

*На правах рукописи*

**ПАЩЕНКО НАТАЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**



**МОРФОГЕНЕЗ СКЕЛЕТА ПРИ ВНУТРИВЕННОМ ВВЕДЕНИИ  
АЛЛОГЕННЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И  
ИМПЛАНТАЦИИ ГИДРОКСИЛАПАТИТА В  
БОЛЬШЕБЕРЦОВЫЕ КОСТИ  
(анатомо-экспериментальное исследование)**

Специальность 14.03.01 – Анатомия человека  
(медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Луганск – 2023

Работа выполнена на кафедре анатомии человека, оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России

**Научный руководитель: Торба Александр Владимирович**

доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России, ректор, заведующий кафедрой госпитальной хирургии, онкологии и урологии

**Официальные оппоненты: Климочкина Елена Михайловна**

доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Луганский государственный педагогический университет», заведующая кафедрой лабораторной диагностики, анатомии и физиологии (г. Луганск, РФ)

**Удочкина Лариса Альбертовна**

доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, заведующая кафедрой анатомии (г. Астрахань, РФ)

**Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского» Минобрнауки Российской Федерации (г. Симферополь, РФ)

Защита диссертации состоится «27» декабря 2023 года в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.005.01 в ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Св. Луки Минздрава России по адресу: 291045, РФ, ЛНР, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Св. Луки Минздрава России (291045, РФ, ЛНР, г.о. Луганский, г. Луганск, кв-л 50-летия обороны Луганска, д. 1г, библиотека) или на сайте <https://lgmu.ru/nauchnaya-rabota/dissertacionnyj-sovet>

Автореферат разослан «\_\_\_» ноября 2023 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 001.005.01  
кандидат медицинских наук, доцент



И.А. Белик

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Поскольку переломы и повреждения костей скелета очень широко распространены, проблема регенерации костной ткани является актуальной темой для исследований (Huang S. et al., 2015; Fu J. et al., 2021). Как правило, незначительные дефекты костей самостоятельно восстанавливаются без осложнений. Однако, при крупных костных дефектах, либо повреждении скелета на фоне остеопатий различного генеза, требуется обязательное клиническое лечение (Thurairajah K. et al., 2021). Поэтому для ортопедов-травматологов и челюстно-лицевых хирургов достижение полной и функциональной регенерации кости остается серьезной проблемой (Stewart S.K., 2019).

В клинической практике для оптимизации регенерации кости используются такие методы как костная пластика, distractionный остеогенез и направленная костная регенерация (Qaseem A. et al., 2017; Стогов, М.В. и соавт., 2021). Аутогенные костные трансплантаты являются золотым стандартом регенерации кости благодаря остеоиндуктивности, костной проводимости и гистосовместимости аутологичной кости (Zhang J. et al., 2018). Однако их применение имеет несколько недостатков: длительное время восстановления, неуправляемая резорбция и предельность доступного размера трансплантата (Iaquinta M. et al., 2019). Поэтому по мере развития клинической остеологии, а также современных достижений тканевой инженерии, терапия мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) стала актуальной задачей для улучшения регенерации костной ткани (Jin Z. et al., 2019). Чаще всего источником МСК, применяемых в ортопедии является костный мозг (Rau J.V. et al., 2016).

Трансплантация МСК стимулирует регенерацию костной ткани, этот эффект обусловлен как интеграцией трансплантированных МСК, так и их секреторной активностью (Shang F. et al., 2021; Michigami T., 2023). МСК встраиваются в эндотелиальную выстилку образующихся сосудов и стимулируют деление эндотелиальных клеток и рост сосудов, а также восстановление нервных окончаний (Harrell C.R. et al., 2019). МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, они вызывают иммуносупрессию, в основе которой лежит угнетение функции иммунных клеток (Song N., et al., 2021; D. M. Hoang et al., 2022). Используются МСК и при костно-пластических операциях совместно с имплантатами в костные дефекты различных материалов, в том числе и гидроксилалатитных (Rapp A.E. et al., 2015).

Несмотря на наличие большого числа исследований по изучению влияния МСК на биологические объекты, информация о морфогенезе костей скелета при имплантации гидроксилалатита в большеберцовые

кости и внутривенном введении МСК в различные фазы структурного формирования регенерата отсутствует.

**Степень разработанности проблемы исследования.** В современной клинической практике достаточно полно изучены системные реакции организма в ответ на повреждение одной из костей скелета на иммунном, метаболическом и эндокринном уровнях (Астраханцев Д.А. и соавт., 2014-2019; Baht G.S. et al., 2018; Соловьева И.В., 2020-2023 и др.).

Имеются и сведения о негативных изменениях роста, строения и формообразования как непосредственно поврежденного костного органа, так и дистантно удаленных от места повреждения костей, как при нанесении сквозного дефекта в одной из костей, так и при имплантации в него различных костно-пластических материалов (Талашова И.А. и соавт., 2016; Astrakhtantsev D. et al., 2016, 2019).

В ряде исследований доказан позитивный эффект внутривенного введения аллогенных МСК на структурно-функциональное состояние скелета после повреждения одной из костей (Зинченко Е.В. и соавт., 2019-2021). Однако, данные о морфогенезе скелета при имплантации гидроксилатапата в большеберцовые кости (ББК) и внутривенном введении аллогенных МСК в различные стадии структурного формирования костного регенерата в доступной литературе отсутствуют.

**Объект исследования:** морфогенез костей скелета беспородных белых крыс-самцов репродуктивного возрастного периода при воздействии экзогенных факторов.

**Предмет исследования:** рост, строение, формообразование, химический состав, прочностные свойства костей скелета (плечевых, тазовых костей и XII грудного позвонка) лабораторных животных после имплантации в большеберцовые кости гидроксилатапата и внутривенного введения МСК в различные фазы структурного формирования костного регенерата.

**Цель исследования:** установить особенности роста, строения и формообразования костей скелета после имплантации в ББК гидроксилатапата и внутривенном введении МСК, поэтапно, в зависимости от стадии формирования костного регенерата.

**Задачи исследования:**

1. Изучить особенности роста, строения и формообразования костей скелета белых беспородных крыс-самцов при поэтапном внутривенном введении аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в зависимости от срока, прошедшего после имплантации в дефект ББК гидроксилатапатитного материала ОК-015.

2. Выявить изменения химического состава и прочности костей скелета белых беспородных крыс-самцов при поэтапном внутривенном введении МСК в зависимости от срока, прошедшего после имплантации в дефект ББК гидроксилapatитного материала ОК-015.

3. Оценить степень влияния поэтапного внутривенного введения МСК в зависимости от стадии формирования регенерата ББК на изменение гистоморфометрических показателей плечевых костей.

4. Выявить оптимальный для восстановления структурно-функционального состояния костей скелета срок введения МСК после имплантации в дефект ББК гидроксилapatитного материала ОК-015.

**Научная новизна исследования.** Впервые на значительном экспериментальном материале было предпринято комплексное изучение морфогенеза костей скелета белых половозрелых крыс-самцов при поэтапном внутривенном введении аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в зависимости от срока, прошедшего после имплантации в дефект ББК гидроксилapatитного материала ОК-015. С помощью современных морфологических методов исследования (остеометрического, гистоморфометрического, биохимического, биомеханического, математического) получены новые данные, свидетельствующие о том, что внутривенное введение МСК в зависимости от стадии формирования регенерата ББК в сравнении с группой, где имплантация гидроксилapatита проводилась без введения МСК, сопровождалось восстановлением темпов продольного и аппозиционного роста костей скелета и морфофункционального состояния эпифизарных хрящей и надкостницы, а также восстановлением их химического состава и прочности. Впервые установлено, что степень влияния инъекций МСК на структурно-функциональное состояние костей скелета зависела от срока их введения. С позиций доказательной медицины обосновано, что оптимальным сроком введения МСК являются 10 сутки после костно-пластической операции, а внутривенное введение МСК на 24 и 45 сутки после имплантации в ББК материала ОК-015 не сопровождалось сколь-нибудь значимыми изменениями.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в данном анатомо-экспериментальном исследовании, в значительной степени расширяют имеющиеся представления о влиянии на морфогенез скелета поэтапного внутривенного введения МСК в зависимости от срока, прошедшего после имплантации в дефект ББК гидроксилapatитного материала ОК-015 и доказывает эффективность внутривенного введения МСК для сглаживания негативного влияния костно-пластической операции на кости скелета, дистантно удаленные от места повреждения.

Выводы и научные положения диссертационной работы могут послужить основой для дальнейших как фундаментальных, так и клинических исследований при разработке новых методов лечения костных дефектов критического размера.

Результаты комплексного морфологического исследования могут лечь в основу разработки мероприятий по лечению больных ортопедического профиля, а также использоваться в научных исследованиях и учебном процессе на кафедрах анатомии человека, патологической анатомии, гистологии, цитологии, эмбриологии, физиологии, травматологии и ортопедии высших медицинских учебных заведений, а также в практической деятельности специалистов данного профиля.

**Методология и методы исследования.** Методологическую основу диссертационной работы составил принцип системности, явившийся фундаментом для структурно-логической последовательности изучения структурно-функционального состояния костей скелета. Методология работы заключалась в аналитико-статистической обработке литературных данных по теме диссертационного исследования, постановке эксперимента, использовании методов научного познания. Были применены общие эмпирические методы (наблюдение, описание, измерение, сравнение), теоретические методы (анализ, синтез, классификация знаний, абстрагирование, индукция, дедукция), комплекс специальных морфологических методов (остеометрический, гистоморфометрический, биохимический, биосопромат), математические и статистические методы, позволившие изучить строение костей скелета в условиях проведенного эксперимента на разных уровнях их структурной организации.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Введение аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в хвостовую вену в различные сроки после имплантации в ББК материала ОК-015 в сравнении с группой без применения МСК сопровождается признаками восстановления роста, строения и формообразования исследуемых костей (плечевой, тазовой, а также двенадцатого грудного позвонка). Степень восстановления исследуемых морфологических параметров зависит от сроков введения МСК.

2. Введение аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в различные сроки после имплантации в ББК материала ОК-015 в сравнении с группой без применения МСК сопровождается восстановлением химического состава исследуемых костей и прочностных характеристик плечевых костей, зависящим по выраженности от сроков, прошедших с момента операции.

3. По результатам однофакторного дисперсионного анализа наиболее продолжительное и выраженное влияние МСК регистрируется при их

введении на 10 сутки после имплантации гидроксилатапата в ББК.

4. Оптимальным сроком для внутривенного введения МСК с целью восстановления структурно-функционального состояния дистантно удаленных от локуса повреждения костей являются 10 сутки после костно-пластической операции.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Актуальность избранной темы научного исследования и степень ее изученности подтверждается проведенным анализом данных литературы. Достоверность полученных результатов базируется на достаточном объеме экспериментального материала, использовании комплекса современных морфологических методов исследования, адекватных поставленным задачам, а также применении современных методов статистического анализа. Результаты исследования получены с применением сертифицированного оборудования. Выводы и практические рекомендации соответствуют поставленным задачам, логически вытекают из результатов исследования. Все представленные результаты опубликованы в рецензируемых периодических изданиях, критические замечания отсутствуют.

Основные результаты диссертационной работы представлены в виде тезисов и докладов на следующих научных форумах: научной конференции «Научное наследие российских морфологических школ» (Воронеж, 2020); VIII Международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (Казань, 2021); открытой студенческой научной конференции «Актуальные вопросы биологии и медицины» (Луганск, 2021); 21<sup>st</sup> World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (Лондон, 2021); международной научно-практической конференции «Роль инновационных технологий в медицинском образовательном процессе фундаментальных дисциплин и клинической медицины» (Самарканд, 2021); 22<sup>nd</sup> World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (Берлин, 2022); VI научно-практической конференция "Морфологические чтения памяти профессора В.Г. Ковешникова" (Луганск, 2022); 23<sup>rd</sup> World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases (Барселона, 2023).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из которых 7 статей в рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК при МОН ЛНР, 2 публикации – в журналах, сборниках научных трудов и материалов конференций, 6 публикаций – в материалах отечественных и зарубежных конгрессов, съездов и научных конференций. 1 работа опубликована без соавторов.

**Объём и структура диссертации.** Диссертация изложена на 178 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы (на 48 страницах,

вынесенных в приложения), иллюстрирована 45 рисунками (микрофотографиями и диаграммами), состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, двух глав результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, перечня условных обозначений, списка литературы и приложений. Список литературы содержит 156 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Материал и методы исследования.** Исследование было проведено на 192 самцах белых крыс массой от 190-225 г. Все манипуляции над экспериментальными животными проводились в соответствии с «Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Схема исследования была согласована и утверждена комиссией по вопросам биоэтики при ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России (выписка из протокола № 2 от 08.06.2023).

Эксперимент проводился в осенне-зимний период. Все животные были распределены на 8 групп, по 6 особей в каждой. К-группу составили контрольные животные, Д-группу - крысы, которым проводили хирургическое вмешательство по нанесению сквозного дефекта диаметром 2,2 мм в проксимальных отделах диафиза обеих ББК (Лузин В.И. и соавт. 2003), ОК-группу – животные, которым в дефект большеберцовых костей имплантировали гидроксилатапатитный материал ОК-015 (производитель ООО «ТЕРЕН», патент Украины № 23250, приоритет от 22.07.97 г.). В группах МСК3, МСК10, МСК15, МСК24 и МСК45 животным на 3 сутки 10, 15, 24 и 45 сутки после операции в хвостовое венозное сплетение вводили по 5 миллионов МСК. Клетки костного мозга вымывали из полостей ББК и бедренных костей белых крыс-самцов, после их декапитации под эфирным наркозом, с помощью питательной среды Игла МЕМ («Биолот», Россия). Культивирование клеток проводили во флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> («CORNING», США) в среде Игла МЕМ, обогащенной L-глутамином, 10% эмбриональной телячьей сывороткой, с добавлением двух антибиотиков в течение 14 суток при температуре 37° в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в условиях CO<sub>2</sub> – инкубатора HF15UV («Heal Force», Китай), со сменой ½ среды каждые 5 суток. Жизнеспособность полученных клеток (96%) оценивали тестом с трипановым синим. В течение всего срока культивирования проводили фенотипирование выращиваемой культуры клеток непрямым иммунофлюоресцентным методом с помощью моноклональных антител CD44, CD54, CD90 меченных FITC («Sigma», США), CD73 (SH3/4) и CD105 (SH2), меченных фикоэритрином («BD Biosciences», США), а

также оценивали пролиферативную активность клеток определением экспрессии ядерного антигена пролиферирующих клеток Ki67.

Суспензию МСК вводили инсулиновым шприцом в хвостовую вену лабораторных крыс, предварительно поместив их в рестрейнер. Через 7, 15, 30, 60 и 90 суток после нанесения дефекта в ББК, проводили эвтаназию животных, выделяли плечевые, тазовые кости и XII грудной позвонок, взвешивали их на аналитических весах ВЛА-200 с точностью до 1 мг и проводили остеометрическое исследование штангенциркулем ШЦ-1-0,05 с точностью до 0,05 мм (Лузин В.И., 2009).

Гистологические срезы проксимальных эпифизов и середины диафизов плечевых костей толщиной 4-6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином. Морфометрию зон эпифизарного хряща проводили с учетом морфо-функциональной классификации В.Г. Ковешникова (1980). Гистологические препараты исследовали и фотографировали на цифровом морфометрическом комплексе на базе микроскопа Olympus BX 41. Анализ изображений проводили с помощью программы для морфометрических исследований «Master of Morphology» (Овчаренко В.В., Маврич В.В., 2004).

Химический анализ костей проводили весовым методом, затем 10 мг золы растворяли в 2 мл 0,1 Н химически чистой соляной кислоты, доводили до 25 мл бидистиллированной водой. В полученном растворе определяли содержание натрия, калия, кальция, магния, железа, марганца, цинка и меди на атомно-абсорбционном фотометре типа "Сатурн"-2 в режиме эмиссии в воздушно-пропановом пламени, а также содержание фосфора на электрофотокolorиметре КФК-3 (Полужтков Н.С., 1967; Колб В.Г., 1980; Брицке Э.М., 1982). Биомеханические характеристики ПК определяли при изгибе на универсальной нагрузочной машине Р-0,5 со скоростью нагружения 0,25 мм/мин до разрушения. Использовали трехточечную модель нагружения (Ковешников В.Г., Лузин В.И., 2003).

Все полученные данные были приведены в соответствие с Международной системой единиц (СИ) (Степин Б.Д., 1990) и подвергались обработке методами вариационной статистики с использованием лицензионных программ Microsoft Office Excel и Statistica 5.11 (Лапач С.Н., 2001; Жижин К.С., 2007). Полученные цифровые данные подвергали анализу на нормальность распределения с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения статистическую значимость отклонений полученных результатов оценивали с использованием параметрического метода сравнения двух независимых выборок – критерия Стьюдента. В случае ненормального распределения использовали непараметрический метод сравнения – критерий Манна-Уитни. Различие считали статистически значимым при вероятности ошибки 5% ( $p < 0,05$ ) (Лапач С.Н., 2001).

С целью выявления силы влияния контролируемого фактора (внутривенное введение МСК) на результирующие признаки был проведен однофакторный дисперсионный анализ. Рассчитывали коэффициент детерминации ( $\eta^2$ ) (квадрат корреляционного отношения), который показывал силу влияния контролируемого фактора на изменение результирующего признака (Макарова Н.В., Трофимец В.А., 2002).

**Результаты собственных исследований и их обсуждение.** Имплантация в ББК гидроксилapatита в сравнении с Д-группой сопровождалась двухфазной динамикой изменения морфологических показателей костей, избранных для исследования. К 7 и 15 суткам после операции регистрировалась манифестация угнетения ростовых процессов, функциональной активности эпифизарных хрящей и надкостницы, дестабилизации химического состава и снижения прочности костей. Однако с 30 суток после операции восстановление исследуемых показателей происходит быстрее, чем в Д-группе.

Максимальная сила влияния имплантации ОК-015 в ББК регистрировалась к 60 суткам на изменение содержания первичной спонгиозы в зоне остеогенеза ( $\eta^2=0,991$ ) и диаметров каналов остеонов ( $\eta^2=0,786$ ), а к 90 суткам – на изменение ширины зоны остеогенеза ( $\eta^2=0,619$ ) и ширины остеонного слоя ( $\eta^2=0,571$ ). Это подтверждает заключение о более быстром восстановлении морфологических показателей у животных ОК-группы к 60 и 90 суткам после операции.

Из предшествующих исследований следует, что в ранние сроки эксперимента (7 и 15 сутки) в области имплантации вместе с процессами репаративной регенерации кости активно протекают и процессы биорезорбции гидроксилapatита, на что костная система более активно реагирует изменением своего структурно-функционального состояния (Desborough J. P., 2000). Позже (с 30 и 60 суток) наличие ионов кальция и фосфора в области имплантации позволяет костной системе оптимальнее восстанавливать морфофункциональные характеристики, чем в группе с незаполненной перфорацией (Osipov B. et al., 2018).

Поскольку к 7 и 15 суткам после имплантации гидроксилapatита в ББК определялась манифестация угнетения ростовых процессов, функциональной активности эпифизарных хрящей и надкостницы, дестабилизации химического состава и снижения прочности исследуемых костей, был произведен следующий этап исследования.

В этом случае после имплантации в ББК материала ОК-015 производилось внутривенное введение аллогенных МСК на разных этапах формирования костно-керамического регенерата согласно классификации Н.А. Коржа и Н.В. Дедух (2006).

Внутривенное введение МСК на различных этапах формирования регенерата ББК вне зависимости от срока, прошедшего после операции, сопровождалось признаками сглаживания выявленных отклонений. Однако, введение МСК на 3, 10, 15 сутки после костно-пластической операции сопровождалось выраженным восстановлением исследуемых показателей, при введении МСК на 24 сутки сглаживание негативного влияния условий эксперимента было выражено слабее, а при введении на 45 сутки практически отсутствовало.

При введении МСК через 3 суток после имплантации ОК-015 (1 стадия формирования регенерата, воспаление) ширина диафиза плечевых костей к 7 и 15 суткам превышала значения ОК-группы на 6,03% и 6,50%, а максимальная длина плечевых костей к 7 суткам – на 5,03%. В том случае, когда МСК вводились через 10 суток после имплантации (2 стадия формирования регенерата, формирование клеточной бластемы) было установлено, что показатели остеометрии преобладали над данными ОК-группы с 15 по 90 сутки после операции на 3,22-6,93%. Наконец, при введении МСК через 15 суток после имплантации (3 стадия формирования регенерата, реорганизация тканевых структур и минерализация кости) единичные статистически значимые отличия регистрировались лишь к 30 суткам после операции.

Признаки восстановления темпов роста костей, избранных для исследования, после введения МСК были отражением восстановления функциональной активности эпифизарных хрящей и надкостницы.

Статистически значимые отличия от данных ОК-группы в МСК3-группе регистрировались с 7 по 60 сутки после операции. При этом ширина зоны остеогенеза с 7 по 30 сутки превышала значения ОК-группы на 3,56%, 7,47% и 4,04%, а к 15 суткам после операции количество первичной спонгиозы и остеобластов в зоне остеогенеза превышали значения ОК-группы на 5,61% и 4,63% (Рисунок 1-2).

В МСК10-группе статистически значимые отличия от ОК-группы регистрировались с 15 по 60 сутки после операции. В этом случае ширина зоны остеогенеза к 15 и 30 суткам после операции превышала значения ОК-группы на 8,14% и 4,65%, количество первичной спонгиозы в зоне остеогенеза к 15 суткам – на 5,94%, а количество остеобластов в зоне остеогенеза к 15 и 30 суткам – на 5,36% и 3,90%.

У животных МСК15-группы лишь к 30 суткам после операции количество первичной спонгиозы в зоне остеогенеза превышало значения ОК-группы на 4,03%.

На поперечном срезе середины диафиза плечевых костей животных МСК3-группы ширина слоя наружных генеральных пластинок превышала значения ОК-группы с 7 по 60 сутки после операции на

6,46%, 5,00%, 4,63% и 4,17%, а ширина остеонного слоя к 15 и 30 суткам – на 6,82% и 5,00%. Наконец, к 30 суткам диаметры остеонных каналов уменьшались и отставали от значений ОК-группы на 6,90%.

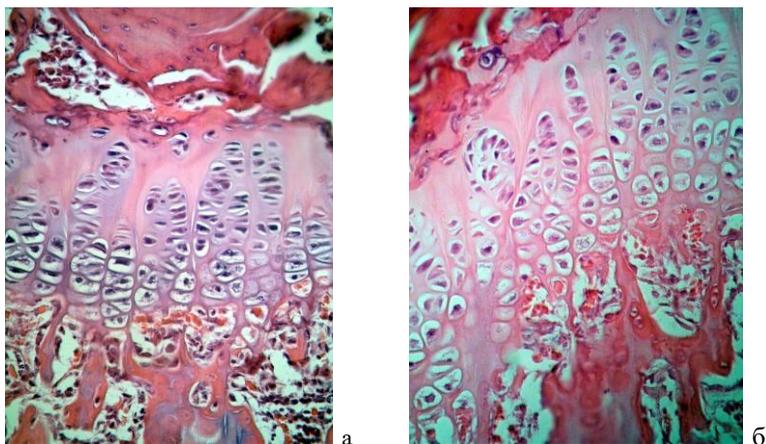


Рисунок 1 - Проксимальный эпифизарный хрящ плечевой кости половозрелых белых крыс подопытных животных ОК-группы (а) и МСК10-группы (б) на 30 сутки эксперимента. Гематоксилин-эозин. Увеличение 200\*

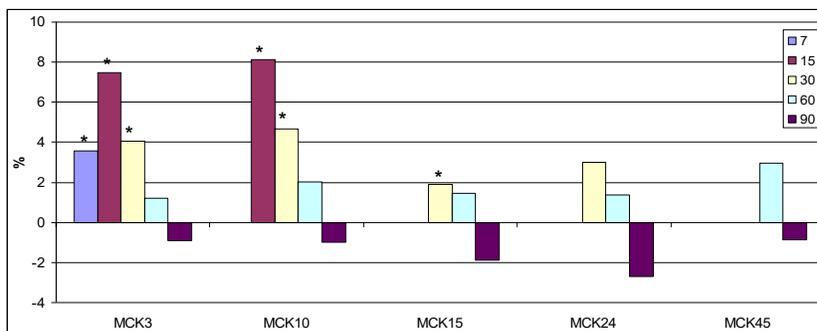


Рисунок 2 – Динамика изменения ширины зоны остеогенеза проксимального эпифизарного хряща плечевых костей после введения МСК в различные сроки формирования регенерата большеберцовых костей (в % по отношению к ОК-группе)

В МСК10-группе ширина остеонного слоя превышала значения ОК-группы с 15 по 60 сутки после операции на 7,11%, 4,87% и 4,71%, а диаметры каналов остеонных к 15 и 30 суткам отставали от значений ОК-группы на 3,74% и 7,85%. В МСК15-группе ширина остеонного слоя превышала значения ОК-группы к 30 суткам после операции на 5,56%, а

диаметры каналов остеонов отставали от значений ОК-группы на 6,51%.

Изменения гистологического строения реактивных отделов исследуемых костей приводили и к изменениям их химического состава.

У животных МСК3-группы содержание минеральных веществ в исследуемых костях с 7 по 30 сутки эксперимента превышало значения ОК-группы на 3,14-3,73%. При этом в минеральном компоненте плечевых костей к 7 суткам после операции содержание кальция и соотношение кальций/фосфор были меньше значений ОК-группы на 6,75% и 9,85%. Но в дальнейшем восстановление химического состава исследуемых костей в МСК3-группе происходило быстрее и содержание меди и цинка к 15 суткам превышало значения ОК-группы на 6,78% и 5,38%, содержание кальция к 30 суткам – на 4,98%, а соотношение кальций/фосфор с 30 по 90 сутки – на 7,67%, 3,41% и 3,52%

В МСК10-группе содержание минеральной составляющей возрастало в плечевой кости с 15 по 30 сутки на 2,86% и 3,98%, а в тазовой кости и грудном позвонке к 30 суткам на 4,31% и 4,55% соответственно. При этом соотношение кальций/фосфор в плечевой кости с 15 по 90 сутки превышало значения ОК-группы на 8,25%, 10,95%, 10,56% и 4,04%. Также, значения ОК-группы превышали: содержание меди с 15 по 90 сутки после операции – на 5,90%, 9,50%, 10,34% и 8,31%, содержание цинка к 15 и 30 суткам – на 5,44% и 8,25% и содержание марганца к 30 суткам – на 10,34%.

В МСК15-группе к 30 суткам содержание минерального компонента в плечевой и тазовой кости, а также грудном позвонке превышало значения ОК-группы на 3,86%, 3,87% и 3,77%. В данной ситуации соотношение кальций/фосфор в плечевой кости к 30 и 60 суткам превышало значения ОК-группы на 9,18% и 4,41%, а содержание меди к 60 суткам – на 5,23%.

Изменения химического состава исследуемых костей у животных МСК-групп приводили к изменениям их прочности.

У животных МСК3-группы к 15 суткам после операции разрушающий момент и модуль упругости отставали от значений ОК-группы на 7,12% и 5,43%. Но к 30 суткам минимальная работа разрушения уже превышала значения ОК-группы на 4,71%. В МСК10-группе к 15 суткам после операции разрушающий момент отставал от значений ОК-группы на 6,46%, но к 30 суткам минимальная работа разрушения уже превышала значения ОК-группы на 5,96%. Наконец, в МСК15-группе лишь к 30 суткам минимальная работа разрушения кости превышала значения сравнения на 6,38%.

Таким образом, введение аллогенных МСК в хвостовую вену в различные сроки после имплантации в ББК материала ОК-015 в

сравнении с ОК-группой сопровождается признаками восстановления темпов роста исследуемых костей, гистологической структуры проксимальных эпифизарных хрящей и диафиза плечевых костей, восстановлением химического состава и прочностных характеристик. При введении МСК на 3 сутки после имплантации данные явления регистрируются преимущественно через 15 и 30 суток от начала эксперимента, при введении МСК на 10 сутки после имплантации как правило с 15 по 60 сутки, а при введении МСК на 15 суток - к 30 суткам после операции. При введении МСК на 24 и 45 сутки после имплантации признаки восстановления исследуемых морфологических показателей выражены в значительно меньшей степени.

Следует полагать, что внутривенное введение МСК оптимизирует репаративную регенерацию кости и процессы резорбции имплантата. Этот эффект может быть обусловлен как непосредственным влиянием введенных клеток, так и их секреторной активностью.

МСК обладают способностью напрямую дифференцироваться в остеобласты и хондроциты, хотя количество этих МСК ограничено (Hu L. et al., 2018). Также МСК обладают паракринными эффектами, которые заключаются в секреции целого ряда факторов, таких как цитокины, факторы роста костей, хемокины, необходимых для симуляции ангиогенеза и остеогенеза (Han Y., et al., 2018). Доказано также, что МСК обладают высокими иммуносупрессивными функциями, которые зависят не от прямого контакта с иммунными клетками, а от узнавания МСК моноцитными клетками и вызова фагоцитоза макрофагов (Qua G. et al., 2018). Кроме того, МСК могут модулировать воспалительное микроокружение в области дефекта и снижать уровни интерлейкина (IL)-1 $\beta$ , IL-6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Fan X.-L. et al., 2020). Также взаимодействие МСК с эндотелиальными клетками, лимфоцитами и аксонами позволяет интегрировать нейрогуморальные сигналы, которые регулируют физиологическую и репаративную регенерацию тканей (Knight, M. N. et al., 2013).

В таком случае внутривенное введение МСК в первую очередь, вероятно, оптимизирует течение процессов репаративной регенерации в  $\ll R$ , а следовательно, усиливает в ранние сроки после операции резорбтивные процессы в скелете. Позднее комплекс факторов роста, продуцируемых МСК, восстанавливает костеобразовательную активность реактивных отделов костей, дистантно удаленных от места повреждения. Это, в свою очередь, приводит к восстановлению структуры эпифизарных хрящей и компактного вещества диафизов, восстановлению роста, минерализации, а затем, и прочности исследуемых костей.

Более высокая эффективность введения МСК на ранних сроках

эксперимента – на 3, 10 и 15 сутки после нанесения дефекта <<R (стадии воспаления, формирования клеточной бластемы и реорганизации тканевых структур и минерализации регенерата), вероятно, может быть объяснена тем, что атрибуты оптимизирующего влияния на процессы репаративной регенерации в эти сроки выше, чем при введении МСК на 24 и 45 сутки (стадии ремоделирования и исхода).

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ подтвердил выявленные методами вариационной статистики закономерности.

Внутривенное введение аллогенных МСК костно-мозгового происхождения на 3 сутки после имплантации в ББК гидроксилapatита достоверно влияло на изменение показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей с 7 по 60 сутки и на изменение структуры диафиза с 15 по 90 сутки после операции. При введении МСК на 10 сутки после имплантации достоверное влияние контролируемого фактора на изменение показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей регистрировалось с 15 по 60 сутки, а на изменение структуры диафиза с 15 по 90 сутки после операции. Наконец, при введении МСК на 15 сутки после имплантации достоверное влияние контролируемого фактора на изменение показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей регистрировалось к 30 и 60 суткам и на изменение структуры диафиза с 30 по 90 сутки после операции. При введении МСК на 24 и 45 сутки после имплантации достоверное влияние контролируемого фактора регистрировалось в единичных случаях.

Максимальная сила влияния контролируемого фактора при введении МСК на 3 сутки после имплантации регистрировалась к 7 суткам на изменение количества остеобластов в зоне остеогенеза ( $\eta^2=0,573$ ), а к 30 суткам на изменение ширины зоны пролиферирующих хондроцитов ( $\eta^2=0,685$ ), ширины слоя внутренних генеральных пластинок ( $\eta^2=0,781$ ) и диаметров каналов остеонов ( $\eta^2=0,667$ ). При введении МСК на 10 сутки после имплантации максимальная сила влияния контролируемого фактора регистрировалась к 15 суткам на изменение ширины зоны остеогенеза ( $\eta^2=0,659$ ), к 30 суткам на изменение диаметра каналов остеонов ( $\eta^2=0,726$ ) и ширины слоя внутренних генеральных пластинок ( $\eta^2=0,673$ ), а к 60 суткам – на изменение содержания первичной спонгиозы в зоне остеогенеза ( $\eta^2=0,986$ ). Наконец, при введении МСК на 15 сутки после имплантации максимальная сила влияния контролируемого фактора регистрировалась к 30 суткам на изменение диаметра каналов остеонов ( $\eta^2=0,619$ ), ширины слоя внутренних

генеральных пластинок ( $\eta^2=0,724$ ) и ширины зоны индифферентных хондроцитов ( $\eta^2=0,576$ ), а к 60 суткам – на изменение содержания спонгиозы в зоне остеогенеза ( $\eta^2=0,991$ ).

Таким образом, максимальная степень влияния внутривенного введения аллогенных МСК костно-мозгового происхождения на изменение результативных признаков регистрировалась при их введении на 10 сутки (стадия формирования клеточной бластемы). Исходя из этого оптимальным сроком для внутривенного введения МСК с целью восстановления структурно-функционального состояния дистантно удаленных от локуса повреждения костей являются 10 сутки после костно-пластической операции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе решена актуальная научная задача – установлены морфо-функциональные особенности костей скелета после имплантации в ББК гидроксилapatита и внутривенном введении МСК, поэтапно, в зависимости от стадии формирования костного регенерата. Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы.

1. Введение аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в хвостовую вену в различные сроки после имплантации в ББК материала ОК-015 в сравнении с группой без применения МСК сопровождается признаками восстановления темпов роста исследуемых костей (плечевой, тазовой, а также двенадцатого грудного позвонка), гистологической структуры проксимальных эпифизарных хрящей и диафиза плечевых костей. Степень восстановления исследуемых морфологических параметров зависит от сроков введения МСК.

При введении МСК на 3 сутки после имплантации (стадия воспаления) данные явления регистрируются через 15 и 30 суток от начала эксперимента, при введении МСК на 10 сутки (стадия формирования клеточной бластемы) как правило с 15 по 60 сутки, а при введении МСК на 15 сутки (стадия реорганизации тканевых структур и минерализации кости) - к 30 суткам после операции. При введении МСК на 24 и 45 сутки после имплантации признаки восстановления исследуемых морфологических показателей выражены в значительно меньшей степени.

2. Основные признаки восстановления структурно-функционального состояния проксимальных эпифизарных хрящей и надкостницы плечевых костей в наибольшей степени регистрируются на 15 сутки после операции при введении МСК на 10 сутки после имплантации и проявляются в увеличении ширины зоны остеогенеза на 8,14%, количества первичной спонгиозы в ней на 5,94%, ширины остеонного

слоя на 6,82% и в уменьшении диаметров каналов остеонов на 6,90%.

3. Введение аллогенных МСК костно-мозгового происхождения в различные сроки после имплантации в ББК материала ОК-015 в сравнении с группой без применения МСК сопровождается восстановлением химического состава исследуемых костей и прочностных характеристик плечевых костей. В наибольшей степени признаки восстановления химического состава исследуемых костей и прочности плечевых костей регистрируются на 30 сутки после операции при введении МСК на 10 сутки после имплантации и проявляются в увеличении соотношения/кальций фосфор и содержания меди в плечевой кости на 10,95% и 9,50%, а также в возрастании минимальной работы разрушения плечевой кости на 6,38%.

4. По результатам однофакторного дисперсионного анализа наиболее продолжительное влияние МСК регистрировалось при их введении на 10 сутки после имплантации гидроксилапатита в ББК: с 15 по 60 сутки после операции на изменение морфометрических показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей, и с 15 по 90 сутки на изменение структуры диафиза. При введении МСК на 24 и 45 сутки после имплантации достоверное влияние контролируемого фактора регистрировалось в единичных случаях.

5. Наибольшая сила влияния контролируемого фактора регистрировалась при введении МСК на 10 сутки после имплантации и была максимальной к 30 суткам на изменение диаметра каналов остеонов ( $\eta^2=0,619$ ), ширины слоя внутренних генеральных пластинок ( $\eta^2=0,724$ ) и ширины зоны индифферентных хондроцитов ( $\eta^2=0,576$ ), а к 60 суткам – на изменение содержания спонгиозы в зоне остеогенеза ( $\eta^2=0,991$ ).

6. Исходя из того, что в максимальной степени влияние аллогенных МСК костно-мозгового происхождения на изменение результативных признаков регистрировалось при их введении на 10 сутки (стадия формирования клеточной бластемы), оптимальным сроком для внутривенного введения МСК с целью восстановления структурно-функционального состояния дистантно удаленных от локуса повреждения костей являются 10 сутки после костно-пластической операции.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Сведения о морфофункциональных и компенсаторно-приспособительных изменениях в костной системе половозрелых белых крыс, после имплантации в ББК гидроксилапатита и внутривенном введении МСК на разных этапах формирования регенерата ББК расширяют и углубляют представления о реакции костной системы на

влияние эндогенных факторов и позволяют оценить общую направленность адаптационных изменений в скелете. Полученные результаты дополняют соответствующие разделы учебного материала на кафедрах анатомии человека, гистологии, цитологии и эмбриологии, биологической химии, биологии, а также травматологии и ортопедии.

2. Так как внутривенное введение МСК на ранних стадиях формирования регенерата ББК сопровождается более быстрым восстановлением исследуемых морфологических показателей костей скелета, по сравнению с группой, где наносился дефект без введения МСК, результаты исследования могут быть направлены на лучшее понимание регуляции работы эндогенных МСК при заживлении переломов, а также при восстановлении после костно-пластических операций.

### **Основные научные публикации по теме диссертационного исследования**

#### ***Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК при МОН ЛНР для публикации основных результатов диссертационных исследований***

1. Пащенко, Н.А. Прочность плечевых костей после имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatитного материала ОК-015 и внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток на разных стадиях формирования костного регенерата / Н.А. Пащенко, В.И. Лузин // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии. - 2022. - Выпуск 2 (170). – С. 29-36.

2. Характеристика культуры мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения, ее идентификация, оценка жизнеспособности и пролиферативной активности / Е.В. Демьяненко, И.В. Соловьева, В.В. Бибик, Д.А. Василенко, В.В. Головченко, К.Р. Исмаилова, С.Е. Оберемок, А.А. Панкратьев, Н.А. Пащенко, А.М. Пилавов, Ю.А. Провизион, А.Н. Серкина, С.Ю. Труфанов, М.С. Труфанова, И.Р. Фролов, Я.В. Шевчук // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2021. – Том 19, №3. – С. 57-61.

3. Пащенко, Н.А. Структура середины диафиза плечевых костей после имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatитного материала ОК-015 и внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток на разных стадиях формирования костного регенерата / Н.А. Пащенко, В.И. Лузин // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2021. – Том 19, №3. – С. 75-80.

4. Пащенко, Н.А. Темпы роста костей скелета после имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatитного материала ОК-015 и

внутривенном введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на разных стадиях формирования костного регенерата / Н.А. Пашенко, С.Н. Федченко // Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии. - 2022. - Выпуск 6 (174). – С. 47-55.

5. Пашенко, Н.А. Структурное состояние проксимального эпифизарного хряща плечевых костей после имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatита и введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на разных стадиях формирования костного регенерата / Н.А. Пашенко, А.В. Торба, С.Н. Федченко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2022. – Том 20, №4. – С.100-106.

6. Пашенко, Н.А. Микроэлементный состав плечевых костей после имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatита и введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на разных стадиях формирования костного регенерата / Н.А. Пашенко, А.В. Торба, С.Н. Федченко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2023. – Том 21, №1. – С.10-16.

7. Пашенко, Н.А. Оценка влияния имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatита и введения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на структурно-функциональное состояние реактивных отделов скелета / Н.А. Пашенко // Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. – 2023. – Том 21, №2. – С.22-28.

### ***Статьи в журналах, сборниках научных трудов и материалов конференций***

8. Пашенко, Н.А. Минеральный состав костей скелета при имплантации в большеберцовые кости гидроксилapatитного материала ОК-015 и внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток на ранней стадии формирования регенерата / Н.А. Пашенко, В.И. Лузин, Е.В. Зинченко // Научное наследие российских морфологических школ: материалы научной конференции, посвященной 150-летию со дня рождения профессора Г. М. Иосифова; ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н. Н. Бурденко; ФГБОУ ВО СибГМУ. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2020. – С. 119-123.

9. Зинченко, Е.В. Химический состав костей после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015 и внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток на 24-е сутки после операции / Е.В. Зинченко, Н.А. Пашенко, Е.А. Стаценко // Актуальные вопросы биологии и медицины : Материалы Открытой студенческой научной конференции (12 апреля 2021 г., г. Луганск) / Под ред. П.К. Бойченко, М.В. Воронова. – Луганск: Книга, 2021. – С. 82-86.

*Доклады на научных конференциях*

10. Астраханцев, Д.А. Химический состав плечевых костей при внутривенном введении мезенхимальных стволовых клеток на 15-е сутки после имплантации в большеберцовые кости гидроксилатапатитного материала ОК-015 / Д.А. Астраханцев, Н.А. Пашченко, Е.Ю. Шутов // VIII Международный молодежный научный медицинский ФОРУМ «Белые цветы», посвященный 120-летию студенческого научного общества имени Ирины Андреевны Студенцовой: Сборник статей по итогам конференции. Казань, 14 – 16 апреля 2021 г. / Под общей редакцией проректора Казанского ГМУ д.м.н., проф. Д.И. Абдулганиевой. – Казань, 2021. – С. 1126-1127.

11. Strength of the humerus in rats after implantation of ОК-015 into the tibia and iv administration of mesenchymal stem cells on the 24th day after intervention / N. Pashchenko, V. Luzin, I. Frolov, Y. Venidiktova // Osteoporosis International. – 2021. - Vol. 32, Supplement 1. – P. P701.

12. Прочность плечевых костей после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015 и внутривенного введения мезенхимальных стволовых клеток на 24-е сутки после операции / Е.В. Зинченко, Н.А. Пашченко, Е.А. Стаценко, И.Р. Фролов // Роль инновационных технологий в медицинском образовательном процессе фундаментальных дисциплин и клинической медицины: материалы международной научно-практической конференции (г. Самарканд, 6 мая 2021 г.) / отв. ред. Ризаев Ж.А. - Самарканд: СамГосМИ, 2021. – С. 54-55.

13. Strength of the humerus after implantation of hydroxyapatite material ОС-015 into the tibia and intravenous administration of allogenic mesenchymal stem cells on the 15th day after intervention / N. Pashchenko, I. Frolov, E. Zinchenko, [et al.] // 22<sup>nd</sup> World congress on osteoporosis, osteoarthritis and musculoskeletal diseases. Abstract book (Berlin, March 24-27, 2022). - P906.

14. Strength of the humerus after implantation of hydroxyapatite material ОС-015 into the tibia and intravenous administration of allogenic mesenchymal stem cells on the 15<sup>th</sup> day after intervention / N. Pashchenko, I. Frolov, E. Zinchenko, [et al.] // Aging Clin Exp Res. – 2022. – Vol. 34 (Suppl 1). – P. S420.

15. Strength of the humerus after implantation OF ОС-015 into the tibia and intravenous administration of mesenchymal stem cells on the 10th day after intervention / N. Pashchenko, I. Frolov, E. Zinchenko, V. Luzin // Abstract Book WCO-IOF-ESCEO. Barcelona, Spain. May 4-7, 2023. – P930.

## АННОТАЦИЯ

**Пащенко Н.А. Морфогенез скелета при внутривенном введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток и имплантации гидроксилапатита в большеберцовые кости (анатомо-экспериментальное исследование). – Рукопись.**

Диссертация на соискания ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – Анатомия человека (медицинские науки). – ФГБОУ ВО ЛГМУ им. Свт. Луки Минздрава России, Луганск, 2023.

Диссертационная работа посвящена изучению морфогенеза костной системы после имплантации в большеберцовые кости гидроксилапатита и внутривенном введении аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костно-мозгового происхождения в разные сроки. Введение мезенхимальных стволовых клеток после костно-пластической операции в сравнении с группой, где имплантация гидроксилапатита проводилась без введения МСК, сопровождается восстановлением темпов роста костей скелета и морфофункционального состояния эпифизарных хрящей и надкостницы, а также их химического состава и прочности. Наиболее эффективно введение мезенхимальных стволовых клеток на 10-е сутки после операции.

**Ключевые слова:** костная система, морфогенез, костный дефект, гидроксилапатит, аллогенные мезенхимальные стволовые клетки.

## SUMMARY

**Pashchenko N.A. Morphogenesis of the skeleton under effect of intravenous allogenic mesenchymal stem cells and implantation of hydroxyapatite into th tibiae (anatomical experimental study). - Manuscript.**

Dissertation for the degree of Candidate of Medical Sciences in specialty 14.03.01 – Human anatomy (medical sciences). - FSBEI HI ST. LUKA LSMU of MOH of Russia.

The dissertation is dedicated to studying of morphogenesis of the skeletal system after implantation of hydroxyapatite into the tibia and intravenous injections of allogenic mesenchymal stem cells taken from bone marrow at different observation terms. Administration of mesenchymal stem cells after bone plastic surgery compared with the group without stem cells application results in restoration of bone growth rate, morphofunctional state of growth plates and periosteum, chemical contents and strength. Injections of mesenchymal stem cells on the 10<sup>th</sup> day are the most effective.

**Key words:** skeletal system, morphogenesis, bone defect, hydroxyapatite, allogenic mesenchymal stem cells.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- Д-группа – животные, которым наносили сквозной дефект в проксимальном отделе диафиза большеберцовой кости;
- К-группа – контрольные животные;
- МСК – аллогенные мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения;
- МСК3 – животные, которым АМСК вводили на 3-и сутки после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015;
- МСК10 – животные, которым АМСК вводили на 10-е сутки после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015;
- МСК15 – животные, которым АМСК вводили на 15-е сутки после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015;
- МСК24 – животные, которым АМСК вводили на 24-е сутки после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015;
- МСК45 – животные, которым АМСК вводили на 45-е сутки после имплантации в большеберцовые кости материала ОК-015;
- ОК-группа – животные, которым имплантировали в большеберцовые кости материала ОК-015.

Подписано в печать \_\_.\_\_\_\_\_.2023 г.  
Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Гарнитура Times.  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 1.0.  
Тираж 100 экз. Заказ № \_\_\_\_.  
Цена договорная.

Отпечатано в  
типографии издательства «Шико»  
на цифровом комплексе Rank Xerox DocuTech 135.  
291490, г. Луганск, пос. Тепличное, ул. Совхозная, д. 4а, кв. 6,  
тел. +7959-874-16-76.