бути обумовлений зокрема позитивним впливом на відновлення періостального кісткоутворення й експериментально перевірили це.

Введення PRP на 7 добу в моделі атрофічного незрощення перелому стегнової кістки в щурів позитивно вплинуло на перебіг регенеративного процесу, що проявлялося у формуванні кісткового регенерату в періостальній й ендостальній зонах країв уламків кістки, де попередньо провели руйнування періосту. Проте такий процес мав неоднорідний характер ймовірно пов'язаний із точністю введення PRP в зону ушкодження.

У схожому дослідженні впливу PRP у моделі незрощення в кролів, у якому між уламками великогомілкової кістки вставляли спейсер на 3 тижні, а після його видалення заповнювали порожнину штучним кістковим імплантатом (Coragraft) з або без PRP, виявлено що таке поєднання забезпечує швидше зрощення кістки (рентгенологічно та гістологічно) на 3, 7 та 11-й тижень, ніж із використанням лише Coragraft [32]. Водночас застосування лише PRP без Coragraft не мало схожих показників. Проте невідомо про результати використання PRP у такій моделі незрощення за умов коагуляції періосту та під час гострої фази перелому, що було досягнуто під час нашого дослідження.

Отримані нами результати узгоджуються з іншими експериментальними дослідженнями, у яких використовували PRP. Так у разі її введення під час утворення перелому великогомілкової кістки кролів кірковий регенерат більш зрілий на 6 та 12-й тижні [33, 34]. А у щурів із діабетом I типу виявлено посилення диференціації клітин у періості під час зрощення перелому стегнової кістки за умов ін'єкційного введення PRP вже з 12-ї доби експерименту, що може вказувати на вплив PRP на функціонування періосту або на клітини прилеглих тканин за умов системних порушень в організмі [35].

Висновки

Поперечна остеотомія стегнової кістки щурів з коагуляцією періосту на 2 мм від країв уламків, встановленням між ними силіконового спейсера й інтрамедулярною фіксацією спицями Кіршнера через 4 тижні забезпечує утворення атрофічного незрощення перелому у 83 % випадків.

Введення PRP у зону ушкодження на 7 добу в цій моделі позитивно впливає на періостальне кісткоутворення на краях уламків з попередньо зруйнованим періостом, проте переважно лише в одному з уламків. Це обумовлює необхідність розробки точнішого методу виконання ін'єкції PRP у зону ушкодження.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Перспективи подальших досліджень. Проведення експериментальних досліджень щодо комбінованого застосування кісткових морфогенетичних білків із насиченою тромбоцитами плазмою для стимуляції періостального кісткоутворення в моделі незрощення перелому кістки.

Інформація про фінансування. Дослідження виконано в межах науково-дослідної роботи «Дослідити можливості біотехнологій для корекції порушень репаративного остеогенезу в разі незрощень і несправжніх суглобів» № держреєстрації 0123U100134.

Внесок авторів. Воронцов П. М. — концепція та дизайн дослідження, редагування фінального варіанта статті; Мальцева В. Є. — гістологічний аналіз, написання чернетки та редагування фінальної версії статті; Данишчук З. М. — гістологічний аналіз; Нікольченко О. А. — дизайн дослідження, експериментальне моделювання у щурів; Ковтун В. В. — експериментальне моделювання у щурів; Лапонін С. І. — експериментальне моделювання у щурів. Усі автори ознайомилися з фінальною версією статті та затвердили її.

Список літератури

- Impieri, L., Pezzi, A., Hadad, H., Peretti, G. M., Mangiavini, L., & Rossi, N. (2024). Orthobiologics in delayed union and non-union of adult long bones fractures: A systematic review. In *bone reports*, 21, 101760. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2024.101760>
- Garnavos, C. (2017). Treatment of aseptic non-union after intramedullary nailing without removal of the nail. *Injury*, 48, S76–S81. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.04.022>
- Jarrassier, A., Py, N., de Rocquigny, G., Raux, M., Lasocki, S., Dubost, C., Bordier, E., Libert, N., Leclerc, T., Meaudre, É., & Pasquier, P. (2024). Lessons learned from the war in Ukraine for the anesthesiologist and intensivist: A scoping review. *Anaesthesia critical care & pain medicine*, 43(5), 101409. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2024.101409>
- Lurin, I., Burianov, O., Yarmolyuk, Y., Klapchuk, Y., Derkach, S., Gorobeiko, M., & Dinets, A. (2024). Management of severe defects of humerus in combat patients injured in Russo-Ukrainian war. *Injury*, 55(2), 111280. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2023.111280>
- Gagnon, D., Mouallem, M., Leduc, S., Rouleau, D. M., & Chapleau, J. (2024). A systematic scoping review of the latest data on orthobiologics in the surgical treatment of non-union. *Orthopaedics and traumatology: surgery and research*, 110(6), 103896. <https://doi.org/10.1016/j.otsr.2024.103896>
- Lana, J. F. S. D., da Fonseca, L. F., Macedo, R. D. R., Mosaner, T., Murrell, W., Kumar, A., Purita, J., & de Andrade, M. A. P. (2021). Platelet-rich plasma vs bone marrow aspirate concentrate: An overview of mechanisms of action and orthobiologic synergistic effects. *World journal of stem cells*, 13(2), 155–167. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i2.155>
- Bacevich, B. M., Smith, R. D. J., Reihl, A. M., Mazzocca, A. D., & Hutchinson, I. D. (2024). Advances with Platelet-Rich Plasma for Bone Healing. *Biologics: targets and therapy*, 18, 29–59. <https://doi.org/10.2147/BTT.S290341>
- Wang, L., Tower, R. J., Chandra, A., Yao, L., Tong, W., Xiong, Z., Tang, K., Zhang, Y., Liu, X. S., Boerckel, J. D., Guo, X., Ahn, J., & Qin, L. (2019). Periosteal Mesenchymal Progenitor Dysfunction and Extraskelentially-Derived Fibrosis Contribute to Atrophic Fracture Nonunion. *Journal of bone and mineral research*, 34(3), 520–532. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3626>
- Jamal, M. S., Hurley, E. T., Asad, H., Asad, A., & Taneja, T. (2022). The role of Platelet Rich Plasma and other orthobiologics in bone healing and fracture management: A systematic review. *Journal of clinical orthopaedics and trauma*, 25, 101759. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2021.101759>
- Dai, H., Zhang, H., Qiu, Z., & Shi, Q. (2023). Periosteum-derived skeletal stem cells encapsulated in platelet-rich plasma enhance the repair of bone defect. *Tissue and cell*, 83, 102144. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2023.102144>
- Panteli, M., Vun, J. S. H., Pountos, I., J. Howard, A., Jones, E., & Giannoudis, P. V. (2022). Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: A systematic review and an update on current insights. *Journal of cellular and molecular medicine*, 26(3), 601–623. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17096>
- Narasimhulu, C. A., & Singla, D. K. (2020). The role of bone morphogenetic protein 7 (BMP-7) in inflammation in heart diseases. *Cells*, 9 (2), 280. <https://doi.org/10.3390/cells9020280>
- Law of Ukraine No. 3447-IV, article 26. On the protection of animals from cruel treatment. Kyiv, 21 February, 2006. (In Ukrainian)
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: Strasbourg, 18 March 1986. (2000).
- Maruyama, M., Rhee, C., Utsunomiya, T., Zhang, N., Ueno, M., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2020). Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Frontiers in endocrinology*, 11, 386. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00386>
- Vorontsov, P. M., Ashukina, N. O., Maltseva, V. Y., Danyshchuk, Z. M., Nikolchenko, O. A., & Samoylova, K. M. (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. *Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics*, 2023(2), 25–32. <https://doi.org/10.15674/0030-59872023225-32>
- Oktas, B., Orhan, Z., Erbil, B., Degirmenci, E., & Ustündağ, N. (2014). Effect of extracorporeal shock wave therapy on fracture healing in rat femoral fractures with intact and excised periosteum. *Eklemler hastalıkları ve cerrahisi = joint diseases & related surgery*, 25(3), 158–162. <https://doi.org/10.5606/ehc.2014.33>
- Wu, X.-Q., Wang, D., Liu, Y., & Zhou, J.-L. (2021). Development of a tibial experimental non-union model in rats. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 16(1), 261. <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02408-3>
- Eckardt, H., Ding, M., Lind, M., Hansen, E. S., Christensen, K. S., & Hvid, I. (2005). Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. *The journal of bone and joint surgery. British Volume*, 87(10), 1434–1438. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.87B10.16226>
- Brownlow, H. C., Reed, A., & Simpson, A. H. R. W. (2002). The vascularity of atrophic non-unions. *Injury*, 33(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(01\)00153-x](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(01)00153-x)
- Reed, A. A. C., Joyner, C. J., Isefuku, S., Brownlow, H. C., & Simpson, A. H. R. W. (2003). Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *The journal of bone and joint surgery. British Volume*, 85(4), 604–610. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.85b4.12944>
- Sharun, K., Pawde, A. M., Banu S, A., Manjusha, K. M., Kalaiselvan, E., Kumar, R., Kinjavdekar, P., & Amarpal. (2021). Development of a novel atrophic non-union model in rabbits: A preliminary study. *Annals of medicine and surgery*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102558>
- Chaubey, A., Grawe, B., Meganck, J. A., Dyment, N., Inzana, J., Jiang, X., Connolly, C., Awad, H., Rowe, D., Kenter, K., Goldstein, S. A., & Butler, D. (2013). Structural and biomechanical responses of osseous healing: a novel murine nonunion model. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the italian society of orthopaedics and traumatology*, 14(4), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s10195-013-0269-4>
- Tawonsawatruk, T., Kelly, M., & Simpson, H. (2014). Evaluation of native mesenchymal stem cells from bone marrow and local tissue in an atrophic nonunion model. *Tissue engineering. part C, methods*, 20(6), 524–532. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2013.0465>
- Shimizu, T., Akahane, M., Morita, Y., Omokawa, S., Nakano, K., Kira, T., Onishi, T., Inagaki, Y., Okuda, A., Kawate, K., & Tanaka, Y. (2015). The regeneration and augmentation of bone with injectable osteogenic cell sheet in a rat critical fracture healing model. *Injury*, 46(8), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.04.031>
- Onishi, T., Shimizu, T., Akahane, M., Okuda, A., Kira, T., Omokawa, S., & Tanaka, Y. (2020). Robust method to create

- a standardized and reproducible atrophic non-union model in a rat femur. *Journal of orthopaedics*, 21, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.03.040>
27. Schmidhammer, R., Zandieh, S., Mittermayr, R., Pelinka, L. E., Leixnering, M., Hopf, R., Kroepfl, A., & Redl, H. (2006). Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *The journal of trauma*, 61(1), 199–205. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000195987.57939.7e>
 28. Schützenberger, S., Kaipel, M., Schultz, A., Nau, T., Redl, H., & Hausner, T. (2014). Non-union site debridement increased the efficacy of rhBMP-2 in a rodent model. *Injury*, 45(8), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.05.004>
 29. Skaliczki, G., Weszl, M., Schandl, K., Major, T., Kovács, M., Skaliczki, J., Redl, H., Szendrői, M., Szigeti, K., Máté, D., Dobó-Nagy, C., & Lacza, Z. (2012). Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model. *Acta physiologica Hungarica*, 99(2), 223–232. <https://doi.org/10.1556/APhysiol.99.2012.2.16>
 30. Cheng, A., Krishnan, L., Pradhan, P., Weinstock, L. D., Wood, L. B., Roy, K., & Guldberg, R. E. (2019). Impaired bone healing following treatment of established nonunion correlates with serum cytokine expression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the orthopaedic research society*, 37(2), 299–307. <https://doi.org/10.1002/jor.24186>
 31. Roffi, A., Di Matteo, B., Krishnakumar, G. S., Kon, E., & Filardo, G. (2017). Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *International orthopaedics*, 41(2), 221–237. <https://doi.org/10.1007/s00264-016-3342-9>
 32. Kanthan, S. R., Kavitha, G., Addi, S., Choon, D. S. K., & Kamarul, T. (2011). Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury*, 42(8), 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.01.015>
 33. Canbeyli, İ. D., Akgun, R. C., Sahin, O., Terzi, A., & Tuncay, İ. C. (2018). Platelet-rich plasma decreases fibroblastic activity and woven bone formation with no significant immunohistochemical effect on long-bone healing: An experimental animal study with radiological outcomes. *Journal of orthopaedic surgery*, 26(3). <https://doi.org/10.1177/2309499018802491>
 34. Atik, A., Sargin, S., Meriç, G., & Ceylan, C. (2021). Immunohistological Effects of Transforming Growth Factor-β via Platelet-Rich Plasma On Segmental Bone Defects: An Animal Study. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 45(2), 363–371. <https://doi.org/10.3906/vet-2010-1>
 35. Gandhi, A., Doumas, C., O'Connor, J. P., Parsons, J. R., & Lin, S. S. (2006). The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone*, 38(4), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.10.019>

Стаття надійшла до редакції 11.11.2025	Отримано після рецензування 28.01.2026	Прийнято до друку 02.02.2026
-------------------------------------------	-------------------------------------------	---------------------------------

STIMULATION OF PERIOSTEAL BONE FORMATION WITH PLATELET-RICH PLASMA IN A RAT MODEL OF FEMORAL ATROPHIC NON-UNION

P. M. Vorontsov, V. Ye. Maltseva, Z. M. Danyshechuk, O. A. Nikolchenko, V. V. Kovtun, S. I. Laponin

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

* Valentyna Maltseva, Phd in Biol. Sci.: maltseva.val.evg@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9184-0536>

* Zinayda Danyshechuk, MD: zinada1962@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2968-3821>

* Olga Nikolchenko, PhD in Biol. Sci.: o_nicolchenko@ukr.net; <https://orcid.org/0000-0001-9808-9485>

* Volodymyr Kovtun: vladimir.kovtin@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0008-6693-3897>

* Stanislav Laponin, MD: laponin.st@gmail.com