

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького.

Серія: Ветеринарні науки

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies.

Series: Veterinary sciences

ISSN 2518–7554 print

ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet10205

<https://nvlvet.com.ua/index.php/journal>

UDC 636.7.09:616-001.5/.073:591.83/.84

Dynamics of cytokines in osteosis splinter fractures replacement in dogs with hydroxyapatite ceramics silicon-doped

M. V. Rublenko¹, V. A. Chemerovskiy¹, N. V. Ulyanchich², A. N. Savchuk³, T. I. Hgalenova³, N. G. Raksha³

¹Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

²Institute for Problems in Material Science NASU, Kyiv, Ukraine

³Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine

Article info

Received 03.03.2021

Received in revised form

05.04.2021

Accepted 06.04.2021

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, pl. 8/1 Soborna, 09117 Ukraine. Tel.: +38-097-034-01-15 E-mail: valerii.chemerovskiy@btsau.edu.ua

Institute for Problems in Material Science NASU, Krzhyzhanovskoho Str., 3, Kyiv, 03142, Ukraine.

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska Str., 60, Kyiv, 01033, Ukraine.

Rublenko, M. V., Chemerovskiy, V. A., Ulyanchich, N. V., Savchuk, A. N., Halenova, T. I., Raksha, N. G. (2021). Dynamics of cytokines in osteosis splinter fractures replacement in dogs with hydroxyapatite ceramics silicon-doped. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 23(102), 29–36. doi: 10.32718/nvlvet10205

Among the entire public of fractures of long bones, more complications of reparative osteogenesis occur fragmental fractures. Their significant defects, which arise as a result of the removal of non-viable fragments, cause disturbances in local hemodynamics and microcirculation and loss of osteoconduction in the area of injury, lead to a loss of the reparative potential of bone tissue in the defect zone, and the methods of osteosynthesis do not provide restoration of osteoconduction and do not have osteointegration properties. For osteosis, a number of composite materials have been proposed, among which ceramics based on calcium phosphates are considered the most promising, which is confirmed by previous clinical, radiological and histomorphological studies. The aim of the study is to determine the dynamics of the blood levels of TGF- β and interleukins IL-1 β and IL-10 for osteosis replacement of splinter bone fractures in dogs with calcium phosphate ceramics doped with silicon. Material and research methods: a control ($n = 7$) and research group ($n = 7$) dogs with accidental splinter fractures of long bones were formed. In both groups, extracortical osteosynthesis was performed with a support plate from an unalloyed titanium alloy. In the control group, bone defects were left to heal under a blood clot, and in the experimental group they were replaced with ceramics (GTIKg-3). Blood samples were taken after trauma no later than on the 48th day, and on the third, twelfth, twenty-first, forty-second and 60th days after surgical treatment. The enzyme immunoassay was used to determine the serum levels of interleukins IL-1 β and IL-10 and transforming growth factor (TGF- β) what for a bureta reaction is a bit of a home-made bottle. The study results showed an anti-inflammatory cytokine profile with physiological norms in dogs. In case of bone injury, it becomes pro-inflammatory in nature, triggers the process of osteoresorption in the fracture area. At the same time, during reparative osteogenesis after extracortical osteosynthesis for splinter fractures, proinflammatory cytokinemia acquires a permanent character with a peak on the forty-second day, and this implies inhibition of metaplasia of cartilaginous regenerate into bone, that is, it slows down the consolidation of the fracture. However, in the case of osteosis with ceramics, the level of pro-inflammatory cytokinemia is significantly lower and continues during the first 12 days with a peak on the third day, during the inflammatory-resorptive stage. However, the key in understanding the effectiveness of osteosis was the dynamics of TGF- β , which showed its biphasic hyperreactivity in control animals, while in experimental animals, its balanced production was noted. Conclusion. Osteosis replacement of bone defects in long tubular bones in dogs with hydroxyapatite with β -tricalcium phosphate ceramics doped with silicon is accompanied by moderate cytokinemia in accordance with the course of the inflammatory-resorptive stage and the phase of remodeling with a peak of induction of transforming growth factor during the period of active osteogenesis forty-second course of reparative osteogenesis.

Key words: interleukins, composite materials, splinter bone fractures, reparative osteogenesis, transforming growth factor.

Динаміка цитокінів за остеозаміщення осколкових переломів у собак гідроксиапатитною керамікою, легованою кремнієм

М. В. Рубленко¹, В. О. Чемеровський¹, Н. В. Ульянич², О. М. Савчук³, Т. І. Галенова³, Н. Г. Ракша³

¹Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква, Україна

²Інститут проблем матеріалознавства ім. І. Н. Францевича, м. Київ, Україна

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ, Україна

Серед переломів довгих трубчастих кісток найбільше ускладнень репаративного остеогенезу відбувається за осколкових переломів. Їх значні дефекти, які виникають внаслідок видалення нежиттєздатних осколків, зумовлюють порушення локальної гемодинаміки і мікроциркуляції та втрату остеокондуктивності у ділянці травми, що призводить до втрати репаративного потенціалу кісткової тканини у зоні дефекту, а методи остеосинтезу не забезпечують відновлення остеокондуктивності та не володіють остеоінтеграційними властивостями. Для остеозаміщення запропонована низка композитних матеріалів, серед яких найбільш перспективною вважається кераміка на основі фосфатів кальцію, що підтверджується попередніми клініко-рентгенологічними і гісто-морфологічними дослідженнями. Мета дослідження – визначити динаміку вмісту в крові TGF- β та інтерлейкінів IL-1 β і IL-10 за остеозаміщення осколкових переломів кісток у собак кальціє-фосфатною керамікою, легованою кремнієм. Сформували контрольну (n = 7) та дослідну групи (n = 7) собак з випадковими осколковими переломами довгих трубчастих кісток. В обох групах виконували екстракортикальний остеосинтез опорною пластиною із нелегованого титанового сплаву. В контрольній групі кісткові дефекти залишали заговатися під кров'яним зусунком, а в дослідній їх заміщували керамікою (ГТлКг-3). Проби крові відбирали після травми не пізніше 48-ї доби, та на 3-ю, 12-у, 21-у, 42-у та 60-у добу після оперативного лікування. Імуноферментним методом визначали вміст у сироватці крові інтерлейкінів IL-1 β та IL-10 і трансформуючого фактору росту (TGF- β), та за біуретовою реакцією кількість загального білка. Результати дослідження засвідчили протизапальний цитокіновий профіль за фізіологічної норми у собак. За умов кісткової травми він набуває прозапального характеру, що запускає процес остеорезорбції у ділянці перелому. Водночас за репаративного остеогенезу після екстракортикального остеосинтезу за осколкових переломів прозапальна цитокінемія набуває перманентного характеру з піком на 42-у добу, а це свідчить про гальмування метаплазії хрящового регенерату в кістковій, тобто уповільнює консолідацію перелому. Однак у випадку остеозаміщення керамікою рівень прозапальної цитокінемії достовірно менший і триває протягом перших 12-и діб з піком на 3-ю добу, у період запально-резорбтивної стадії. Проте ключовою в розумінні ефективності остеозаміщення виявилася динаміка TGF- β , яка засвідчила двофазну його гіперреактивність у контрольних тварин, тимчасом як у дослідних виявляли урівноважену його продукцію. Остеозаміщення кісткових дефектів довгих трубчастих кісток у собак гідроксиапатитною з β -трикальцій фосфатом керамікою, легованою кремнієм, супроводжується помірною цитокінемією відповідно до перебігу запально-резорбтивної стадії та фази ремоделювання з піком індукції трансформуючого фактора росту в період активного остеогенезу (42-а доба), що відображає оптимізований перебіг репаративного остеогенезу.

Ключові слова: інтерлейкіни, композитні матеріали, осколкові переломи кісток, репаративний остеогенез, трансформуючий фактор росту.

Вступ

Переломи кісток вільних кінцівок та осьового скелету, новоутворення кісток та їх ускладнення, за даними вітчизняних і зарубіжних дослідників, можуть складати до 65–85 % від загальної кількості травм і хвороб апарату руху (Rublenko & Eroshenko, 2012; Teljatnikov, 2013; Nojiria et al., 2015; Libardoni et al., 2016). При цьому особливу складність становлять осколкові переломи, насамперед ускладнені кістковими дефектами, що суттєво гальмує процес репаративного остеогенезу. Власне такі переломи у собак можуть займати до 25–60 % у структурі фрактур (Haaland et al., 2009; Reznik et al., 2019). Значні за об'ємом кісткові дефекти зумовлюють (Jiliang & David, 2014) порушення локальної гемодинаміки і мікроциркуляції та втрату остеокондуктивності у ділянці травми. Водночас ні один із методів остеосинтезу чи використання різноманітних конструкцій не забезпечують відновлення остеокондуктивності та не володіють остеоінтеграційними властивостями для відновлення репаративного потенціалу кісткової тканини у зоні дефекту. В зв'язку з цим застосування губчастої аутокістки, яка за своїми властивостями володіє остеогенними, остеоіндуктивними і остеокондуктивними характеристиками, вважається золотим

стандартом кісткової аутопластики (Abd El Raouf et al., 2017; Alireza et al., 2017), але водночас має низку вагомих недоліків. Це потреба в додатковому оперативному доступі з подальшим нанесенням травми для відбору аутоімпланта, обмежена кількість такого пластичного матеріалу, можливі післяопераційні ускладнення в ділянці забору аутокістки (Finkemeier, 2002; Dubrov et al., 2019).

Зважаючи на недоліки губчастої аутокістки, на сьогодні запропонована низка композитних матеріалів на різних основах, зокрема це склокераміка, колаген, природні та синтетичні полімери, α -трикальційфосфат, β -трикальційфосфат, гідроксиапатит та їхні комбінації (Malyschkina et al., 2014; Rahmati et al., 2018; Reznik et al., 2019; Marcela et al., 2020). Своєю чергою остеопластичні матеріали повинні бути біосумісними, не токсичними, здатними до поступової резорбції, володіти відносною простотою у стерилізації та можливістю моделювання під час заповнення дефекту матеріалом, мати подібну до кісткової тканини структуру мікропор, які забезпечували б ранню міграцію клітин і сприяли б ранньому ангіогенезу, що оптимізує загоєння за вторинним натягом (Nandi et al., 2008). Цим вимогам поки що найбільшою мірою серед інших композитних матеріалів відповідає кераміка на основі фосфатів кальцію, оскільки

вони присутні у кістковій тканині як основний неорганічний компонент, забезпечують міцність кістяка та вважаються біоактивними (Oliveira et al., 2017; Uljanchich, 2021). Водночас їх використання потребує суттєвого патофізіологічного обґрунтування, оскільки у ветеринарній ортопедії їх використання залишається недостатньо опрацьованим з позиції видових особливостей гістоморфології кісткової тканини, біомеханіки переломів та їх нозологічних характеристик.

Після виникнення перелому порушується цілісність, руйнується архітектура кісткової тканини і втрачається її кровопостачання, що призводить до порушення механічної стабільності кістки у зоні перелому, особливо у випадку осколкових переломів, що унеможливує їх консолідацію за первинним натягом (Chelsea et al., 2019). Репаративна регенерація кісток включає послідовні, довготривалі у часі стадії, які можуть значно подовжуватись у часі особливо за об'ємних кісткових дефектів та за нераціонально проведеного остеосинтезу. В її основі лежать складні та взаємопов'язані патофізіологічні й патоморфологічні процеси, які регулюються системними (гормони щитовидної та паращитовидної залози і статеві, глюкокортикоїди та інсулін) і локальні (цитокіни, простагландини, різноманітні фактори росту), що загалом забезпечує унікальну здатність кісткової тканини до ідентичного відновлення у місці перелому (Korzh et al., 2006). Хоча в загальнобіологічному аспекті роль цих факторів у репаративному процесі відома, проте в клінічному вона мало вивчена, що не завжди дозволяє об'єктивно оцінити ефективність методів лікування переломів з позиції доказової медицини.

Зокрема, низка цитокінів прозапальної та проти-запального спектру дії (IL-1, IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α) впливають на різні етапи репаративного остеогенезу шляхом стимуляції формування хрящового мозоля, ангиогенезу та диференціювання остеобластів і остеокластів через механізми запальної реакції та проліферації. Так, прозапальні цитокіни (IL-1, IL-1 β , IL-6, фактор некрозу пухлин TNF) зумовлюють кісткову резорбцію через індукцію дозрівання і активації остеокластів. Їх антагоністи, протизапальні цитокіни (IL-4, IL-10 та IL-13), навпаки пригнічують активність остеокластів та сприяють регенерації кісток (Grignani & Maiolo 2000; Kunder et al., 2007; Andrieu, 2014). Проте за репаративного остеогенезу можливий розвиток дисбалансу прозапальних та протизапальних цитокінів, що суттєво впливає на якість консолідації перелому аж до розвитку ускладнень (Nikitin et al., 2007).

Інша специфічна група біологічно активних речовин відома як фактори росту, які стимулюють остеогенез на різних стадіях консолідації перелому. До них належать: кісткові морфогенетичні білки (bone morphogenetic proteins – BMPs), трансформуючий фактор росту (transforming growth factor – TGF- β), тромбоцитарний фактор росту (platelet-derived growth factor – PDGF), фактор росту фібробластів (fibroblast growth factor – FGF), інсуліноподібний фактор росту (insulin-like growth factors – IGF), диференціюючий фактор росту (growth and differentiation factors – GDF-

1, 5, 8, 10) (Dohan et al., 2006; Pascale et al., 2015; Kostiv et al., 2017). Ці фактори росту впливають на процеси проліферації кісткової тканини через індукцію диференціювання остеобластів із клітин попередників та міграції клітин у травмовані ділянки тканин. Зокрема, TGF- β у великій кількості присутній у тромбоцитах, стимулює міграцію мезенхімальних стовбурових клітин і їх диференціювання та хондрогенез і ендохондральну осифікацію (Goljuk et al., 2019).

Попередніми дослідженнями було встановлено (Eroshenko, 2013), що перша стадія репаративного остеогенезу супроводжується надмірною запальною реакцією із підвищенням рівня білків гострої фази (гаптоглобіну, церулоплазміну, фібриногену, С-реактивного білка), що негативно впливає на регенеративні процеси, подовжуючи консолідацію перелому навіть за простих переломів. Також встановлено (Shaganenko, 2012), що протягом двох тижнів після травми розвивається ендотеліальна дисфункція, із зниженням NO, що негативно впливає на формування судинної сітки у місці перелому, подовжуючи репаративні процеси. Також нами встановлено (Rublenko et al., 2020), що заміщення кісткових дефектів за осколкових переломів трубчастих кісток у собак керамікою на основі гідроксиапатиту і β -трикальційфосфату, легованої кремнієм, репаративний остеогенез прискорюється в 1,5 раза за рахунок скорочення його запально-резорбтивної стадії та прискорення проліферативної, головним чином з боку ендоосту з ранньою мінералізацією кісткового регенерату.

На жаль, роль зазначених цитокінів та фактора росту TGF- β в клінічному аспекті репаративного остеогенезу та в оцінці остеозаміщення кальціє-фосфатними композитними матеріалами мало відома, що стало підставою для проведення даного дослідження.

Мета і завдання дослідження – визначити динаміку вмісту в крові TGF- β та інтерлейкінів IL-1 β і IL-10 за остеозаміщення осколкових переломів кісток у собак кальціє-фосфатною керамікою, легованою кремнієм.

Матеріал і методи досліджень

Усі дослідження проводились за згоди власників тварин та відповідно до Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 28.03.2006 р. № 27, ст. 230 і Правил Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях від 18.03.1986 р. № 994_137. та Наказу МОН № 416/20729 від 16 березня 2012 р. “Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах”. Проект цих досліджень був схвалений Етичним комітетом Білоцерківського національного аграрного університету з питань поводження у тваринами у наукових дослідженнях та освітньому процесі (висновок № 2 від 31.05.18 р., протокол № 1).

Дослідження виконували на собаках (n = 14) із випадковими осколковими переломами довгих трубчастих кісток, які надходили протягом 2018–2019 років у

навчально-науково виробничу міжкафедральну ветеринарну клініку коней, жуйних, свиней, дрібних та екзотичних тварин факультету ветеринарної медицини Білоцерківського НАУ. Найбільша частка осколкових переломів виникла внаслідок травм, нанесених автомобільним транспортом – 64 % (n = 9), меншу частку становили переломи, зумовлені травмуванням іншими тваринами – 22 % (n = 3) і 14 % (n = 2) – з причин, недостатньо верифікованих власниками собак.

Травмованих тварин розділили на контрольну (n = 7) та дослідну групи (n = 7). Діагноз на перелом кісток передпліччя, голілки і стегнової встановлювали за клінічними ознаками та на підставі рентгенологічних досліджень, проведених на рентгенапараті РУМ-20. Рентгензнімки відцифровували на електронний носій (AGFA. Healthcare N.V. CR 10-X, Німеччина). За оперативного втручання анестезіологічне забезпечення включало внутрішньом'язове введення для премедикації медетомідину (20 мкг/кг) та “бутоллар зоо” (буторфанолу тартрат (0,1 мг/кг) для анальгезії, після чого виконували епідуральну анестезію 2 % розчином лідокаїну (3 мг/кг). Для підтримання анестезії вводили внутрішньовенно розчин тіопенталу натрію (7 мг/кг). В обох групах виконували екстракритичальний остеосинтез опорною пластиною із нелегованого титанового сплаву. В контрольній групі кісткові дефекти залишали загоюватись під кров'яним згустком, а у дослідній заміщували керамікою (ГТлКг-3). У післяопераційний період тваринам призначали внутрішньом'язово цефтріаксон протягом 7-ми діб у дозі (20 мг/кг) двічі на добу, а операційні рани протягом п'яти діб обробляли йоддицеріном.

Для визначення об'ємів кісткових дефектів їх заповнювали пластичною масою альгінату натрію, яка утворюється при змішуванні його порошку зі стерильним 0,9 % розчином NaCl у співвідношенні 1 : 2 за температури 23 °С. Після затвердіння її вилучали з дефекту та поміщали в мірний циліндр з водою. За об'ємом витісненої води встановлювали об'єм дефекту, який у тварин обох груп коливався у межах $1,9 \pm 0,05 \text{ см}^3$.

Кераміку, леговану кремнієм, одержували (Uljanchich, 2021) шляхом введення 1,0 мас. % наночастинок кремнезему в структуру нестехіометричного гідроксиапатиту в процесі його осадження з водних солей кальцію та фосфату. Після витримки осаду, термічної та механічної обробки були отримані двофазні гранули з гідроксиапатиту та 30 % β -трикальційфосфату. Фазовий склад визначений за допомогою рентгеноструктурного аналізу, інші фази на дифрактограмах не спостерігались, але зміна параметрів решітки підтверджує часткове заміщення групи PO_4 на кремнезем. Крім того, вагове визначення кремнезему в готових гранулах композиту підтвердило його наявність у кількості 1,0 мас. %. Розмір гранул для імплантації становив 3 мм.

В післяопераційний період проводили клінічні та рентгенологічні дослідження, які висвітлені у попередній статті (Rublenko et al., 2020).

Проби крові відбирали після травми не пізніше 48-ї доби та на 3-ю, 12-у, 21-у, 42-у та 60-у добу після

оперативного лікування. Кількість загального білка визначали в сироватці крові набором “Філісіт – Діагностика” (Україна). Імуноферментним методом визначали вміст у сироватці крові інтерлейкінів IL-1 β та IL-10 і трансформуючого фактору росту (TGF- β) відповідно до стандартного протоколу з певними модифікаціями (Crowther J. R. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. 2001. 446 p.). Досліджувані зразки сироватки крові (10 мкг загального білка/мл в 50 мМ Трис-НСІ буфері (рН 7,4) об'ємом 100 мкл інкубували в 96-лунковому планшету протягом 12 год при +4 °С. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування після відмивання інкубували з 5 % знежиреним молоком протягом години при +37 °С. Наступним етапом було відмивання 0,05 М трис-НСІ буфером з твін-20 та 0,05 М трис-НСІ буфером двічі. Після додавання первинних антитіл певної специфічності інкубували 1 годину при +37 °С. Після додавання відповідних вторинних антитіл інкубували протягом години за тих же умов. Після кожного із зазначених етапів проводили відмивку 0,05 М трис-НСІ буфером з 0,1 % твіном-20 двічі. Як субстрат пероксидазної реакції у роботі використовували о-фенілендіамін / пероксид водню (Sigma, США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм (Raetska et al., 2017; Koval et al., 2018).

Статистичну обробку даних проводили з використанням MS Excel загальноприйнятими методами варіаційної статистики з вирахуванням середнього арифметичного значення (M) та стандартної похибки середнього значення ($\pm m$). Достовірними вважали відмінності між групами $P < 0,05$.

Результати дослідження

Встановлено (табл. 1) динамічні зміни концентрації в сироватці крові як цитокінів, так і TGF- β . Зокрема, після отримання кісткової травми рівень IL-1 β збільшився в 1,2 раза ($P < 0,001$), що є цілком закономірним як наслідок ініціації реакції на гостру травму. Проте в подальшому динаміка зміни його концентрації в контрольній та дослідній групі виявлялася дещо відмінною. В контрольній групі вона мала піки на 12-у та 42-у добу репаративного остеогенезу, перевищуючи показники здорових тварин у 1,5 та 1,8 раза ($P < 0,001$) відповідно. При цьому лише на 3-ю добу після остеосинтезу рівень IL-1 β не мав статистично вірогідної різниці з показником клінічно здорових собак, а в період 60-ї доби залишався підвищеним в 1,4 раза ($P < 0,001$). Тобто у випадку репаративного остеогенезу осколкових переломів, за умови проведення накісткового остеосинтезу, має місце перманентна прозапальна цитокінемія. У випадку заміщення кісткових дефектів гідроксиапатитною керамікою, легованою кремнієм, рівень IL-1 β з 12-ї доби репаративного остеогенезу був вірогідно меншим, ніж у контрольній групі, а його пік зареєстровано на 3-ю добу після остеосинтезу, коли він виявився більшим за показник клінічно здорових у 1,3 раза ($P < 0,001$). Тобто у тварин дослідної групи прозапальна цитокінемія виявлялася помірною і двофазною, оскільки на 21-у добу рівень IL-1 β виявився підвищеним незначно.

Таблиця 1

Динаміка цитокинового статусу в собак за репаративного остеогенезу

Показники	Кл. здорові (n = 10)	Після травми (n = 14)	3-я доба	12-а доба	21-а доба	42-а доба	60-а доба
IL-1β ум.од./мл	2,9 ± 0,02	3,5 ± 0,01***	3,9 ± 0,07+++ 2,8 ± 0,02	3,8 ± 0,25 4,4 ± 0,15	3,2 ± 0,01+++ 4,3 ± 0,06	3,5 ± 0,10+++ 5,2 ± 0,02	3,5 ± 0,05+++ 4,0 ± 0,02
IL-10 ум.од./мл	4,3 ± 0,01	3,2 ± 0,17***	3,5 ± 0,02++ 2,5 ± 0,03	3,1 ± 0,31 3,3 ± 0,16	4,4 ± 0,16+ 5,0 ± 0,13	3,1 ± 0,03+++ 4,3 ± 0,07	3,4 ± 0,11++ 4,4 ± 0,21
TGF-β ум.од./мл	3,6 ± 0,09	4,3 ± 0,32**	2,8 ± 0,06 2,9 ± 0,01+	5,1 ± 0,32 6,5 ± 0,21+	5,6 ± 0,17++ 4,4 ± 0,13	8,2 ± 0,57 11,1 ± 0,28++	5,3 ± 0,44 6,2 ± 0,54
Білок г/л	74,3 ± 0,67	74,5 ± 1,62	73,1 ± 1,65 75,5 ± 0,14	75,4 ± 3,07 73,1 ± 0,55	72,8 ± 0,27 66,8 ± 2,51	73,1 ± 2,92 79,6 ± 0,71	78,4 ± 2,07 82,9 ± 0,62

Примітки: 1) I – дослідна (n = 4), II – контрольна (n = 4), групи; 2) значення P: * – < 0,05; ** – < 0,01; *** – < 0,001, порівняно з показниками клінічно здорових тварин; 3) значення P: +- < 0,05; ++ – P < 0,01; +++ – < 0,001, порівняно з показниками дослідної і контрольної групи

Рівень протизапального цитокину IL-10 після кісткової травми достовірно зменшувався в 1,3 раза (P < 0,001). Надалі його динаміка в групах мала певні особливості. Зокрема, у контрольній групі на 3-ю добу після остеосинтезу рівень IL-10 досить істотно зменшився порівняно з показником клінічно здорових тварин – у 1,7 раза (P < 0,001), тимчасом як у дослідній групі спостерігали його підвищення. Причому рівень прозапального IL-1β в цей період у контрольних тварин перебував у межах показника здорових собак. Хоча в наступні терміни репаративного остеогенезу рівень протизапального IL-10 у контрольній групі поступово збільшився та досяг свого піку на 21-у добу, проте паралельно в цей період концентрація в

крові IL-1β виявлялася більшою за норму в 1,5 раза (P < 0,001). У дослідній групі, як і в контрольній, максимальне збільшення IL-10 виявляли на 21-у добу, проте воно в 1,2 раза (P < 0,05), було меншим порівняно із контрольною. На 42-у та 60-у доби спостерігали в 1,4 (P < 0,001) та в 1,3 (P < 0,01) раза більші показники у контрольній групі порівняно із дослідною.

Цитокиновий індекс, тобто співвідношення концентрації протизапального IL-10 до IL-1β (рис. 1), становив у нормі 1,5. У травмованих тварин він різко зменшився в 1,7 раза та утримувався на цьому рівні до 12-ї доби репаративного остеогенезу. В період 21-ї доби цитокиновий індекс суттєво підвищився і в дослідних собак майже досяг показника норми.

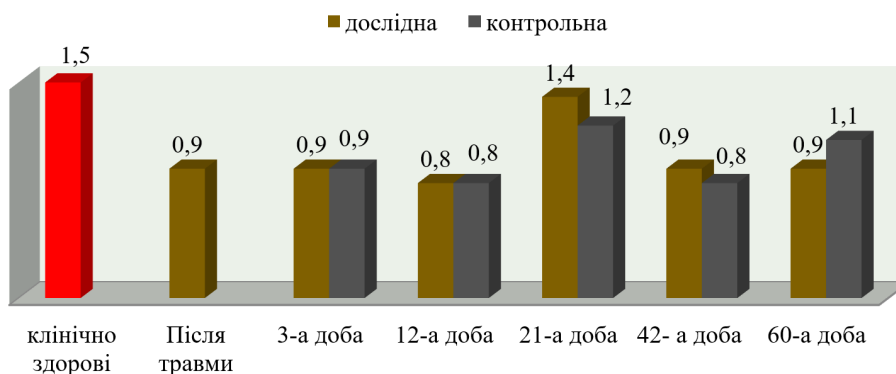


Рис. 1. Цитокинові індекси протизапального та прозапального IL-10 до IL-1β

Рівень трансформуючого фактора росту після кісткової травми порівняно із клінічно здоровими тваринами збільшився в 1,2 раза (P < 0,01), що є закономірним елементом реакції на травму. На 3-ю добу в обох групах встановлене його зменшення навіть нижче за показник здорових тварин. У наступні періоди репаративного остеогенезу його динаміка виявилася суттєво різною. Так, у дослідній групі концентрація в крові TGF-β динамічно збільшувалася і досягала піку на 42-у добу. В контрольній групі вона мала два піки – на 12-у і 42-у добу, при чому за достовірно більшого її рівня, ніж у дослідних тварин.

Водночас зміни кількості у сироватці крові загального білка виявилися недостовірними протягом усіх термінів дослідження.

Обговорення

Кісткова тканина, маючи складну гістоморфологічну і біохімічну організацію, локальну і системну регуляцію, виконує різноманітні функції – опорну і захисну, гомеостатичну і метаболічну та морфофункціонально тісно взаємозв'язана з гемопоетичною та імунологічною системами. Все це забезпечує її унікальні регенеративні властивості, що характеризується здатністю до ідентичного відновлення пошкоджених ділянок (Hart et al., 2020). Однак у випадках осколкових переломів втрачається періостальне та ендостальне живлення, що призводить до порушень регенерації кісткової тканини, а кісткові дефекти які утворюються внаслідок видалення нежиттєздатних осколків, досить тривалий час заповнюються щільною спо-

лучною тканиною та хрящовою, що може призводити до розвитку псевдосуглобу або тривалого незрощення.

В попередніх дослідженнях (Rublenko, et al., 2014; Rublenko, et al., 2015) було показано, що використання кальціє-фосфатної кераміки з різними частками α -та/чи β -трикальційфосфатів забезпечує надійний остеоіндуктивний ефект, завдяки чому гістоморфологічно скорочується запально-резорбтивна фаза репаративного остеогенезу, стадія ретикулофібринозного і хрящового регенератів, більш ранніми виявляються процеси ремодельовання кісткового регенерату. В дослідженнях на собаках це верифікується низкою маркерів кісткового метаболізму – кісткової лужної фосфатази, тартрат – резистентної кислоти фосфатази, остеокальцину і с-телопептидів колагену I типу. Легування композиту з гідроксиапатиту та β -трикальційфосфату іонами кремнію (ГТлКг-700) надало йому виражених остеоіндуктивних властивостей, що гістоморфологічно характеризувалося ранньою ендотеліальною реакцією та міграцією мезенхімальних стовбурових клітин, які забезпечили інтенсивну остеобластичну реакцію (Rublenko et al., 2018).

У представленому дослідженні рівень і співвідношення у крові цитокінів різних класів у клінічно здорових собак виявився подібним до вже відомих (Melnikov, 2021), що засвідчує протизапальний цитокіновий профіль за фізіологічної норми. За умови кісткової травми він набуває прозапального характеру, що запускає процес остеоїзмові у ділянці перелому. Водночас за репаративного остеогенезу після остеоїзмові переломів довгих трубчастих кісток із об'ємними їхніми дефектами прозапальна цитокінемія набуває перманентного характеру з піком на 42-у добу, а це свідчить про гальмування метаплазії хрящового регенерату в кістковий, тобто уповільнює консолідацію перелому. Рівень прозапальної цитокінемії за використання кераміки, легованої кремнієм, достовірно менший і триває протягом перших 12-и діб, тобто у період запально-резорбтивної стадії.

Проте ключовою у розумінні ефективності остеоїзмові виявилася динаміка TGF- β , яка засвідчила двофазну його гіперреактивність у контрольних тварин, оскільки цей фактор росту за надмірної кількості блокує кісткові морфогенетичні білки і стимулює хондрогенез (Chen et al., 2012).

Таким чином, використання гідроксиапатитної кераміки з β -трикальційфосфатом, легованої кремнієм, оптимізує репаративний остеоїзмові через помірну і контрольовану прозапальну цитокінемію та урівноважену продукцію факторів росту.

Висновки

1. Кісткова травма у формі переломів довгих трубчастих кісток у собак супроводжується реактивною прозапальною цитокінемією і збільшенням концентрації в крові трансформуючого фактора росту типу β .

2. Репаративний остеоїзмові осколкових переломів після накісткового остеоїзмові в собак характеризується перманентною прозапальною цитокінемією з

надмірною продукцією трансформуючого фактора росту, що відображає подовження стадії хрящового мозоля.

3. Остеоїзмові кісткових дефектів довгих трубчастих кісток у собак гідроксиапатитною з β -трикальційфосфатом керамікою, легованою кремнієм, супроводжується помірною цитокінемією відповідно до перебігу запально-резорбтивної стадії та фази ремодельовання з піком індукції трансформуючого фактора росту в період активного остеоїзмові (42-а доба), що відображає оптимізований перебіг репаративного остеоїзмові.

Відомості про конфлікт інтересів. Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів щодо їх вкладу та результатів досліджень.

References

- Abd El Raouf, M., Zhang, Y., Serrano, J. C., & Miron, R. J. (2017). Novel Natural Bovine Bone Graft with Integrated Atelo-Collagen Type I: Atelocollagen Bovine Bone Mineral (ABBM) Characterization In-vivo. *Periodontics and Prosthodontics*, 3(1). doi: 10.21767/2471-3082.100029.
- Alireza, N., Seyed, J. A., Roza, V., Ashraf, H., & Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 12(12), 4937–4961. doi: 10.2147/IJN.S124671.
- Andriec, V. G. (2014). Kliniko-rentgenologichna harakterystyka ta cytokinova regulacija reparatyvnogo osteogenezu u vypadku intrameduljarnogo osteosyntezu kistok i sobak. *Naukovyi visnyk Lvivskogo nacionalnogo universytetu vetrynarnoi medycyny ta biotekhnologii im. S.G. Gzhickogo*, 16(3), 27–37 (in Ukrainian).
- Chelsea, S. B., Robert, L. Z., Patrick, A., Alekos, T., Jason, W. A., Jaimo, A., Theodore, M., Ralph, S. M., & Kurt, D. H. (2019). *Cellular Biology of Fracture Healing*. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res*, 37(2), 35–50. doi: 10.1002/jor.24170.
- Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 272–288. doi: 10.7150/ijbs.2929.
- Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 101(3), 45–50. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.07.009.
- Dubrov, V. E., Klimashina, E. S., & Shherbakov, I. M. (2019). Jeksperimental'naja ocenka svojstv 3D_poristogo materiala na osnove fosfata kal'cija na modeli monokortikal'nogo diafiznogo defekta bedrennoj kosti krysy. *Bjulleten' eksperimental'noi biologii i medycyny*, 167(3), 377–380 (in Russian).
- Finkemeier, C. G. (2002). Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes *J Bone Joint Surg. Am*, 84.

- Goljuk, E. L., Javorska, V. I., Bezdenezhnik, N. O., Kozak, T. P., & Saulenko, K. O. (2019). Riven TGF- β v zbagachenij trombocitami plazmi u pacientiv iz zahvorjuvannjam ta travmamy oporno-ruhovogo aparatu. *Oryginalni doslidzhennja*, 7(2), 108–112 (in Ukrainian).
- Grignani, G., & Maiolo, A. (2000). Cytokines and hemostasis. *Haematologica*, 85(2), 967–972.
- Haaland, P. J., Sjostorm, L., Devor, M., & Haug, A. (2009). Appendicular fracture repair in dogs using the locking compression plate system: 47 cases. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 22(4), 309–315. doi: 10.3415/VCOTO8-05-0044.
- Hart, N. H., Newton, R. U., Tan, J., Rantalainen, T., Chivers, P., Siafarikas, A., & Nimphius, S. (2020). Biological Basis of Bone Strength: Anatomy, Physiology and Measurement. *Musculosket Neuronal Interact*, 20(3), 347–371. URL: www.researchgate.net/publication/340939391.
- Jiliang, L., & David, L. S. (2014). Fracture Healing. *Basic and Applied Bone Biology*, 2014, 205–223. doi: 10.1016/B978-0-12-416015-6.00010-1.
- Korzh, N. A., Deduh, N. V., & Nikolchenko, O. A. (2006). Reparativnaja regeneracija kosti: sovremennyj vzgljad na problemu. Sistemnye faktory, vlijajushhie na zazhivlenie pereloma. *Ortopedija, travmatologija i protezirovanie*, 2, 93–99 (in Russian).
- Kostiv, R. E., Kalinichenko, S. G., & Matveeva, N. Ju. (2017). Troficheskie faktory rosta kostnoj tkani, ih morfogeneticheskaja harakteristika i klinicheskoe znachenie. *Pacific Medical Journal*, 1, 10–16. doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2017.1.10-16.
- Koval, T. V., Ishchuk, T. V., Grebinyk, D. M., Raetska, Ya. B., Sokur, O. V., Savchuk, O. M., & Ostapchenko, L. I. (2018). Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. *Biomedical Research*, 29(16), 3169–3173. doi: 10.4066/biomedicalresearch.29-18-394.
- Kunder, E. V., Litvjakova, A. M., Janchenko, V. V., Generalov, I. I., & Volkova, M. V. (2007). Patogeneticheskoe i diagnosticheskoe znachenie interlejkina 1 beta pri spondiloartropatijah. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, 6(3), 51–55. URL: <http://elib.vsmu.by/handle/123/8522> (in Russian).
- Libardoni, R. N., Serafini, G. M. C., Oliveira, C., Schimite, P. I., Chaves, R. O., Feranti, J. P. S., Costa, C. A. S., Amaral, A. S., Raiser, A. G., & Soares, A. V. (2016). Appendicular fractures of traumatic etiology in dogs: 955 cases (2004–2013). *Ciência Rural*, 46(3), 542–546. doi: 10.1590/0103-8478cr20150219.
- Malyschkina, S. V., Chzhou, L., & Deduh, N. V. (2014). Strukturnaja perestrojka kostnoj tkani v uslovijah zapolnenija kostnyh polostej sinteticheskimi uglerodnym biomaterialom. *Ortopedija, travmatologija i protezirovanie*, 3, 30–37. doi: 10.15674/0030-59872014330-37 (in Russian).
- Marcela, A. O., Qaisar, N., & Aldo, R. B. (2020). Silicate-based nanoceramics in regenerative medicine. *Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine*, 2020, 254–273. doi: 10.1016/B978-0-08-102594-9.00009-7.
- Melnikov, V. V. (2021). Kliniko-patogenetychne znachennja cytokiniv ta korekcija ih rivnja pry hirurgichnij infekcii u tvaryn: avtoref. dis. na zdobuttja nauk. stupenja kand. veterinarnyh nauk: spec. 16.00.05 – veterynarna hirurgija. Bila Cerkva (in Ukrainian).
- Nandi, S. K., Ghosh, S. K., Kundu, B., De, D. K., & Basu, D. (2008). Evaluation of new porous β -tricalcium phosphate ceramic as bone substitute in goat model. *Small Ruminant Research*, 75(2-3), 144–153. doi: 10.1016/j.smallrumres.2007.09.006.
- Nojiria, A., Nishidoa, T., Horinakaa, O., Akiyoshib, H., Ohashib, F., & Yamaguchia, T. (2015). Initial Clinical Application and Results of the Advanced Locking Plate System (ALPS) in Small Animal Orthopedics: Two Hundred Eighty Two Procedures. *Intern J Appl Res Vet Med*, 13(1), 64–79.
- Nikitin, E. V., Chaban, T. V., & Serveckij, S. K. (2007). Suchasni ujavlennja pro systemu cytokiniv. *Infekcijni hvoroby*, 21(2), 64–69. doi: 10.11603/1681-2727.2007.2.1038 (in Ukrainian).
- Oliveira, H. L., Wellington, L. O., Carlos, E. C., Neftali, L. V., Silva, A. S., Guim, T. N., Dellagostin, O. A., & Piva, E. (2017). Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Research*, 101(4), 341–354. doi: 10.1007/s00223-017-0294-z.
- Pascale, M. R., Sommese, L., Casamassimi, A., & Napoli, C. (2015). Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. *Transfusion Medicine Reviews*, 29(1), 52–61. doi: 10.1016/j.tmr.2014.11.001.
- Raetska, Y. B., Chornenka, N. M., Koval, T. V., Savchuk, O. M., Beregova, T. V., & Ostapchenko, L. I., (2017). Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. *Biomed Res Ther*, 4(9), 1591–1606. URL: <http://www.bmrat.org/index.php/BMRAT/article/view/367>.
- Rahmati, M., Pennisi, C. P., Budd, E., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2018). Biomaterials for Regenerative Medicine: Historical Perspectives and Current. *Adv Exp Med Biol – Cell Biology and Translational Medicine*, 19(1), 1–19. doi: 10.1007/5584_2018_278.
- Reznik, L. B., Erofeev, S. A., Stasenko, I. V., & Borzunov, D. Y. (2019). Morphological assessment of osteointegration of various implants for management of long bone defects (experimental study). *Genij Ortopedii*, 25(3), 318–323. doi: 10.18019/1028-4427-2019-25-3-318-323.
- Rublenko, M. V., Chemerovskij, V. O., Vlasenko, V. M., & Uljanchich, N. V. (2018). Ocinka osteointegracijnuh i osteoinduktivnih vlastivostej keramiky, legovanoi kremniem, za modelnih perelomiv stegnovoi kistky u kroliv. *Naukovyi visnyk veterinarnoi medycyny*, 144(2), 37–46. doi: 10.33245/2310-4902-2018-144-2-37-46 (in Ukrainian).
- Rublenko, M. V., Chemerovskiy, V. A., Andriets, V. G., Ulyanchich, N. V., Kolomiets, V. V., & Koryak, A. S. (2020). Evaluation of usage of silicon-doped hydroxyapatite ceramics for treatment of fragmented

- bone fractures in dogs. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 22(99), 29–37. doi: 10.32718/nvlvet9905.
- Rublenko, M. V., Dudka, V. B., & Semenjак S. A. (2015). Morfo-rentgenologichna i biokhimichna harakterystyky reparaivnogo osteogenezu za zamyshhennja kistkovykh defektiv biominom-GT u tvaryn. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medycyny*, 99(1), 98–106 (in Ukrainian).
- Rublenko, M. V., Semenjак S. A., & Uljanchich, N. V. (2014). Dinamika biomarkeriv reparaivnogo osteogenezu za umov zamishhennja kistkovih defektiv. *Naukovij visnyk LNUVMBT imeni S. Z. Gzhickogo*, 16(3), 287–294 (in Ukrainian).
- Rublenko, S. V., & Eroshenko, O. V. (2012). Monitoring veterynarnoi dopomogy i struktura hirurgichnoi patologii sered drybnyh domashnih tvaryn v umovah mis'koi kliniky. *Visnyk Sumskogo Nacionalnogo agrarnogo Universitetu*, 30(1), 150–154 (in Ukrainian).
- Shaganenko, V. S. (2012). Kliniko-patohenetychna rol oksydu azotu ta korektsiia yoho rivnia za khirurhichnoi patologii zapalnoho renezu v tvaryn riznykh vydiv: avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia kand. vet. nauk: spets. 16.00.05 “Veterynarna hirurgija”, Bila Cerkva (in Ukrainian).
- Teljatnikov, A. V. (2013). Poshyrennia perelomiv kistok u sobak. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny*, 101(1), 149–153 (in Ukrainian).
- Uljanchich, N. V., (2021). Formuvannia vlastyivostei kaltsii-fosfatnoi keramiky dlia reheneraivnoi medytsyny: avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia kand. tekhnichnykh nauk: spets. 05.02.01 – Materialoznavstvo. Kyiv (in Ukrainian).
- Eroshenko, O. V. (2013). Bilky hostroi fazy i markery spoluchnoi tkanyny za reparaivnogo osteogenezu ta yoho farmakolohichna korektsiia v sobak: avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia kand. vet. nauk: spets. 16.00.05 “Veterynarna khirurhiia”, Bila Tserkva (in Ukrainian).