

**MORPHOLOGICAL FEATURES OF REPARATIVE OSTEOGENESIS UNDER
THE INFLUENCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS****National Pirogov Memorial Medical University (Vinnitsya, Ukraine)****ryaboshapkooleg5@gmail.com**

A promising direction of modern scientific research is the search for and provision of the most optimal conditions for the course of reparative-regenerative processes in the event of a violation of the bone tissue integrity with the use of cellular technologies. The proposed study aims to determine the specifics of the dynamics of reparative osteogenesis during the local introduction of mesenchymal stem cells into the area of bone tissue defect in experimental animals. The experiment was conducted in normal vivarium conditions on 64 rats, divided into control and experimental groups, in compliance with bioethical norms. The material for histological examination was the bone fragments of the tibia bones, which were removed on the experiment's 7th, 14th, 21st and 28th days. Mesenchymal stem cells obtained from Warton's jelly umbilical cord were injected into the area of the bone fragments in the animals of the experimental group. During the experiment, the structural changes of all components of the bone tissue under the conditions of the reactive inflammatory process were investigated, in particular, the trabecular component of the affected bone tissue, its fibrous structures, the state of the bone marrow, as well as perifocal soft tissues in the fracture area. On the 7th day of the experiment, during the histological examination of the fracture site tissues of the tibial bone of the main group rats, in addition to erythrocytes, mononuclear cells of the type of blood monocytes (mononuclear cells), macrophage cells and mesenchymal fibroblast-like cells, small and undifferentiated cells were present in a significantly greater number than in the control group. On the 14th day of the experiment, after the treatment of the fracture between the bone fragments, the presence of signs of the formation of endosteal and periosteal bone regeneration was also established. On the 21st day, the rats of the study group showed signs of fracture union through the formation of endosteal, periosteal and intermediate bone calluses; the bone tissue was more mature. In the main group, on the 28th day, significantly more intense remodelling signs of bone regeneration were detected than in the control group. With the use of mesenchymal stem cells obtained from Warton's jelly umbilical cord, the rats of the experimental group experienced a significant improvement in the qualitative indicators of reparative osteogenesis.

Key words: reparative osteogenesis, experiment, mesenchymal stem cells, fracture, bone.

Connection of the publication with planned research works.

The article is a fragment of a research topic of the Department of Traumatology and Orthopedics of the National Pirogov Memorial Medical University "Complex rehabilitation of patients with injuries and diseases of the musculoskeletal system" state registration number O115U007095.

Introduction.

The problem of treating disorders of reparative osteogenesis, particularly delayed consolidation of bone fragments, nonunion of fractures and pseudojoints, is an actual medico-social problem of modern medicine and often leads to unsatisfactory treatment results. According to domestic and foreign specialists, the frequency of development of this pathology ranges from 2.5% to 18% and is relevant for all countries [1]. Clinical observations show that the prospects of improving the treatment results of bone pathology only due to the improvement of the connection and retention of fragments are exhausted [2]. In addition to fracture stabilization using osteosynthesis and autologous bone tissue transplantation, orthobiology is becoming increasingly important in treating bone regeneration disorders. In addition to using various growth factors, new data in the literature show that using cellular therapeutics significantly improves the results of bone regeneration [3, 4, 5]. That is why the "biological" field, as an additional treatment field for patients with a trauma-orthopaedic profile based on cellular technologies and bio-implanto-

logy, attracts the attention of leading specialists worldwide [6, 7, 8].

Cellular therapy is a promising new therapeutic approach in regenerative medicine. It should be noted that the most priority areas of application of cell therapy in traumatology and orthopaedics are the use of stem cells in articular cartilage injuries, acute and degenerative tendon injuries, and the treatment of reparative osteogenesis disorders. Multipotent mesenchymal cells, the precursors of all connective tissue cells and myocytes, are most interested in solving scientific and clinical problems in orthopaedics and traumatology [1, 9, 10].

Therefore, searching for and providing the most optimal conditions for reparative-regenerative processes in the event of a violation of the integrity of bone tissue is recognized as a promising and priority direction of scientific research in the new millennium.

Six stages can be distinguished in the reparative process of bone tissue: 1) destabilization of cellular elements; 2) cell proliferation; 3) differentiation of different types of tissues (chondroblastic, fibroblastic, osteoblastic, undifferentiated connective and fibrillar tissue); 4) epigenesis of osteogenic tissue: through direct metaplasia and atypical enchondral ossification, in which all types of tissue transform into osteoid tissue; 5) spongyfication of osteoid tissue and formation of osteons; 6) formation of lamellar bone [11].

The following four stages are distinguished during fracture healing:

- reparative reaction;

- the formation of bone fragments fusions;
- a fusion of bone fragments;
- functional reconstruction of the bone callus and fused fragments forming the bone's organic structure [12].

Fracture union occurs due to the formation of a bone callus through the proliferation of cells of the mainly osteogenic layer of the periosteum, the appearance of hyaline cartilage in the outer part of the bone callus and the gradual spread of cartilage over its entire volume, replacement of cartilage by bone, while initially a spongy substance is formed, which is later rebuilt into a compact one.

The aim of the study.

To determine the peculiarities of the dynamics of reparative osteogenesis during the local introduction of mesenchymal stem cells into the area of bone tissue defect in experimental animals.

Object and research methods.

The study was conducted on 64 male and female rats of the "Wistar" line, which were in the conditions of the vivarium of the National Pirogov Memorial Medical University. The animals were divided into control and experimental groups of 32 each and housed in normal vivarium conditions. The research material was removed on the experiment's 7th, 14th, 21st and 28th days. Mesenchymal stem cells obtained from Warton's jelly umbilical cord were injected into the area of the bone fragments in the animals of the experimental group. All manipulations were carried out in compliance with the basic principles of work with experimental animals following the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), General Ethical Principles of Animal Experiments, adopted by the First National Congress on Bioethics (Kyiv, 2001), the Law of Ukraine "On the Protection of Animals from Cruelty" (dated February 21, 2006). The material for histological examination, namely bone

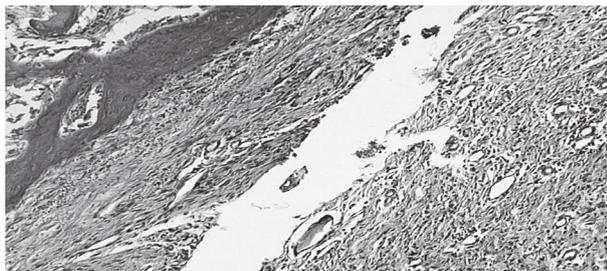


Figure 1 – Regenerate of tibia of a control group rat on the 7th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x100.

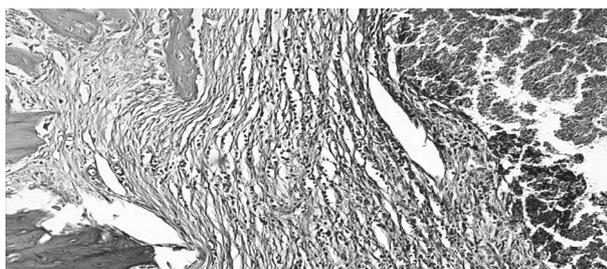


Figure 2 – Regenerate of tibia of a control group rat on the 7th day of the experiment. Hematoma in the fracture area. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x100.

fragments of tibia bones, was fixed with 10% neutral formalin. After that, decalcification of bone tissue was carried out using TRILON B, dehydrated in concentrated alcohols and immersed in paraffin. Sections obtained on a sled microtome were stained with hematoxylin and eosin and placed on glass slides.

Microscopy of histological slides was carried out with the help of an OLIMPUS BX 41 light microscope (MoH of Ukraine State Registration Certificate No. 8120/2008, code 9011800000) using magnifications of 40, 100, 200, and 400 times. Image visualization and morphometry were performed using the morphometric program Quickphoto micro 2.3 (license agreement No. 925113924), which allows for 2737 pixels. The morphological study consisted in studying the structural changes of all components of bone tissue – the trabecular component of the affected bone tissue, its fibrous structures, the state of the bone marrow, as well as perifocal soft tissues in the fracture area in the conditions of the reactive inflammatory process without treatment and with the use of mesenchymal stem cells obtained from Warton's jelly umbilical cord.

Research results and their discussion.

During the histological examination of tissues at the tibial bone fracture area of rats of the control group on the 7th day of the experiment, a hematoma was found between the bone fragments with degenerative changes, which is the source of the formation of endosteal and periosteal bone regenerate in the future. The components of the hematoma were erythrocytes, most of which were in a state of hemolysis, a minor part of which was preserved. In addition to erythrocytes, there were mononuclear cells of the type of blood monocytes (mononuclear cells), macrophage cells and mesenchymal fibroblast-like cells, poorly differentiated and undifferentiated cells. During this period among them, young fibroblasts were identified in small amounts. A more significant number of osteoblasts was determined in the marginal parts of the bone fragments. On the periphery of the fracture zone, there was polymorphocellular inflammatory infiltration, represented mainly by polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, and plasma cells. The lysis of small bone fragments was observed on the cross-section of the middle of the diaphysis. The entire osteon layer was damaged, with numerous lacunae of resorption and necroses, which in some places merged, forming sequestral fields. Zones of necrosis were especially pronounced on the side of the endosteum. The area of the outer surrounding plates was also destroyed.

In the histological sections of this study term, the formation of primary reticular structures, which mainly consisted of young forms of fibroblasts, osteoblasts and fibroreticular fibres located between them, is represented only in some places. Significant areas of granulation and fibroreticular tissues indicate a considerable delay in further osteogenesis. There were no signs of angiogenesis. There was also a slowdown in the regression of the hematoma and the absence of hemosiderophages, which indicates a decrease in cellular activity, mainly the macrophage link (fig. 1, fig. 2).

During the histological examination of the tissues of the tibial bone fracture area of the main group rats on the 7th day of the experiment, a hematoma was also found between the bone fragments, which further led to the formation of endosteal and periosteal regener-

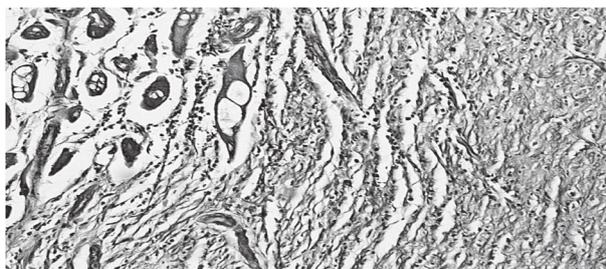


Figure 3 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 7th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

ate of bone. The components of the hematoma were erythrocytes, most of which were in a state of hemolysis, a minor part of which was preserved. In addition to erythrocytes, mononuclear cells of the type of blood monocytes (mononuclear cells), macrophage cells and mesenchymal fibroblast-like cells, poorly differentiated and undifferentiated cells were also present in a significantly greater number than in the control group. In this term, a small number of young fibroblasts was determined among them.

A large number of osteoblasts was determined in the marginal parts of the bone fragments. Polymorphocellular inflammatory infiltration occurred on the periphery of the fracture zone, but it was much less pronounced than in the control group, represented mainly by polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, and plasma cells. In histological sections, the formation of primary reticular structures was also observed in some places, mainly consisting of young forms of fibroblasts, osteoblasts and fibroreticular fibres between them. Signs of angiogenesis in this period were also absent (fig. 3).

During the histological examination of the tibial bone regenerate of the control group rats on the 14th day of the experiment after the fracture between the bone fragments, signs of the formation of endosteal and periosteal bone regeneration were established. The basis of the regenerate was immature spongy bone tissue, which had the appearance of chaotically located bone beams that anastomosed with each other. Newly formed bone beams were characterized by some mosaic colouration and were more thinned than in the main group. Histological sections show the formation of mesh structures, mainly consisting of young forms of fibroblasts, osteoblasts and fibroreticular fibres between them. Along with these cells, there were also mononuclear cells of the type of blood monocytes (mononuclear cells), macrophage cells and mesenchymal fibroblast-like cells, poorly and undifferentiated cells. During this period, post-traumatic haemorrhages with an accumulation of hemosiderophages persisted. Signs of angiogenesis

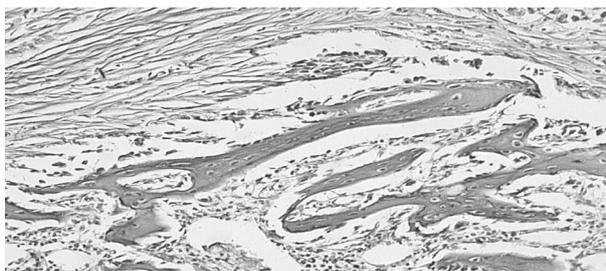


Figure 5 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 14th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

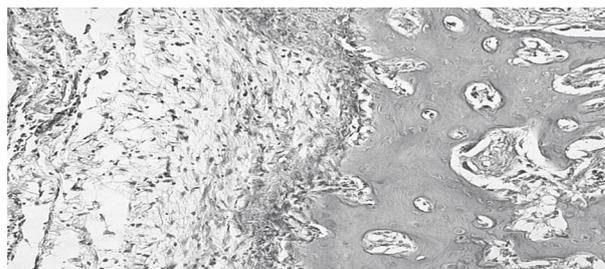


Figure 4 – Regenerate of tibia of a control group rat on the 14th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

were not sufficiently expressed. There was also reactive large-focal inflammatory cell infiltration, consisting mainly of polymorphonuclear leukocytes, lymphohistiocytic elements, and plasma cells (fig. 4).

During the histological examination of the tibial bone regenerate of the study group rats on the 14th day of the experiment after the treatment of the fracture between the bone fragments, it was also established the presence of signs of the formation of endosteal and periosteal bone regenerate, the basis of which was immature spongy bone tissue in the form of bone beams that anastomosed with each other. Along with them, cells of chondroid and fibrous tissue were determined. In the interbeam space, signs of more active angiogenesis were found than in animals of the control group. On the 14th day, capillaries and arterioles with a larger diameter prevail than in the control group, and the number of vessels in the regenerate also increases.

Along with these changes, mononuclear cells of the type of blood monocytes (mononuclear cells), macrophage cells, mesenchymal fibroblast-like cells, poorly differentiated and undifferentiated cells were also observed. Post-traumatic haemorrhages were not determined. However, a slight reactive small-focal inflammatory cell infiltration remained, consisting mainly of lymphohistiocytic elements, plasma cells, and a small number of segmented leukocytes (fig. 5, 6).

The bone regenerate was mainly represented by spongy osteogenic tissue that formed the endosteal component of the bone callus and had the appearance of a mesh of varying density from young bone beams covered with chains of immature active osteoblasts. A layer of regenerative tissues with a periosteal regenerative reaction of uneven thickness was determined on the surface of the bone fragments. The interbeam space was represented by fibroreticular tissue, in which the beams of the intramedia bone callus were formed (fig. 7, 8).

When examining histological sections on the 21st day of the experiment, the formation of hyaline carti-

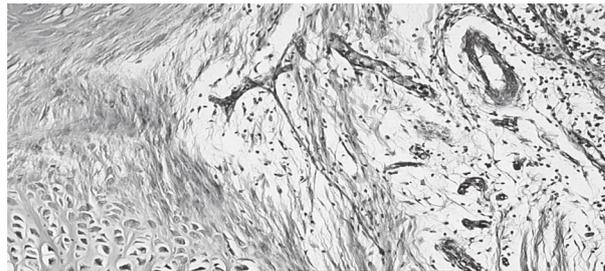


Figure 6 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 14th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.



Figure 7 – Regenerate of tibia of a control group rat on the 21st day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

lage in the fracture zone with a relatively large number of chondroblasts was already determined in rats of the control group. However, the increased area of the intermediate substance displaced the chondrocytes of the isogenic groups and replaced the columns of chondrocytes in the reproduction and maturation zones. Most of the cartilaginous plate cells are characterized by the phenomena of hydropic dystrophy. In the initial parts of the proliferative zone of cartilage, cells at the destruction stage were determined, which indicated a violation of the division and differentiation processes of cartilage cells. In the cytoplasm of the vast majority of cells, there are signs of marked ballooning dystrophy. Signs of collagen matrix formation in the zone of enchondral ossification and islands of newly formed spongy bone tissue were also revealed.

Small newly formed bone beams were identified, and the interbeam space was represented by loose fibrous tissue. Bone beams are thinned; in some places, they touch the indifferent zone and form cells with cellular elements of the bone marrow.

Disturbances in the processes of formation and reconstruction of bone regeneration consisted in the fact that the newly formed bone structures had a heterogeneous composition – against the background of tissue that had a reticulofibrous character, areas of bone tissue with a lamellar structure were determined, which had a heterogeneous composition and uneven colour, which indicates a violation of the mineralization of the newly formed bone tissue. Along with the decrease in the content of bone tissue, its structural changes were also observed – thinning and uzuration of the beams, uneven colouring and a reduction of the number of active osteoblasts on its surface.

The periosteal bone callus was excessively formed and represented by a decorated fibrous tissue, among which inflammatory cell elements were determined in some places – mainly lymphocytes and histiocytes with an admixture of a small number of segmented leukocytes.

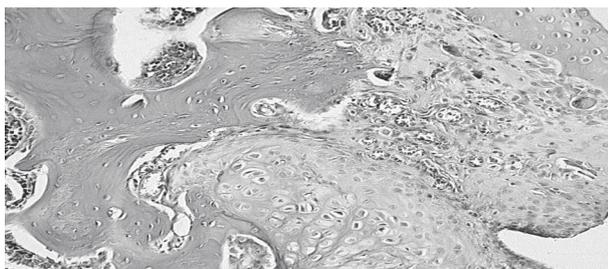


Figure 9 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 21st day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

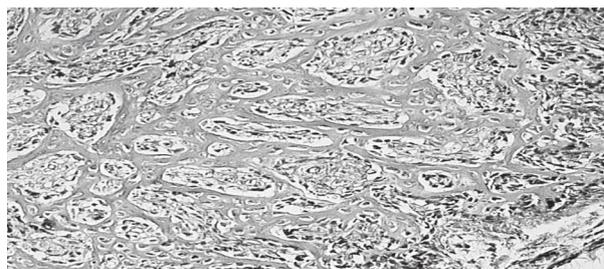


Figure 8 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 21st day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

The red bone marrow is represented by separate small hematopoietic islands, which were replaced by cells of young fibrous tissue in some places. Newly formed vessels showed uneven blood supply and were also dilated (fig. 7).

In the rats of the study group, on the 21st day, signs of fracture union were determined by the formation of endosteal, periosteal and intermediate bone calluses. The bone tissue in this period was more mature and was represented by compacted lamellar bone tissue, and instead of trabeculae, primary and secondary osteons with vascular channels were determined. Young osteoblasts at different stages of differentiation were located on the periphery of bone trabeculae. The interosseous spaces were filled with spongiosa, which contained, in addition to osteoblasts, a significant number of osteoclasts in gaushyip lacunae. They performed the functions of active osteoresorption, resulting in the edges of the bone beams having uneven contours. The presence of multinucleated cells in the resorptive cavities (osteoclasts) allows us to conclude about the activity of bone tissue remodelling processes of this cell. The network of bone trabeculae of the distal metaepiphysis of the tibia contained many osteoblasts, especially at the border with the growth zone. Large osteoblasts, stained according to their metabolic activity, were located on the outer surface of bone trabeculae. Most of them were found directly in the trabeculae themselves. Osteoblasts occupied almost ¼ of the total plane of bone tissue. Single cells had signs of destruction. Expanded bone canals contained young osteoid, narrow zones of newly formed lamellar bone tissue formed in their walls (fig. 8, 9).

In the histological preparations of the diaphyseal tibial fracture of the control group rats on the 28th day, widespread foci of young cellular fibrous tissue were determined, among which foci of active osteogenesis were found. The bone regenerate was represented by a network of newly formed bone beams of different thicknesses, which anastomosed with each other. Cells of cartilage tissue were also determined. Therefore, bone

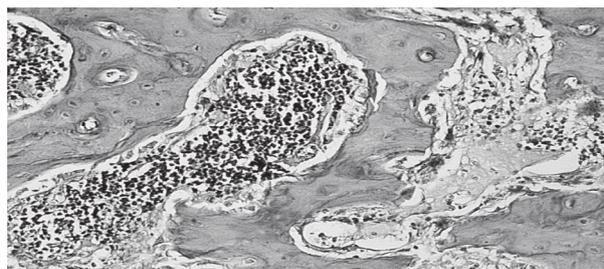


Figure 10 – Regenerate of tibia of a control group rat on the 28th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x400.



Figure 11 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 28th day of the experiment. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.



Figure 12 – Regenerate of tibia of the main group rat on the 28th day of the experiment. Bone callus. Hematoxylin-eosin staining. Magnification: x200.

tissue was formed at the site of the osteocartilaginous callus by enchondral ossification. The newly formed bone beams, anastomosing, formed spongy bone tissue in which many osteoblasts and osteocytes were present. Bone trabeculae had an arc-shaped shape and were still chaotically located in the thickness of the regenerate. Numerous foci of mineralized primary interosseous substance, stained more basophilic, were determined among the bone plates. Loose fibrous tissue was observed in the interbeam space.

The newly formed bone tissue was characterized by unevenly placed osteons with multidirectional insert plates. Often, osteonic structures were formed by only two or three concentric plates, which represents them as primary. Attention was drawn to the decrease in the number of osteocytes and empty osteocyte lacunae. The remnants of coarse fibrous tissue form a finely looped network of trabeculae, on the surface of which single osteoblasts and osteoclasts are found. The last one indicates the incompleteness of bone callus reconstruction processes at this time (fig. 10).

During the histological examination of the preparations of the diaphyseal fracture focus of the tibial bone of the main group rats on the 28th day, significantly more intense signs of remodelling of the bone regenerate were found in comparison with the control group. Bone fragments consisting of cortex with the periosteum and endosteal regenerate with adjacent spongiosa were determined in histological sections. Expanded resorption cavities were observed in the examined cortex, which performed the function of osteoresorption of excess newly formed bone tissue. The interbeam space, filled with fibrous tissue, contained many vascular channels with the formation of osteon-type bone structures

around them. Newly formed bone structures were characterized by uniform colouring and many secreting osteoblasts on their surface. Small muscular-type arteries evidenced sufficient angiogenesis in vascular channels and resorption cavities. Also, islands of red bone marrow, represented by all three sprouts in their average ratio with some preference for the granulocytic sprout (fig. 11, 12), were traced in the interbeam space.

Conclusions.

During the fracture healing, the tibial bone regenerate is formed by successive changes in tissue-specific structures with the formation of full-fledged bone tissue at the defect site after 28 days of observation. Based on histological studies, it has been proven that the physiological and pathological remodelling of the bone tissue of the tibia bones in the conditions of their fracture without treatment and with the use of mesenchymal stem cells obtained from Warton's jelly umbilical cord is significantly different in the control and experimental groups of white laboratory rats. When mesenchymal stem cells were used in the experimental group of rats, a significant improvement in the qualitative indicators of reparative osteogenesis was established. The data from the histological examination indicate that, in the absence of treatment, inflammatory changes last longer, significantly slowing down the processes of bone tissue regeneration.

Prospects for further research.

The obtained scientific results open prospects for further study of the state of readaptation changes of bone tissue in the body and the development of various methods of treatment and correction to prevent pathological regeneration of bone tissue.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-1-168-331-342

УДК 611.018.4:572.7:612.08

Фіщенко В. О., Рябошапко О. М.

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ПІД ВПЛИВОМ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова (м. Вінниця, Україна)

ryaboshapkooleg5@gmail.com

Перспективним напрямком сучасних наукових досліджень є пошук та забезпечення найбільш оптимальних умов перебігу репаративно-регенераторних процесів при порушенні цілісності кісткової тканини із застосуванням клітинних технологій. Мета пропонованого дослідження полягає у визначенні особливостей динаміки репаративного остеогенезу при локальному введенні мезенхімальних стовбурових клітин у ділянку дефекту кісткової тканини в експериментальних тварин. Експеримент проведено в звичайних умовах віварію на 64 щурах, розподілених на контрольну та експериментальну групи, із дотриманням біоетичних норм. Матеріалом для гістологічного дослідження стали кісткові уламки великогомілкових кісток, що були вилучені на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му добу експерименту. У

ділянку кісткових уламків тваринам експериментальної групи вводили мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з вартонових драглів пуповини людини. Під час експерименту досліджено структурні зміни всіх компонентів кісткової тканини в умовах реактивного запального процесу, зокрема трабекулярного компоненту ураженої кісткової тканини, її волокнистих структур, стану кісткового мозку, а також перифокальних м'яких тканин у ділянці перелому. На 7-му добу експерименту при гістологічному дослідженні тканин місця перелому великогомілкової кістки щурів основної групи окрім еритроцитів були присутні також одноклітинні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало- та недиференційовані клітини в значно більшій кількості, ніж у групі контролю. На 14-ту добу експерименту після лікування перелому між кістковими фрагментами також встановлено наявність ознак формування ендостального та періостального кісткового регенерату. На 21-шу добу у щурів досліджуваної групи визначались ознаки зрощування перелому шляхом формування ендостального, періостального та інтермедіарного кісткових мозолів, кісткова тканина була більш зрілою. В основній групі на 28-му добу виявлені значно інтенсивніші ознаки перебудови кісткового регенерату, ніж у контрольній групі. При застосуванні мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із вартонових драглів пуповини людини, у щурів експериментальної групи встановлено достовірне покращення якісних показників репаративного остеогенезу.

Ключові слова: репаративний остеогенез, експеримент, мезенхімальні стовбурові клітини, перелом, кістка.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Стаття є фрагментом науково-дослідної теми кафедри травматології та ортопедії ВНМУ ім. М. І. Пирогова «Комплексна реабілітація пацієнтів з травмами та захворюваннями опорно-рухового апарату» державний реєстраційний номер 0115U007095.

Вступ.

Проблема лікування розладів репаративного остеогенезу, зокрема сповільнена консолидація кісткових відламків, незрощення переломів та псевдосуглоби, є важливою медико-соціальною проблемою сучасної медицини і часто призводить до незадовільних результатів лікування. Частота розвитку цієї патології за даними вітчизняних і закордонних фахівців становить від 2,5% до 18% і є актуальною для всіх країн [1]. Клінічні спостереження показують, що перспективи покращення результатів лікування патології кісток тільки за рахунок удосконалення з'єднання і утримання відламків в основному вичерпані [2]. На додаток до стабілізації переломів з використанням остеосинтезу та аутологічної трансплантації кісткової тканини, у лікуванні розладів кісткової регенерації усе більшого значення набуває ортобіологія. Крім застосування різних факторів росту, нові дані в літературі показують, що використання клітинних терапевтичних засобів значно покращує результати регенерації кісток [3, 4, 5]. Саме тому «біологічний» напрям, як додатковий напрям лікування пацієнтів травматолого-ортопедичного профілю, що заснований на використанні клітинних технологій та біоімплантології привертає увагу провідних спеціалістів в усьому світі [6, 7, 8].

Клітинна терапія є перспективним, новим терапевтичним підходом в регенеративній медицині. Слід зазначити, що найбільш пріоритетними напрямками застосування клітинної терапії у травматології та ортопедії є використання стовбурових клітин при ушкодженнях суглобового хряща, гострих та дегенеративних ураженнях сухожилля, а також у лікуванні розладів репаративного остеогенезу. Для вирішення наукових та клінічних проблем в ортопедії та травматології найбільший інтерес становлять мультипотентні мезенхімальні клітини, які є попередниками всіх клітин сполучної тканини та міоцитів [1, 9, 10].

Тому пошук та забезпечення найбільш оптимальних умов перебігу репаративно-регенераторних процесів при порушенні цілісності кісткової тканини визнано як перспективний та пріоритетний напрямок наукових досліджень нового тисячоліття.

У репаративному процесі кісткової тканини можна виділити шість стадій: 1) дестабілізація клітинних елементів; 2) клітинна проліферація; 3) диференціація різного виду тканин (хондробластична, фібробластична, остеобластична, недиференційована сполучна і фібрилярна тканини); 4) епігенез остеогенної тканини: шляхом прямої метаплазії і атипичної енхондральної осифікації, при якій всі види тканин переходять в остеїдну тканину; 5) спонгізація остеїдної тканини і утворення остеонів; 6) утворення пластинчастої кістки [11].

При загоєнні переломів виділяють такі чотири стадії:

- репаративна реакція;
- формування зрощень кісткових відломків;
- зрощення кісткових відломків;
- функціональна перебудова кісткової мозолі і зрощення відломків з формуванням органної структури кістки [12].

Зрощення перелому відбувається за рахунок утворення кісткового мозоля шляхом розмноження клітин переважно остеогенного шару окістя, появи гіалінового хряща в зовнішній частині кісткового мозоля і поступового поширення хряща за усім його обсягом, заміщення хряща кісткою, при цьому спочатку утворюється губчаста речовина, яка пізніше перетворюється в компактну.

Мета дослідження.

Визначити особливості динаміки репаративного остеогенезу при локальному введенні мезенхімальних стовбурових клітин у ділянку дефекту кісткової тканини в експериментальних тварин.

Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження проведено на 64 самцях та самицях щурів лінії «Вістар», що знаходились в умовах віварію ВНМУ ім. М. І. Пирогова. Тварини були розподілені на контрольну та експериментальну групи по 32 тварини у кожній і знаходились у звичайних умовах віварію. Матеріал для дослідження вилучався на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му добу експерименту. У ді-

лянку кісткових уламків тваринам експериментальної групи вводили мезенхімальні стовбурові клітини, отримані з вартонових драглів пуповини людини. Усі маніпуляції проводили з дотриманням основних принципів роботи з експериментальними тваринами відповідно до положення Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986 р.), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006). Матеріал для гістологічного дослідження, а саме кісткові уламки великогомількових кісток, фіксували 10%-вим нейтральним формаліном, після чого проводили декальцинацію кісткової тканини, використовуючи ТРИЛОН Б, зневоднювали у спиртах концентрації та занурювали у парафін. Зрізи, отримані на санному мікротомі, фарбували гематоксилином та еозином, укладали на предметні скельця.

Мікроскопію гістологічних препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа OLIMPUS BX 41 (МОЗ України Свідоцтво про державну реєстрацію № 8120/2008, код 9011800000) із застосуванням збільшень у 40, 100, 200 та 400 разів. Візуалізацію зображення та морфометрію здійснювали за допомогою морфометричної програми Quickphoto micro 2.3 (ліцензійна згода № 925113924), що дозволяє проводити 2737 пікселей. Морфологічне дослідження полягало у вивченні структурних змін всіх компонентів кісткової тканини – трабекулярного компоненту ураженої кісткової тканини, її волокнистих структур, стану кісткового мозку, а також перифокальних м'яких тканин у ділянці перелому в умовах реактивного запального процесу без лікування та із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із вартонових драглів пуповини людини.

Результати досліджень та їх обговорення.

Під час гістологічного дослідження тканин у місці перелому великогомількової кістки щурів контрольної групи на 7-му добу експерименту між кістковими фрагментами з дегенеративними змінами виявлено гематому, яка є джерелом формування ендостального та періостального кісткового регенерату в майбутньому. Складовими гематоми були еритроцити, більша частина яких перебувала у стані гемолізу, менша їх частина була збережена. Окрім еритроцитів були присутні також одноядерні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало та недиференційовані клітини. У цьому періоді серед них визначались молоді фібробласти у невеликій кількості. У крайових відділах кісткових фрагментів визначалась більша кількість остеобластів. По периферії зони перелому мала місце поліморфноклітинна запальна інфільтрація, представлена переважно поліморфноядерними лейкоцитами, лімфоцитами, плазматичними клітинами. На поперечному зрізі середини діафіза спостерігався лізис дрібних уламків кістки. Уся площа остеонного шару була пошкоджена, з численними лакунами резорбції та некрозами, що місцями зливалися між собою, утворюючи секвестральні поля. Зони некрозу особливо були виражені

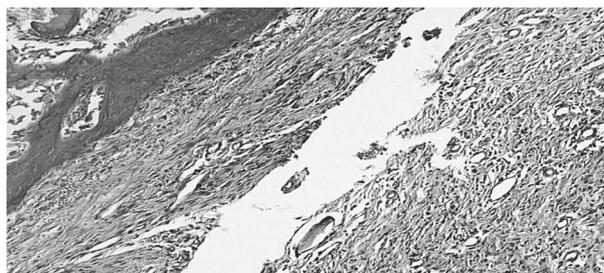


Рисунок 1 – Регенерат великогомількової кістки щура контрольної групи на 7-му добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x100.



Рисунок 2 – Регенерат великогомількової кістки щура контрольної групи на 7-му добу експерименту. Гематома в ділянці перелому. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x100.

зі сторони ендосту. Зона зовнішніх оточуючих пластинок також була зруйнована.

У гістологічних зрізах цього терміну дослідження лише подекуди представлене формування первинних сітчастих структур, які в основному склалися з молодих форм фібробластів, остеобластів та фібронетикулярних волокон, розташованих між ними. Наявність значних площ грануляційної та фібронетикулярної тканин свідчить про значну затримку подальшого остеогенезу. Ознаки ангиогенезу були відсутні. Також відбувалося уповільнення регресії гематоми, відсутність гемосидерофагів, що свідчить про зменшення клітинної активності, переважно макрофагальної ланки (рис. 1, рис. 2).

При гістологічному дослідженні тканин місця перелому великогомількової кістки щурів основної групи на 7-му добу експерименту між кістковими фрагментами також було виявлено гематому, яка надалі призводить до формування ендостального та періостального кісткового регенерату. Складовими гематоми були еритроцити, більша частина яких перебувала у стані гемолізу, менша їх частина була збережена. Окрім еритроцитів були присутні також одноядерні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало та недиференційовані клітини в значно більшій кількості, ніж у групі контролю. У цьому терміні серед них визначалась невелика кількість молодих фібробластів.

У крайових відділах кісткових фрагментів визначалась велика кількість остеобластів. По периферії зони перелому мала місце поліморфноклітинна запальна інфільтрація, але значно менш виражена, ніж у контрольній групі, представлена переважно поліморфноядерними лейкоцитами, лімфоцитами, плазматичними клітинами. У гістологічних зрізах також подекуди спостерігалось формування первинних сітчастих структур, які в основному склалися з мо-

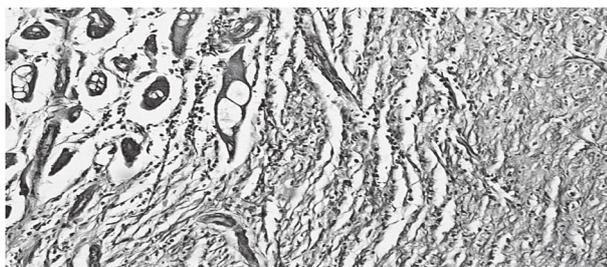


Рисунок 3 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 7-му добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

лодих форм фібробластів, остеобластів та фіброретикулярних волокон, розташованих між ними. Ознаки ангиогенезу у цьому терміні також були відсутні (рис. 3).

При гістологічному дослідженні кісткового регенерату великогомілкової кістки щурів контрольної групи на 14-ту добу експерименту після перелому між кістковими фрагментами встановлено наявність ознак формування ендостального та періостального кісткового регенерату. Основу регенерату становила незріла губчаста кісткова тканина, яка мала вигляд хаотично розташованих кісткових балок, що анастомозували між собою. Новосформовані кісткові балки характеризувалися деякою мозаїчністю забарвлення та були більш стоншені, ніж в основній групі. У гістологічних зрізах представлено формування сітчастих структур, які в основному склалися з молодих форм фібробластів, остеобластів та фіброретикулярних волокон, розташованих між ними. Поряд із цими клітинами були присутні також одноядерні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало- та недиференційовані клітини. У цьому терміні ще зберігались післятравматичні крововиливи зі зкупченням гемосидерофагів. Ознаки ангиогенезу були недостатньо виражені. Також зберігалась реактивна великовогнищева запальноклітинна інфільтрація, що складалась переважно з поліморфноядерних лейкоцитів, лімфогістіоцитарних елементів, плазматичних клітин (рис. 4).

При гістологічному дослідженні кісткового регенерату великогомілкової кістки щурів досліджуваної групи на 14-ту добу експерименту після лікування перелому між кістковими фрагментами також встановлено наявність ознак формування ендостального та періостального кісткового регенерату, основу якого складала незріла губчаста кісткова тканина у вигляді кісткових балок, що анастомозували між собою. Поряд із ними визначались осередки хондродної та фіброзної тканини. У міжбалковому просторі ви-

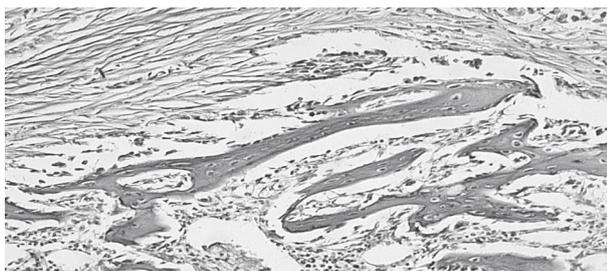


Рисунок 5 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 14-ту добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

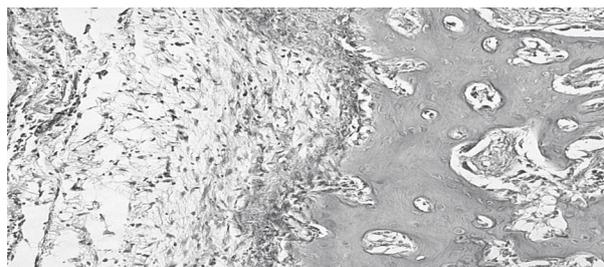


Рисунок 4 – Регенерат великогомілкової кістки щура контрольної групи на 14-ту добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

явлені ознаки більш активного ангиогенезу, ніж у тварин контрольної групи. На 14-ту добу переважають капіляри та артеріоли з більшим діаметром, ніж у контрольній групі, кількість судин в регенераті також збільшується.

Поряд із цими змінами також спостерігали одноядерні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало- та недиференційовані клітини. Післятравматичні крововиливи не визначались. Однак зберігалась незначна реактивна дрібновогнищева запальноклітинна інфільтрація, що складалась переважно з лімфогістіоцитарних елементів, плазматичних клітин, незначної кількості сегментоядерних лейкоцитів (рис. 5, 6).

Кістковий регенерат був представлений переважно губчастою остеогенною тканиною, що формувала ендостальний компонент кісткового мозоля та мала вигляд сіткі різної щільності з молодих кісткових балок, вкритих ланцюжками молодих активних остеобластів. На поверхні кісткових уламків визначався шар регенераторних тканин з періостальною регенераторною реакцією нерівномірної товщини. Міжбалковий простір був представлений фіброретикулярною тканиною, в якій формувались балки інтрамедіарного кісткового мозоля (рис. 7, 8).

При дослідженні гістологічних зрізів на 21-шу добу експерименту у щурів контрольної групи вже визначалось формування гіалінового хряща у зоні перелому з досить великою кількістю хондробластів. Однак збільшена площа проміжної речовини витісняла хондроцити ізогенних груп та заміщувала колонки хондроцитів у зонах розмноження та дозрівання. Більшість клітин хрящової пластинки характеризуються явищами гідропічної дистрофії. У початкових відділах проліферативної зони хряща визначались клітини на стадії руйнування, що свідчило про порушення процесів поділу і диференціювання хрящових клітин. У цитоплазмі переважної більшості клітин наявні ознаки вираженої балонної дистрофії.

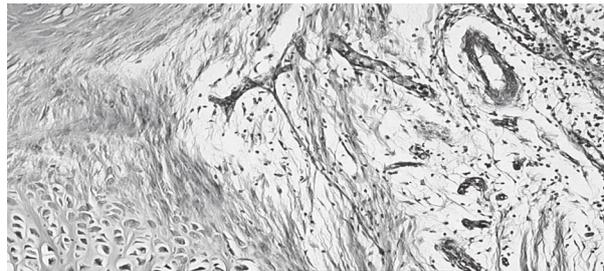


Рисунок 6 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 14-ту добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.



Рисунок 7 – Регенерат великогомілкової кістки щура контрольної групи на 21-шу добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

Також виявлено ознаки утворення колагенового матриксу в зоні енхондрального окостеніння та острівці новоутвореної губчастої кісткової тканини.

Визначались дрібні новоутворені кісткові балки, міжбалковий простір був представлений пухкою волокнистою фіброзною тканиною. Кісткові балки тоншені, місцями торкаються індиферентної зони та утворюють комірки з клітинними елементами кісткового мозку.

Порушення процесів формування та перебудови кісткового регенерату полягали в тому, що новоутворені кісткові структури мали неоднорідний склад – на фоні тканини, що мала ретикулофіброзний характер, визначались ділянки кісткової тканини пластинчастої будови, які мали неоднорідний склад та нерівномірне забарвлення, що свідчить про порушення мінералізації новоутвореної кісткової тканини. Разом зі зменшенням вмісту кісткової тканини спостерігалися також її структурні зміни – стоншення та узурація балочок, нерівномірне забарвлення та зменшення кількості активних остеобластів на її поверхні.

Періостальний кістковий мозоль був надлишково сформований та представлений оформленою фіброзною тканиною, серед якої подекуди визначались запальноклітинні елементи – переважно лімфоцити, гістіоцити з домішкою незначної кількості сегментоядерних лейкоцитів.

Червоний кістковий мозок представлений окремими дрібними гемопоетичними острівцями, які подекуди заміщувались осередками молодої фіброзної тканини. Новоутворені судини мали ознаки нерівномірного повнокров'я, а також були нерівномірно дилатовані (рис. 7).

У щурів досліджуваної групи на 21-шу добу визначались ознаки зрощування перелому шляхом формування ендостального, періостального та інтермедіарного кісткових мозолів. Кісткова тканина в цьому терміні була більш зрілою та була представлена компактизованою пластинчастою кістковою тканиною, а замість трабекул визначались первинні та вторинні

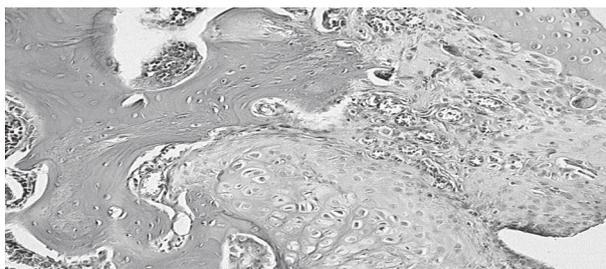


Рисунок 9 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 21-шу добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

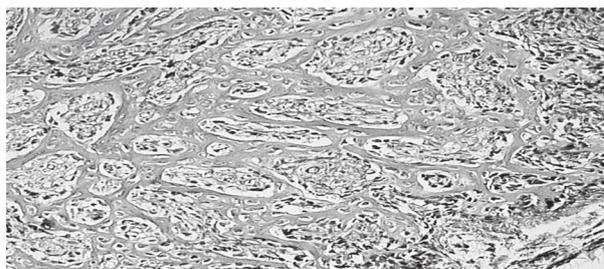


Рисунок 8 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 21-шу добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

остеони із судинними каналами. По периферії кісткових трабекул локалізувались молоді остеобласти на різних етапах диференціювання. Міжкісткові простори були заповнені спонгіозою, яка містила окрім остеобластів значну кількість остеокластів, розташованих у гаушипових лакунах. Вони виконували функції активної остеорезорбції, внаслідок чого краї кісткових балок мали нерівні контури. Наявність багатоядерних клітин у резорбтивних порожнинах (остеокластів) дозволяє зробити висновок про активність процесів ремоделювання кісткової тканини цього осередку. Сітка кісткових трабекул дистального метаепіфізу великогомілкової кістки містила велику кількість остеобластів, особливо на межі із зоною росту. Великі остеобласти, забарвлені відповідно до їх метаболічної активності, розташовувались на зовнішній поверхні кісткових трабекул, більшість їх знаходилась безпосередньо в самих трабекулах. Остеобласти займали майже ¼ частину загальної площини кісткової тканини. Поодинокі клітини мали ознаки деструкції. Розширені кісткові канали містили молодий остеод, в їхніх стінках формувались вузькі зони новоутвореної пластинчастої кісткової тканини (рис. 8, 9).

У гістологічних препаратах діафізарного перелому великогомілкової кістки щурів контрольної групи на 28-му добу визначались поширені вогнища молодої клітинної фіброзної тканини, серед якої виявлялись осередки активного остеогенезу. Кістковий регенерат був представлений сіткою новоутворених кісткових балок різної товщини, що анастомозували між собою. Також визначались осередки хрящової тканини. Отже, кісткова тканина формувалась на місці кістково-хрящового мозоля шляхом енхондрального окостеніння. Новоутворені кісткові балки, анастомозуючи, утворювали губчасту кісткову тканину, в якій були наявні остеобласти та остеоцити у великій кількості. Кісткові трабекули мали дугоподібну форму та були ще хаотично розташовані в товщі регенерату. Серед кісткових пластинок визначались чисельні вогнища мінералізованої основної міжкіст-

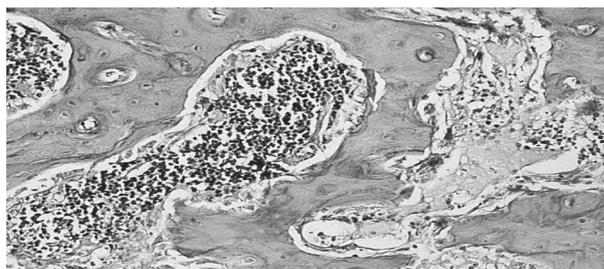


Рисунок 10 – Регенерат великогомілкової кістки щура контрольної групи на 28-му добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x400.



Рисунок 11 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 28-му добу експерименту. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

кової речовини, забарвлені більш базофільно. У міжбалковому просторі спостерігалась пухка волокниста фіброзна тканина.

Новоутворена кісткова тканина характеризувалась нерівномірно розміщеними остеонами з різнонаправленими вставними пластинами. Часто остеонні структури були утворені всього двома–трьома концентричними пластинами, що характеризує їх як первинні. Привертало увагу зменшення кількості остеоцитів та наявність порожніх остеоцитарних лакун. Залишки грубоволокнистої фіброзної тканини формують дрібнопетлисту сітку трабекул, на поверхні яких зустрічаються поодинокі остеобласти та остеокласти. Наявність останніх свідчить про незавершеність процесів перебудови кісткового мозоля в цьому терміні (рис. 10).

При гістологічному дослідженні препаратів вогнища діафізарного перелому великогомілкової кістки щурів основної групи на 28-му добу виявлені значно інтенсивніші ознаки перебудови кісткового регенерату в порівнянні з групою контролю. У гістологічних зрізах визначались фрагменти кістки, що склалися з кортексу з періостом та ендостальним регенератом з прилеглою спонгіозою. У досліджуваному кортексі спостерігали розширені резорбційні порожнини, що виконували функцію остеорезорбції надлишкової новоутвореної кісткової тканини. Міжбалковий простір, заповнений волокнистою фіброзною тканиною, містив значну кількість судинних каналів з формуванням навколо них кісткових структур за типом остеонів. Новосформовані кісткові структури характеризувалися рівномірним забарвленням та великою кількістю секретуючих остеобластів на їхній



Рисунок 12 – Регенерат великогомілкової кістки щура основної групи на 28-му добу експерименту. Кістковий мозоль. Забарвлення гематоксилін – еозин. Збільшення: x200.

поверхні. Про достатній ангиогенез свідчила наявність в судинних каналах та резорбційних порожнинах дрібних артерій м'язового типу. Також в міжбалковому просторі простежувались острівці червоного кісткового мозку, представленого всіма трьома ростками в нормальному їх співвідношенні з деякою перевагою гранулоцитарного ростка (рис. 11, 12).

Висновки.

Під час зрощення перелому кістковий регенерат великогомілкової кістки формується шляхом послідовної зміни тканиннспецифічних структур з утворенням повноцінної кісткової тканини на місці дефекту через 28 днів спостереження. На основі гістологічних досліджень доведено, що фізіологічна та патологічна перебудова кісткової тканини великогомілкових кісток в умовах їх перелому без лікування та із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із вартонових драглів пуповини людини, значно відрізняється у контрольній та дослідній групах білих лабораторних щурів. У щурів експериментальної групи при застосуванні мезенхімальних стовбурових клітин, встановлено достовірне покращення якісних показників репаративного остеогенезу. Отримані дані гістологічного дослідження свідчать про те, що за відсутності лікування довше тривають запальні зміни, які значно сповільнюють процеси регенерації кісткової тканини.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані наукові результати відкривають перспективи для подальшого вивчення стану реадaptaційних змін кісткової тканини в організмі та розробці різних методів лікування та корекції для запобігання патологічній регенерації кісткової тканини.

References / Література

- Haiko HV. Suchasni uiavlennia pro stovburovi klitiny ta perspektyvy yikh zastosuvannia v ortopedo-travmatolohichnii klinitsi. Zhurnal NAMN Ukrainy. 2014;20(3):306-11. [in Ukrainian].
- Ivanov OM, Berezka MI, Lytovchenko VO, Hariachyi YeV. Rezultaty vykorystannia reparatornoi metodyky likuvannia dysgeneratsii kistkovoї tkanyny. Scientific Journal «ScienceRise». 2015;10.3(15):5-11. [in Ukrainian].
- Jäger M, Hernigou P, Zilkens C, Herten M, Li X, Fischer J, et al. Cell therapy in bone healing disorders. Orthop Rev (Pavia). 2010 Sep 23;2(2):e20. DOI: [10.4081/or.2010.e20](https://doi.org/10.4081/or.2010.e20).
- Savchuk TL, Bokotko RR, Kharkevych YuO, Mazurkevych AI, Maliuk MO, Danilov VB, et al. Makroskopichni zminy v eksperymentalno ushkodzhennii velykohomilkovii kisttsi kroliv za vvedennia alohennykh mезenkhimalnykh stovburovykh klityn riznyu sposobamy. Naukovo-tekhnichnyi biuleten Derzhavnogo naukovo-doslidnogo kontrolnogo instytutu veterynarykh preparativ ta kormovykh dobavok. 2020;21(1):168-74. [in Ukrainian].
- Bambuliak AV, Kuznyak NB, Dmitrenko RR, Goncharenko VA. Dynamika pokaznykiv markeriv kistkovoho metabolizmu pry zamishchenni kistkovykh defektiv tkanynnymy ekvivalentamy kistkovoї tkanyny na osnovi mmsk-zht. Klinichna stomatolohiia [Internet]. 2019 Nov [cited 2023 Jan 18];3:68-75. Dostupno: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/kl-stomat/article/view/10568>.
- Maiti SK, Ninu AR, Sangeetha P, Mathew DD, Tamilmahan P, Kritaniya D, et al. Mesenchymal stem cells-seeded bio-ceramic construct for bone regeneration in large critical-size bone defect in rabbit. J Stem Cells Regen Med. 2016 Nov 29;12(2):87-99. DOI: [10.46582/jsrm.1202013](https://doi.org/10.46582/jsrm.1202013).
- Lee DJ, Park Y, Hu WS, Ko CC. Osteogenic Potential of Multipotent Adult Progenitor Cells for Calvaria Bone Regeneration. Advances in medicine. 2016;2016:2803081. DOI: [10.1155/2016/2803081](https://doi.org/10.1155/2016/2803081).
- Gómez-Barrena E, Solá CA, Bunu CP. Regulatory authorities and orthopaedic clinical trials on expanded mesenchymal stem cells. International Orthopaedics. 2014 Sep;38(9):1803-9. DOI: [10.1007/s00264-014-2332-z](https://doi.org/10.1007/s00264-014-2332-z).
- Olifirenko OI, Hertsen HI, Movchan OS, Serhiienko RO, Bursuk Yule. Novitni reheneratyvni tekhnolohii v likuvanni osteoartrytu velykykh suhlobov. Travma. 2022;23(2):40-6. DOI: [10.22141/1608-1706.2.23.2022.889](https://doi.org/10.22141/1608-1706.2.23.2022.889). [in Ukrainian].

10. Korzh M, Vorontsov P, Vishnyakova I, SamoiloVA K. Innovative methods for optimization of bone regeneration: mesenchymal bone cells (part 2) (literature review). Orthopaedics, Traumatology and Prosthetics [Internet]. 2018 Apr 4 [cited 2023 Jan 18];1:105-16. Available from:
11. Shteinle AV. Posttravmatycheskaia reheneratsiya kostnoi tkany. Siberian Medical Journal. 2009;4:101-6.
12. Brusko AT, Haiko HV. Suchasni uivlennia pro stadii reparatyvnoi reheneratsii kistkovoї tkanyny pry perelomakh. Visnyk ortopedii, travmatolohii ta protezuvannia. 2014;2:5-8. [in Ukrainian].

МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ПІД ВПЛИВОМ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

Фіщенко В. О., Рябошапка О. М.

Резюме. Важливою медико-соціальною проблемою сучасної ортопедії і травматології є лікування розладів репаративного остеогенезу. Окрім стабілізації переломів з використанням остеосинтезу та аутологічної трансплантації, результати регенерації кісток можуть бути покращені шляхом використання клітинних технологій. Мета дослідження – визначити особливості динаміки репаративного остеогенезу при локальному введенні мезенхімальних стовбурових клітин у ділянку дефекту кісткової тканини в експериментальних тварин. Щурі лінії «Вістар» були розподілені на контрольну та експериментальну групи по 32 тварини у кожній. Матеріал для гістологічного дослідження – кісткові уламки великогомілкової кістки, вилучався на 7-му, 14-ту, 21-шу та 28-му добу експерименту. Морфологічне дослідження полягало у вивченні структурних змін всіх компонентів кісткової тканини – трабекулярного компоненту ураженої кісткової тканини, її волокнистих структур, стану кісткового мозку, а також перифокальних м'яких тканин у ділянці перелому в умовах реактивного запального процесу без лікування та із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із вартонових драглів пуповини людини.

При гістологічному дослідженні тканин місця перелому великогомілкової кістки щурів основної групи на 7-му добу експерименту окрім еритроцитів були присутні також одноядерні клітини за типом моноцитів крові (мононуклеари), макрофагальні клітини та мезенхімальні фібробластоподібні клітини, мало- та недиференційовані клітини в значно більшій кількості, ніж у групі контролю. На 14-ту добу експерименту після лікування перелому між кістковими фрагментами також встановлено наявність ознак формування ендостального та періостального кісткового регенерату. У щурів досліджуваної групи на 21-шу добу визначались ознаки зрощування перелому шляхом формування ендостального, періостального та інтермедіарного кісткових мозолів, кісткова тканина була більш зрілою. На 28-му добу кісткова тканина формувалась на місці кістково-хрящового мозоля шляхом енхондрального окостеніння, в основній групі виявлені значно інтенсивніші ознаки перебудови кісткового регенерату, ніж у контрольній групі.

У щурів експериментальної групи при застосуванні мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із вартонових драглів пуповини людини, встановлено достовірне покращення якісних показників репаративного остеогенезу.

Ключові слова: репаративний остеогенез, експеримент, мезенхімальні стовбурові клітини, перелом, кістка.

MORPHOLOGICAL FEATURES OF REPARATIVE OSTEOGENESIS UNDER THE INFLUENCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS

Fishchenko V. O., Riaboshapko O. M.

Abstract. Treatment of reparative osteogenesis disorders is a pressing medical and social issue in modern orthopedics and traumatology. In addition to bone fracture stabilization by means of osteosynthesis and autotransplantation, bone regeneration can be improved through the use of stem cell technology. The purpose of this study was to determine the characteristics of reparative osteogenesis dynamics with local mesenchymal stem cells introduction in the bone defect area in experimental animals. Wistar rats were divided into control and experimental groups, each group containing 32 rats. Materials for histological examination, which are bone fragments of the tibia, were collected on days 7, 14, 21 and 28. Morphological investigation involved examination of structural changes of all the bone components (trabecular component of the affected bone tissue, its fibrous structures, bone marrow, perifocal soft tissues) in the fracture area in conditions of a reactive inflammatory process. The rats of the control group received no treatment while the rats of the experimental group were introduced mesenchymal stem cells, obtained from human Wharton's jelly.

Histological examination of tissues from the tibia fracture site revealed that on day 7 in rats of the experimental group except erythrocytes there were much more mononuclear cells, macrophages, mesenchymal fibroblast-like cells, poorly differentiated and undifferentiated cells than in rats of the control group. On day 14 of fracture treatment, signs of endosteal and periosteal bone regenerate formation were found between the bone fragments. On day 21, in rats of the experimental group there were signs of bone fusion through the formation of endosteal, periosteal and intermediate bone callus while the bone tissue was more mature. On day 28, the process of bone tissue formation through enchondral ossification was noted at the site of fibrocartilage callus. Bone regenerate reformation was found to be much more intensive in the experimental group than in the control group.

Conclusion. Rats of the experimental group with the introduction of mesenchymal stem cells, obtained from human Wharton's jelly, had reliably better quality indicators of reparative osteogenesis than rats of the control group.

Key words: reparative osteogenesis, experiment, mesenchymal stem cells, fracture, bone.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Fishchenko V. O.: [0000-0002-4742-9416](https://orcid.org/0000-0002-4742-9416)^{AEF}

Riaboshapko O. M.: [0000-0002-2071-0371](https://orcid.org/0000-0002-2071-0371)^{BCD}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Riaboshapko Oleg Mykolayovych / Рябошапко Олег Миколайович

National Pirogov Memorial Medical University / Вінницький національний медичний університет ім. М. І.

Пирогова

Ukraine, 21018, Vinnytsya, 56 Pyrohova st. / Адреса: Україна, 21018, м. Вінниця вул. Пирогова 56

Tel.: +380632234277 / Тел.: +380632234277

E-mail: ryaboshapkooleg5@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 20.08.2022 / Стаття надійшла 20.08.2022 року
Accepted 30.01.2023 / Стаття прийнята до друку 30.01.2023 року