

©А. В. Бамбуляк, Н. Б. Кузник, Р. Р. Дмитренко, В. А. Гончаренко

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

bambuyak.andrij@bsmu.edu.ua

Динаміка показників маркерів кісткового метаболізму при заміщенні кісткових дефектів тканинними еквівалентами кісткової тканини на основі ММСК-ЖТ

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції/Received: 02.09.2019 р.

Ключові слова: мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини жирової тканини; лужна фосфатаза; кисла фосфатаза.

АНОТАЦІЯ

Резюме. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини (ММСК-ЖТ) здатні до диференціації в адипогенному, остеогенному, хондрогенному, ендотеліальному, міогенному, гепатогенному, епітеліальному та нейрогенному напрямках. Оскільки загоєння кісткової тканини відбувається за допомогою заміщення дефекту сполучною тканиною, завданням було трансплантувати мультипотентні стовбурові клітини, які в подальшому будуть диференціюватись у власне кісткову тканину. Питання остеогенезу і процесів мінералізації кісткової тканини щелеп при стоматологічних втручаннях є актуальними. До ферментів, які беруть участь у регуляції фосфорно-кальцієвого обміну і мають безпосередній вплив на процеси резорбції та регенерації (як фізіологічної, так і репаративної), що постійно перебігають у кістці, відносять кислу і лужну фосфатази.

Мета дослідження – визначити зміни в показниках кісткового ремоделювання при заповненні кісткових дефектів тканинними еквівалентами кісткової тканини на основі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ).

Матеріали і методи. Експеримент проведено на щурах лінії Вістар масою 200–250 г, яких поділили на 6 груп. Модель кісткового дефекту формували в тим'яній ділянці черепа щурів. В утворений дефект імпантували заготовлений матеріал. Активність лужної фосфатази (ЛФ) у крові щурів досліджували за уніфікованим методом з використанням набору «Щелочная фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург). Загальну кислоту фосфатазу (КФ) у крові тварин досліджували фотометричним оптимізованим кінетичним методом з використанням набору «Кислая фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург). Кров з хвостової вени тварин збирали через 1; 2; 3 місяці експерименту. Отримані результати опрацьовано статистично.

Результати досліджень та їх обговорення. На 90 добу спостережень у крові експериментальних тварин досліджували збільшення активності лужної фосфатази. При цьому в щурів четвертої та шостої дослідних груп значення показника, який вивчали, були максимальними ((14,49±0,08) ммоль/с×л, $p_1 - p_2 < 0,01$, та (14,74±0,09) ммоль/с×л, $p_1, p_2 < 0,01$, $p_3 > 0,05$, $p_4 < 0,01$ відповідно)). У тварин інших груп дослідження через 3 місяці після спостережень значення проаналізованого параметра були нижче від даних у тварин першої групи: на 20,37 % – в другої, $p < 0,01$, на 11,08 % – у третій, $p, p_1 < 0,01$ та на 18,91 % у п'ятій групах, $p < 0,01$, $p_2, p_3 < 0,01$, $p_2 > 0,05$. Ця тенденція показує, що у даний термін спостережень активність ЛФ досягає максимальних значень, сприяючи синтезу позаклітинної матриці й мукополісахаридів, в утворенні фібрилярних білків та відкладенню мінеральних солей.

Висновки. Проведені дослідження показали здатність мультипотентних мезенхімальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ) стимулювати процеси остеогенезу, впливаючи, головним чином, на мінералізуючу функцію, про що свідчить збільшення показника ЛФ/КФ.

Вступ. Актуальним завданням у сучасній медицині є з'ясування механізмів репаративної регенерації тканин та органів при багатьох патологічних процесах, що дозволить запропонувати нові підходи до їх корекції, зокрема із залученням стовбурових клітин [1]. Відомо, що стовбурові клітини здатні розрізняти ділянки ушкодженої тканини, мігрувати у ці зони та диференціюватися у тип клітин, необхідний для відновлення втраченої функції [2]. Мультипотентні мезенхімальні стромальні клітини з жирової тканини здатні до диференціації в адипогенному, остеогенному, хондрогенному, ендотеліальному, міогенному, гепатогенному, епітеліальному та нейрогенному напрямках [3]. Оскільки загоєння кісткової тканини відбувається за допомогою заміщення дефекту сполучною тканиною, завданням було трансплантувати мультипотентні стовбурові клітини, які в подальшому будуть диференціюватись у власне кісткову тканину [4, 5].

Питання остеогенезу і процесів мінералізації кісткової тканини щелеп при стоматологічних втручаннях є актуальними. До ферментів, які беруть участь у регуляції фосфорно-кальцієвого обміну і мають безпосередній вплив на процеси резорбції та регенерації (як фізіологічної, так і репаративної), що постійно відбуваються у кістці, відносять кислу і лужну фосфатази [6, 7]. Лужна фосфатаза (ЛФ), що локалізується в остеобластах, відіграє важливу роль у процесах мінералізації кісткової тканини, оскільки каталізує перенесення іонів фосфорної кислоти від ефіру до компонентів органічного матриксу кістки. Підвищення активності цього фермента в крові як маркера кісткоутворення свідчить про активацію перебудови кісткової тканини. Кисла фосфатаза (КФ) як маркер резорбції кісткової тканини синтезується остеобластами й зумовлює процеси руйнування фосфоapatитів, спричиняючи демінералізацію кісткової тканини [8]. Одночасне збільшення активності КФ і зниження активності ЛФ зумовлює перевагу процесів резорбції кістки над остеогенезом [11, 14]. Це й було доцільним для проведення дослідження.

Мета дослідження було визначити зміни в показниках кісткового ремоделювання при заповненні кісткових дефектів тканинними еквівалентами кісткової тканини на основі мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ)

Матеріали та методи. Експеримент проведено на щурах лінії Вістар масою 200–250 г, яких поділили на 6 груп: перша група (контрольна) – 15 інтактних тварин; друга (порівняльна) – 22 щури, у яких відновлення дефекту проходило під кров'яним згустком; третя група (25 тварин) – відновлення кісткового дефекту при застосуванні ММСК-ЖТ, що пройшли остеогенне диференціювання (ОД); четверта (28 щурів) – відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД + збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП); п'ята група (27 тварин) – відновлення кісткового дефекту за допомогою ММСК-ЖТ з ОД + «Колапан»; шоста група (28 тварин) – відновлення кісткового дефекту за допомогою тканинного еквіваленту кісткової тканини (ТЕК), що містив ММСК-ЖТ + ЗТП + «Колапан». Модель кісткового дефекту формували в тім'яній ділянці черепа щурів. У подальшому в утворений дефект імплантували заготовлений матеріал (5x5 мм). З експерименту щурів виводили передозуванням наркозу нембуталу в дозах 30–50 мг/кг маси у наступні терміни: 1; 2; 3 місяці. Активність лужної фосфатази (ЛФ) у крові щурів досліджували за уніфікованим методом з використанням набору «Щелочная фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург). Загальну кислу фосфатазу (КФ) у крові тварин досліджували фотометричним оптимізованим кінетичним методом з використанням набору «Кислая фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург) [9, 10]. Кров із хвостової вени тварин збирали через 1; 2; 3 місяці експерименту. Статистичне обчислення цифрових значень здійснювали на комп'ютері за стандартними статистичними методами [8], на основі яких були опрацьовані алгоритми обчислення введених у таблиці значень (операційна система Linux, база даних MySQL, мова програмування Perl).

Експериментальні дослідження

Результати досліджень та їх обговорення. На 30 добу експерименту встановлено (табл. 1), що у крові дослідних тварин збільшувалась активність кислої фосфатази стосовно даних у інтактних тварин першої групи. При цьому найменше зростання активності КФ у крові (у 1,96 раза) визначали у четвертій групі щурів, де для відновлення кісткового дефекту використовувалась ММСК-ЖТ + ЗТП, $p < 0,01$, при максимальному збільшенні цього

параметра в тварин п'ятої групи (у 2,3 раза), де для відновлення кісткового дефекту застосовували комбінацію ММСК-ЖТ + «Колапан». Дана тенденція може бути пов'язана з місцевим ацидозом і активністю остеокластів, які беруть участь у резорбції уламків і некротичних тканин на тлі запальної реакції [12]. Звертало увагу, що міжгрупових відмінностей активності КФ у крові щурів не спостерігалось, $p_1-p_4 > 0,05$.

Таблиця 1. Динаміка активності кислої та лужної фосфатаз у крові експериментальних тварин на 30 добу спостережень

Показник	Група					
	перша	друга	третья (ММСК-ЖТ з ОД)	четверта (ММСК-ЖТ + ЗТП)	п'ята (ММСК-ЖТ+, «Колапан»)	шоста (ММСК-ЖТ+ЗТП+ «Колапан»)
Кисла фосфатаза (ммоль/с × л)	0,93± 0,23	2,09± 0,34°	1,97± 0,28°	1,82± 0,24°	2,12± 0,30°°	1,86± 0,26°
Лужна фосфатаза (ммоль/с × л)	15,07± 0,08	6,04± 0,05°°	7,28± 0,06 °°, *	7,57± 0,06 °°, *, ■	6,50± 0,05 °°, *, ■, Δ	7,28± 0,07 °°, *, Δ, ◇
Індекс ЛФ/КФ	16,20± 0,35	2,89± 0,15°°	3,70± 0,21 °°, *	4,16± 0,25 °°, *	3,07± 0,17 °°, ■, Δ	3,91± 0,27 °°, *, ◇◇

Примітки: 1) ° – $p < 0,05$; °° – $p < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних у тварин контрольної групи; 2) * – $p_1 < 0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних у тварин другої групи; 3) ■ – $p_2 < 0,01$; ■■ – $p_2 < 0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних у тварин третьої групи. 4) Δ – $p_3 < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних у тварин четвертої групи; 5) ◇ – $p_4 < 0,01$; ◇◇ – $p_4 < 0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних у тварин п'ятої групи.

В даний термін спостереження у тварин груп дослідження суттєво знижувалась активність лужної фосфатази у крові: від 2,5 до 2,3 раза у щурів другої та п'ятої дослідних груп відповідно, та від 2,1 до 2,0 рази у тварин третьої та шостої і четвертої груп відповідно, стосовно значень у контрольній групі, $p < 0,01$. Водночас, у тварин четвертої групи, де відновлення кісткового дефекту проводили за допомогою ММСК-ЖТ + ЗТП та у щурів шостої групи, при імплантації комбінації ММСК-ЖТ + ЗТП + «Колапан», зниження активності ЛФ у крові було вірогідно нижчим, ніж у тварин при спонтанному загоєнні кісткового дефекту (друга група), $p_1 < 0,01$ та в щурів п'ятої групи, де застосовували комбінацію ММСК-ЖТ + «Колапан», $p_3 < 0,01$. Необхідно зауважити, що зниження активності ЛФ у крові тварин другої-шостої груп пов'язане з діяльністю даного ферменту, що бере участь у першій та другій фазах демінералізації кістки [13].

Результат аналізу значень індексу співвідношення ЛФ/КФ, що вказує на превалювання процесів остеорезорбції над остеосинтезом у крові, показав, що в експериментальних групах тварин значення цього показника були значно знижені стосовно даних інтактних щурів першої групи: від 5,6 до 5,3 раза у тварин другої та п'ятої груп відповідно, та від 4,4 до 4,0 рази у дослідних щурів третьої та шостої груп відповідно, $p < 0,01$. Звертало увагу, що у тварин при спонтанному загоєнні кісткового дефекту (друга група) та при застосуванні комбінації ММСК-ЖТ + «Колапан» значення індексу співвідношення ЛФ/КФ були найменшими і дорівнювали між собою, $p_1 > 0,05$.

Динаміку значень активності кислої та лужної фосфатаз у крові експериментальних тварин на 60 добу спостережень представлено у таблиці 2. Ми встановили, що активність КФ у крові дослідних тварин знижувалась стосовно попереднього терміну дослідження (30 днів)

та не відрізнялась статистичною значущістю між собою, $p_1-p_4>0,05$.

Однак отримані значення були вірогідно вище порівняно з даними в інтактних тварин першої групи: на 96,8 % – у другій групі, на

82,8 % – в третій групі, на 67,74 % – у четвертій, на 100,0 % – в п'ятій та на 72,0 % – у шостій групах, $p<0,05$.

При цьому визначали підвищення активності лужної фосфатази в усіх групах дослі-

Таблиця 2. Динаміка значень активності кислоти та лужної фосфатази у крові експериментальних тварин на 60 добу спостережень

Показник	Група					
	перша	друга	третя (ММСК-ЖТ з ОД)	четверта (ММСК-ЖТ + ЗТП)	п'ята (ММСК-ЖТ+«Ко-лапа»)	шоста (ММСК-ЖТ +ЗТП+ «Колапан»)
Кисла фосфатаза (ммоль/с × л)	0,93± 0,23	1,83± 0,22 [°]	1,70± 0,18 [°]	1,56± 0,12 [°]	1,86± 0,28 [°]	1,60± 0,28 [°]
Лужна фосфатаза (ммоль/с × л)	15,07± 0,08	9,04± 0,07 [°]	10,50± 0,08 ^{°,*}	10,79± 0,07 ^{°,*■■}	9,70± 0,06 ^{°,*■,Δ}	10,50± 0,08 ^{°,*Δ,◇}
Індекс ЛФ/КФ	16,20± 0,35	4,94± 0,16 [°]	6,18± 0,22 ^{°,*}	6,92± 0,26 ^{°,*■■}	5,22± 0,18 ^{°,*■,Δ}	6,56± 0,29 ^{°,*■■,◇}

Примітки: 1) ° – $p<0,01$; °° – $p<0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних першої групи; 2) * – $p_1<0,01$; ** – $p_1<0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних другої групи; 3) ■ – $p_2<0,01$; ■■ – $p_2<0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних третьої групи; 4) Δ – $p_3<0,01$; ΔΔ – $p_3<0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних четвертої групи. 5) ◇ – $p_4<0,01$; ◇◇ – $p_4<0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних п'ятої групи.

дження, однак отримані дані були вірогідно нижче стосовно значень у тварин контрольної групи: у другій групі – на 60,0 %, $p<0,01$, в третій групі – на 30,33 %, $p, p_1<0,01$, у четвертій – на 28,40 %, $p, p_1<0,01, p_2<0,05$, в п'ятій – на 35,63 %, $p-p_3<0,01$ та у шостій групах – на 30,33 %, $p-p_4<0,01$.

Аналізуючи значення співвідношення індексу ЛФ/КФ звертало увагу, що максимальні процеси остеосинтезу відбувались, за даними цього параметра, в щурів четвертої та шостої груп при значеннях ЛФ/КФ (6,92±0,26) $p, p_1<0,01, p_2<0,05$, та (6,56±0,29) $p, p_1, p_4<0,01, p_2<0,05$ відповідно. Значно нижчими були дані проаналізованого параметра в тварин другої – (4,94±0,16) $p<0,01$ та п'ятої груп – (5,22±0,18) $p, p_2, p_3<0,01$.

За результатами дослідження активності фосфатази крові на 90 добу спостережень (табл. 3) встановлено суттєве зниження активності КФ у крові дослідних тварин. При цьому в щурів третьої, $p_1>0,05$; четвертої; $p_1, p_2>0,05$ та шостої груп, $p_1-p_3>0,05$ активність КФ дорівнювала даним у щурів першої контрольної групи, $p>0,05$. Водночас, у групах, де загоєння кісткового дефекту відбувалось під кров'яним згустком (друга група) та при застосуванні комбінації ММСК-ЖТ + «Колапан» (п'ята група)

активність КФ була вірогідно вище даних у інтактних щурів контрольної групи: на 70,97 % – у другій, $p<0,05$ та на 72,04 % у п'ятій групах, $p<0,05, p_1 - p_3>0,05$.

Звертало увагу, що на 90 добу спостережень у крові експериментальних тварин збільшувалась активність лужної фосфатази. При цьому в щурів четвертої та шостої дослідних груп значення показника, котрий досліджували, були максимальними ((14,49±0,08) ммоль/с × л, $p_1, p_2<0,01$ та (14,74±0,09) ммоль/с × л, $p_1, p_2<0,01, p_3>0,05, p_4<0,01$ відповідно). У тварин решти груп дослідження, через 3 місяці спостережень, значення проаналізованого параметру були нижче від даних тварин першої групи: на 20,37 % – в другій, $p<0,01$, на 11,08 % – у третій, $p, p_1<0,01$, та на 18,91 % – у п'ятій групах, $p<0,01, p_2, p_3<0,01, p_2>0,05$. Дана тенденція підкреслює, що у даний термін спостережень активність ЛФ досягає максимальних значень, сприяючи синтезу позаклітинної матриці й мукополісахаридів, в утворенні фібрилярних білків та відкладенню мінеральних солей [15].

Аналіз значень індексу співвідношення ЛФ/КФ показав зростання цього параметра в усіх групах дослідження, однак отримані дані були нижче значень і інтактних тварин, $p<0,01$.

Таблиця 3. Динаміка значень активності кислотої та лужної фосфатази у крові експериментальних тварин на 90 добу спостережень

Показник	Група					
	перша	друга	третья (ММСК-ЖТ з ОД)	четверта (ММСК-ЖТ + ЗТП)	п'ята (ММСК- ЖТ+«Ко- лапан»)	шоста (ММСК- ЖТ+ЗТП+ «Колапан»)
Кислота фосфата- за (ммоль/с × л)	0,93± 0,23	1,59± 0,18 ^{°°}	1,42± 0,16	1,24± 0,11	1,60± 0,26 ^{°°}	1,09± 0,25
Лужна фосфа- таза (ммоль/с × л)	15,07± 0,08	12,00± 0,08 [°]	13,40± 0,09 °,*	14,49± 0,08 *,■	12,22± 0,07 °,■,Δ	14,74± 0,09 *,■,◇
Індекс ЛФ/КФ	16,20± 0,35	7,55± 0,18 [°]	9,44± 0,24 °,*	11,69± 0,28 °*,■	7,64± 0,20 °,■,Δ	13,52± 0,31 °*,■,◇

Примітки: 1) ° – $p < 0,01$; °° – $p < 0,05$ – достовірна різниця значень стосовно даних у першій групі; 2) * – $p_1 < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних другої групи; 3) ■ – $p_2 < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних третьої групи; 4) Δ – $p_3 < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних четвертої групи; 5) ◇ – $p_4 < 0,01$ – достовірна різниця значень стосовно даних п'ятої групи.

Необхідно зауважити, що максимальне зростання значень індексу ЛФ/КФ досліджували у тварин четвертої та шостої експериментальних груп, які однак були на 27,84 %, $p_1, p_2 < 0,01$, та на 16,24 %, $p_1-p_4 < 0,01$ відповідно, нижче стосовно даних у тварин контрольної групи, $p < 0,01$. Суттєво нижчими були значення показника у тварин другої, третьої та п'ятої експериментальних груп, які вивчали, були на

53,40 %, на 41,73 %, $p_1 < 0,01$, та на 52,84 %, $p_2, p_3 < 0,01$, нижче даних у інтактних тварин першої групи, $p < 0,01$ відповідно.

Висновки. Проведені дослідження показали здатність мультипотентних мезенхімальних клітин жирової тканини (ММСК-ЖТ) стимулювати процеси остеогенезу, впливаючи, головним чином, на мінералізуючу функцію, про що свідчить збільшення показника ЛФ/КФ.

©А. В. Бамбуляк, Н. Б. Кузник, Р. Р. Дмитренко, В. А. Гончаренко

ВГУЗ України «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы

Динамика показателей маркеров костного метаболизма при замещении костных дефектов тканевыми эквивалентами костной ткани на основе ММСК-ЖТ

Резюме. Мультипотентные мезенхиальные стромальные клетки из жировой ткани (ММСК-ЖТ) способны к дифференциации в адипогенном, остеогенном, хондрогенном, эндотелиальном, миогенном, гепатогенном, эпителиальном и нейрогенном направлениях. Поскольку заживления костной тканей происходит посредством замещения дефекта соединительной тканью, задачей было трансплантировать мультипотентные стволовые клетки, которые в дальнейшем будут дифференцироваться в собственно костную ткань. Вопрос остеогенеза и процессов минерализации костной ткани челюстей при стоматологических вмешательствах актуальны. К ферментам, которые участвуют в регуляции фосфорно-кальциевого обмена и имеют непосредственное влияние на постоянно перебегающие в кости процессы резорбции и регенерации (как физиологической, так и репаративной), относят кислую и щелочную фосфатазы.

Цель исследования – определить изменения в показателях костного ремоделирования при заполнении костных дефектов тканевыми эквивалентами костной ткани на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ).

Материалы и методы. Эксперимент проведен на крысах линии Вистар массой 200–250 г, которых разделили на 6 групп. Модель костного дефекта формировали в теменной области черепа крыс. В

образований дефект имплантировали заготовленный материал. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) в крови крыс исследовали унифицированным методом с использованием набора «Щелочная фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург). Общую кислую фосфатазу (КФ) в крови животных исследовали фотометрическим оптимизированным кинетическим методом с использованием набора «Кислая фосфатаза-02-ВИТАЛ» (ф-ма «Витал-Диагностикс, Спб», Санкт-Петербург). Кровь из хвостовой вены животных собирали через 1; 2; 3 месяца эксперимента. Полученные результаты обработаны статистически.

Результаты исследований и их обсуждение. На 90 сутки наблюдений в крови экспериментальных животных исследовали увеличение активности щелочной фосфатазы крыс. При этом у четвертой и шестой опытных группах значение изучаемого показателя были максимальными ((14,49±0,08) ммоль/с×л, $p_1, p_2 < 0,01$, и (14,74±0,09) ммоль/с×л, $p_1, p_2 < 0,01, p_3 > 0,05, p_4 < 0,01$ соответственно)). У животных остальных групп исследования через 3 месяца наблюдений значение проанализированного параметра были ниже данных у животных первой группы: на 20,37 % – во второй группе, $p < 0,01$, на 11,08 % – в третьей, $p, p_1 < 0,01$ и на 18,91 % в пятой группе, $p < 0,01, p_2, p_3 < 0,01, p_2 > 0,05$. Эта тенденция подчеркивает, что в данный срок наблюдений активность ЛФ достигает максимальных значений, способствуя синтезу внеклеточной матрицы и мукополисахаридов, в образовании фибриллярных белков и отложению минеральных солей.

Выводы. Проведенные исследования показали способность мультипотентных мезенхимальных клеток жировой ткани (ММСК-ЖТ) стимулировать процессы остеогенеза, влияя, главным образом, на минерализующую функцию, о чем свидетельствует увеличение показателя ЛФ/КФ.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани; щелочная фосфатаза; кислая фосфатаза.

©А. V. Bambuliak, N. B. Kuznyak, R. R. Dmitrenko, V. A. Goncharenko

Bukovinian State Medical University

Dynamics of indicators of markers of bone metabolism in bone defect replacement fabric equivalents of bone tissue on the basis of MMSC-AT

Summary. Multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue (MMSC-AT) are capable of differentiation in the adipogenic, osteogenic, chondrogenic, endothelial, myogenic, hepatogenic, epithelial and neurogenic regions. Since bone tissue healing is done by replacing the defect with the connective tissue, our task was transplantation of multipotent stem cells, which in future will be differentiated into proper bone tissue. The questions of osteogenesis and processes of mineralization of jaw bone in dental interventions are relevant. To enzymes that are involved in the regulation of phosphorous-calcium metabolism and have a direct effect on bone resorption and regeneration processes (both physiological and reparative) that occur in the bone, include acid and alkaline phosphatase.

The aim of the study – to determine changes in bone remodeling rates when bone defects are filled with tissue equivalents of bone tissue based on multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue (MMSC-AT).

Materials and Methods. The experiment was conducted on the Wistar line rats, weighing 200–250 grams, which were divided into VI groups. A bone defect model was formed in the parietal section of the skull of rats. The formed defect implanted the harvested material. The activity of alkaline phosphatase in blood of rats was investigated by a unified method using the kit "Alkaline Phosphatase-02-Vital" ("Vital Diagnostics, Spb", St. Petersburg). The total phosphorus acid in animal blood was investigated by photometric optimized kinetic method using the kit "Acid Phosphatase-02-Vital" («Vital Diagnostics, Spb», St. Petersburg). Blood from the caudal vein of the animals was collected in 1, 2, 3 months of the experiment. The obtained results are processed statistically.

Results and Discussion. At the 90th day of observation in the blood of experimental animals, an increase in activity of alkaline phosphatase was investigated. At the same time, in the animals of groups IV and VI, the values of the studied index were maximum (14.49±0.08) mmol/s l, $p_1-p_2 < 0.01$ and (14.74±0.09) mmol/s × l, $p_1-p_2 < 0.01, p_3 > 0.05, p_4 < 0.01$, respectively). In animals, the rest of the study groups, after 3 months of observation, the value of the analyzed parameters was lower than the data in the group I of animals: 20.37 % in group II, $p < 0.01$, 11.08 % – in group II, $p - p_1 < 0.1$, and by 18.91 % in group V, $p < 0.01, p_2-p_3 < 0.01, p_2 > 0.05$. This tendency emphasizes that during this observation period, the activity of alkaline phosphatase reaches the maximum values, contributing to the extracellular matrix and mucopolysaccharides synthesis, fibrillar protein synthesis and deposition of mineral deposits.

Conclusions. Thus, the studies conducted by us have shown the ability of multipotent mesenchymal fatty tissue cells (MMSC-AT) to stimulate osteogenesis processes, mainly affecting the mineralizing function, as evidenced by an increase in alkaline phosphatase/phosphorus acid.

Key words: multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue; alkaline phosphatase; acid phosphatase.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 284. – P. 143–147.
2. Gimble J. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential / J. Gimble, F. Guilak // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 5. – P. 362–369.
3. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts / A. Bongso, C. Y. Fong, S. C. Ng [et al.] // *Human Reproduction*. – 2014. – Vol. 9. – P. 2110–2117.
4. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts / J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro [et al.] // *Science*. – 2014. – Vol. 282. – P. 1145–1147.
5. Yamanaka S. Pluripotency and nuclear reprogramming / S. Yamanaka // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 2017. – Vol. 363. – P. 2079–2087
6. Hillmann J. Z. // *Klin. Chem. Biochem.* – 2015. – Vol. 9. – P. 273.
7. Relationship of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism / J. J. Stepan, E. Silinkova-Malkova, T. Havrenek [et al.] // *Clin. Chim. Acta*. – 2013. – Vol. 30, 133(2). – P. 189–200.
8. Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике. – 3-е изд. / А. М. Горячковский. – Одесса : Экология, 2015. – 616 с.
9. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Денга [и др.] – К. : ГФЦ МЗУ, 2011. – 50 с.
10. Ферментативний метод оцінки стану кісткової тканини / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, І. В. Ходаков [та ін.] // *Одеський медичний журнал*. – 2013. – № 3. – С. 17–21.
11. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells / A. Winter, S. Breit, D. Parsch [et al.] // *Arthritis and Rheumatism*. – 2014. – Vol. 48. – P. 418–429.
12. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells / K. Mesimäki, B. Lindroos, J. Törnwall [et al.] // *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2009. – Vol. 38. – P. 201–209.
13. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta / R. F. Pereira, M. D. O'Hara, A. V. Laptev [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 95. – P. 1142–1147.
14. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone / E. M. Horwitz, P. L. Gordon, W. K. Koo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – Vol. 99. – P. 8932–8937.
15. Keating, A. A Phase I study of the transplantation of genetically marked autologous bone marrow stromal cells / A. Keating, L. Berkahn, R. Filshie // *Human Gene Therapy*. – 2016. – Vol. 9. – P. 591–600.

REFERENCES

1. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., & Beck, S.C. (2015). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.
2. Gimble, J., & Guilak, F. (2013). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5, 362-369.
3. Bongso, A., Fong, C.Y., & Ng, S.C. (2014). Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Human Reproduction*, 9, 2110-2117.
4. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., & Shapiro, S.S. (2014). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
5. Yamanaka, S. (2017). Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 363, 2079-2087
6. Hillmann J.Z.(2015). *Klin. Chem. Biochem.*, 9, 273.
7. Stepan, J.J., Silinkova-Malkova, E., & Havrenek, T. (2013). Relationship of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to the bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in hyperparathyroidism. *Clin. Chim. Acta*, 133 (2), 189-200.
8. Goryachkovskiy, A.M. (2015). *Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike [The clinical biochemistry in laboratory diagnostics]*. Odessa: Ekologiya [in Russian].
9. Levitsky, A.P., Makarenko, O.A., & Denga, O.V. (2011). *Eksperimentalnye metody issledovaniya stimulyatorov osteogeneza: metodicheskie rekomendatsii [The experimental methods of the study of osteogenesis stimulators]*. Kyiv: GFTs MZU [in Russian].
10. Levytskyi, A.P., Makarenko, O.A., & Khodakov, I.V. (2013). Fermentatyvnyi metod otsinky stanu kistkovoї tkanyny [The enzymatic method of the estimation of the state of osseous tissue]. *Odeskyi medychnyi zhurnal – Odesa Medical Journal*, 3, 17-21 [in Ukrainian].
11. Winter, A., Breit, S., & Parsch, D. (2014). Cartilage-

like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis and Rheumatism*, 48, 418-429.

12. Mesimäki, K., Lindroos, B., & Törnwall, J. (2009). Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38, 201-209.

13. Pereira, R.F., O'Hara, M.D., & Laptev, A.V. (2011). Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 1142-1147.

14. Horwitz, E.M., Gordon, P.L., & Koo, W.K. (2016). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8932-8937.

15. Keating, A., Berkahn, L., & Filshie, R. (2015). A phase I study of the transplantation of genetically marked autologous bone marrow stromal cells. *Human Gene Therapy*, 9, 591-600.