

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/nvlvet10614

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

UDC 636.7.09: 616-001.5: 666.3

Clinical, radiological and pathochemical substantiation of osteosubstitution by hydroxyapatite ceramics with β -tricalcium phosphate and platelet-enriched autofibrin in fragmentary bone fractures in dogs

S. M. Shevchenko✉, M. V. Rublenko

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

Article info

Received 08.04.2022

Received in revised form
09.05.2022

Accepted 10.05.2022

Bila Tserkva National Agrarian
University, pl. Soborna 8/1,
Bila Tserkva, 09117, Ukraine.
Tel.: +38-097-859-58-11
E-mail: svitlana.shevchenko@btsau.edu.ua

Shevchenko, S. M., & Rublenko, M. V. (2022). Clinical, radiological and pathochemical substantiation of osteosubstitution by hydroxyapatite ceramics with β -tricalcium phosphate and platelet-enriched autofibrin in fragmentary bone fractures in dogs. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(106), 87–96. doi: 10.32718/nvlvet10614

Due to the similarity of its composition to bone tissue, bioactive ceramics based on hydroxyapatite are considered the most promising for osteosubstitution of fragmentary fractures, and topical application of pharmacological agents and autologous agents bioactive substances, in particular, platelet-rich fibrin (PRF). The work aims to clinically and radiologically, and pathochemically substantiate osteosubstitution by hydroxyapatite ceramics with β -tricalcium phosphate and platelet-enriched fibrin for fragmentary bone fractures in dogs. A control and two experimental groups of animals were formed, including patients ($n = 10$) with humerus and forearm fractures. After general and local anesthesia and extracortical osteosynthesis, the first experimental group was injected with platelet-rich autofibrin between bone fragments. The second group was osteosubstituted with a combination of PRF and hydroxyapatite ceramics; in the control group, the defects remained without replacement. For biochemical studies, blood samples were taken after injury no later than 24 hours and on the 3rd, seventh, 14th, 21st, and 42nd day after osteosynthesis. In the postoperative period, clinical and radiological studies were performed. The activity of bone isoenzyme alkaline phosphatase (BAP), tartrate-resistant acid phosphatase (TrAP), the level of total calcium (Ca), inorganic phosphorus (P), and total protein were determined in blood serum. It was found that complete recovery of limb function in the experimental groups was 1.2–1.4 times faster ($P < 0.001$) compared with the control group and radiologically confirmed earlier consolidation of fractures. In both experimental groups, the maximum activity of BAP was observed on the 14th day, in the absence of a significant difference between these groups, while in control – it peaked on the 21st day. In the case of bone injury, the level of TrAP decreased by 1.2 times ($P < 0.05$) and then gradually increased, which was significant in the control group on the 42nd day, in the first experimental group on the 21st, and the second on the 14th day. On the third day after osteosynthesis, the concentration of P was still lower in the control ($P < 0.05$) and the first experimental ($P < 0.01$) group compared with clinically healthy animals. The concentration of Ca on the third day was reduced in all groups by 1.2 times ($P < 0.001$) and then gradually returned to normal. The use of PRF with calcium-phosphate ceramics for osteosubstitution helps to optimize regeneration processes in the area of bone injury by activating osteoblastic cells and reducing the intensity of the osteoresorption reaction with an earlier reaction of bone regeneration remodeling.

Key words: osteosynthesis, osteoclasts, markers of bone metabolism, bone isoenzyme of alkaline phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase.

Клініко-рентгенологічне та патохімічне обґрунтування остеозаміщення дроксипатитною керамікою з β -трикальційфосфатом та аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, за осколкових переломів кісток у собак

С. М. Шевченко[✉], М. В. Рубленко

Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква, Україна

Біоактивна кераміка на основі гідроксиапатиту за рахунок подібності свого складу до кісткової тканини вважається найперспективнішою для остеозаміщення осколкових переломів, а за рахунок локального застосування як фармакологічних засобів, так і аутологічних біоактивних речовин, зокрема фібрину, збагаченого тромбоцитами (PRF), досягається остеоіндуктивність композитних матеріалів. Мета роботи – клініко-рентгенологічно і патохімічно обґрунтувати остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою з β -трикальційфосфатом і фібрином, збагаченим тромбоцитами, за осколкових переломів кісток у собак. Сформувавши контрольну та дві дослідні групи тварин, у кожену з яких входили пацієнти по ($n = 10$) з переломами плечових кісток і передпліччя. Після проведення загальної та місцевої анестезії та екстракортикального остеосинтезу в першій дослідній групі між кістковими уламками вносили аутофібрин, збагачений тромбоцитами, а у другій проводили остеозаміщення його комбінацією з гідроксиапатитною керамікою, у контрольній групі дефекти залишали незаповненими. Для біохімічних досліджень проби крові відбирали після травми не пізніше 24 годин та на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу і 42-ту добу після остеосинтезу. В післяопераційний період проводили клінічні та рентгенологічні дослідження. Визначали в сироватці крові активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази (КЛФ), тартрат-резистентної кислоти фосфатази (ТрКФ), рівень загального кальцію (Ca), неорганічного фосфору (P) і загального білка. Встановлено, що повне відновлення функції кінцівки в дослідних групах було швидшим в 1,2–1,4 рази ($P < 0,001$) порівняно з контрольною групою та рентгенологічно підтверджена більш рання консолідація переломів. В обох дослідних групах максимальна активність КЛФ спостерігалась на 14-ту добу за відсутності достовірної різниці між цими групами, водночас у контрольній – вона досягла піку на 21-шу добу. За кісткової травми рівень ТрКФ знижувався в 1,2 рази ($P < 0,05$), а далі поступово збільшувався, що достовірним виявилось в контрольній групі на 42-гу добу, в першій дослідній на 21-шу, а в другій на 14-ту добу. На 3-тю добу після остеосинтезу концентрація P була все ще нижчою у контрольній ($P < 0,05$) та першій дослідній ($P < 0,01$) групі порівняно з показниками клінічно здорових тварин. Концентрація Ca на 3-тю добу була в усіх групах зниженою в 1,2 рази ($P < 0,001$), а далі поступово поверталася до норми. Застосування PRF з кальцій-фосфатною керамікою для остеозаміщення сприяє оптимізації процесів регенерації в зоні кісткової травми за рахунок активації клітин остеобластичного ряду та зменшення інтенсивності остеорезорбційної реакції з більш ранньою реакцією ремоделювання кісткового регенерату.

Ключові слова: остеосинтез, остеокласти, маркери кісткового метаболізму, кістковий ізофермент лужної фосфатази, тартрат-резистентна кислота фосфатаза.

Вступ

Кісткова травма зумовлює комплексне порушення цілісності усього масиву тканин, включаючи поряд з кістками шкіру, м'язи, сухожилки, судини, та супроводжується порушенням живлення пошкодженої ділянки, розвитком ендотоксикозу, ризиком її інфікування (Vertenten et al., 2010; Winkler et al., 2018). Внаслідок порушення цілісності періосту, ендоосту та кісткового мозку відбувається крововилив, у результаті чого в місці перелому формується фібриновий згусток, що виконує роль біологічної матриці, яка, з одного боку, з'єднує краї кісткових уламків, а з другого – забезпечує процеси адгезії, міграції та проліферації остеобластичних клітин (Winkler et al., 2018; Atala et al., 2019; Snyder et al., 2020). Порушення кровообігу в травмованій ділянці призводить до зниження репаративного потенціалу тканин, а видалення гематоми під час проведення остеосинтезу і репозиції кісткових уламків лімітує роль первинної біологічної матриці в ініціації репаративного остеогенезу.

Серед загалу нозологічних форм окремо виділяють осколкові переломи, що зумовлюють певні біомеханічні ускладнення під час проведення остеосинтезу. Консолідація переломів такого типу досить складна і тривала (Semeniak et al., 2014). Для їх лікування використовують різні методи остеосинтезу, а також їхні комбінації для надійної фіксації кісткових уламків. При цьому нерідко видаляють нежиттєздатні осколки, що призводить до утворенням значних за об'ємом

дефектів кісткової тканини (Bahney et al., 2019; Yang & Xiao, 2020; Chemerovskiy et al., 2021). У таких випадках з метою оптимізації регенеративних процесів та відновлення остеорепаративного потенціалу проводять остеопластику в формі остеозаміщення.

Матеріали, які використовують для остеозаміщення, повинні володіти певним переліком властивостей, а саме: остеокондуктивними, остеointegraційними, остеоіндуктивними, остеогенними та бути біосумісними і нетоксичними (Croes et al., 2017; Cuervo et al., 2020). Біоактивна кераміка на основі гідроксиапатиту за рахунок подібності свого складу до кісткової тканини вважається найперспективнішою. Поряд з цим за консолідації переломів ключовою є остеоіндуктивність, яка досягається локальним застосуванням як фармакологічних засобів, так і аутологічних біоактивних речовин. До них належать кісткові морфогенетичні білки і фактори росту, що на різних етапах консолідації переломів здатні стимулювати остеогенез. Вони індують диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин та міграцію остеобластів, утворених із клітин-попередників, в ушкоджену ділянку (Oryan et al., 2014; Davis et al., 2014; Badran et al., 2018).

Поєднання композитних матеріалів з речовинами, здатними до індукції та регуляції молекулярно-біологічних механізмів, зумовлене тим, що переважна більшість засобів для остеозаміщення володіють лише остеокондуктивними властивостями (Li, 2018). При цьому поєднане застосування кальцій-фосфатної ке-

рамки разом з фібрином, збагаченим тромбоцитами, залишається недостатньо обґрунтованим у собак, чому присвячені лише поодинокі спостереження (Rabillard et al, 2009; Zhou et al, 2017; Aghamohammadi Ameghani et al, 2021).

Попередньо нами (Shevchenko, 2020; Shevchenko & Rublenko, 2020; Shevchenko et al, 2021) було вивчено вплив різних форм фібрину, збагаченого тромбоцитами, та їх комбінації з гідроксиапатитом і β -трикальційфосфатом на репаративний остеогенез за модельного остеозаміщення у кролів і встановлено таку закономірність: i -PRF < PRF < PRF + ГТ (гідроксиапатит з β -трикальційфосфатом). PRF (Platelet-Rich Fibrin) – фібрин, збагачений тромбоцитами, значно підвищував остеointegraційні характеристики кальцій-фосфатних імплантів та надавав їм остеоіндуктивних і остеогенних властивостей, що проявлялося ранньою реакцією остеобластів з достатньою щільністю остецитів і підтверджувалось патохімічно меншим рівнем гострофазної реакції та гостро-запальної остеорезорбції.

Мета роботи – клініко-рентгенологічно і патохімічно обґрунтувати остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою з β -трикальційфосфатом і фібрином, збагаченим тромбоцитами, за осколкових переломів кісток у собак.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і наукових цілей, а також відповідно до Закону України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 28.03.2006 р № 27, ст. 230, наказу МОН № 416/20729 від 16 березня 2012 р. “Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах” та схвалене Етичним комітетом Білоцерківського НАУ (висновок № 2 від 31.05.18 р., протокол № 1).

У дослідження включали собак ($n = 30$) із осколковими переломами кісток передпліччя та плечової, які надходили протягом 2019–2021 років у клініку дрібних домашніх тварин факультету ветеринарної медицини Білоцерківського НАУ.

Було сформовано контрольну ($n = 10$) та дві дослідні по 10 гол. групи тварин, у кожену з яких входили пацієнти з переломами як плечових, так і кісток передпліччя. Критеріями відбору тварин в групи були: термін отримання кісткової травми не більше двох діб, локалізація кісткової травми у ділянці діафіза, осколковий тип перелому з наявністю м'язової ніжки чи кісткового дефекту в разі втрати зв'язку з м'якими тканинами. В першій дослідній групі об'єм дефекту становив $1,3 \text{ см}^3$, а у другій – $2,01 \text{ см}^3$.

Наявність перелому встановлювали за клінічними ознаками та рентгенологічно на рентгенапараті РУМ-20 відповідно до уніфікованих для кісток собак параметрів напруги і експозиції рентгенівських променів. Одержані рентгензнімки до остеосинтезу та на 21 і 42 добу відцифровували на електронний носій (AGFA. Healthcare N. V. CR 10-X, Німеччина).

Анестезіологічне забезпечення за остеосинтезу включало внутрішньом'язове введення медетомідину (20 мкг/кг , медісон, Бровафарма), буторфанолу таратрат ($0,1 \text{ мг/кг}$), бутолар зоо), для підтримання анестезії внутрішньовенно тіопентал натрію (7 мг/кг , тіопентат, Бровафарма). Місцево проводили інфільтраційну анестезію $0,5\%$ розчином лідокаїну (3 мг/кг).

Оперативний доступ до ділянки перелому виконували на латеральній поверхні плечової кістки та дорсо-латеральній у ділянці передпліччя. В разі необхідності нежиттєздатні осколки видаляли. У контрольній і дослідних групах виконували екстракортикальний остеосинтез пластиною із нелегованого титанового сплаву фірми НП ООО “Інмед”, (Україна). Додатково в першій дослідній групі між кістковими уламками вносили аутофібрин, збагачений тромбоцитами, а у другій проводили остеозаміщення його комбінацією з гідроксиапатитною керамікою, синтезованою в Інституті матеріалознавства ім. І. М. Францевича (м. Київ), у складі 70% гідроксиапатиту та 30% β -трикальційфосфату з розміром гранул $\approx 700 \text{ мкм}$ і адсорбційною активністю $118\text{--}120 \text{ мг/г}$. В операційну рану встановлювали дренаж із поліпропіленової трубки, а її ушивали вузловим швом. Дренаж знімали на 2–3 добу після припинення виділення серозного ексудату. Протягом 7 днів після оперативного втручання тваринам призначали курс антибіотикотерапії (цефтріаксон 20 мг/кг двічі на добу протягом 7 діб).

Приготування аутологічного фібрину, збагаченого тромбоцитами, проводили шляхом відбору в стерильну пробірку без антикоагулянту 5 мл крові з підшкірної вени передпліччя здорової кінцівки, яку відразу центрифугували при 3000 об/хв протягом 10 хв . Одержували сформований згусток і його стерильними ножицями у середній частині відрізували від еритроцитарної маси. На підставі власних результатів гістоморфологічних досліджень (Shevchenko & Rublenko, 2020) використовували нижню частину згустку. В другій дослідній групі спочатку в місце дефекту вносили гранули гідроксиапатиту з β -трикальційфосфатом, а поверх них згусток фібрину, збагачений тромбоцитами.

В післяопераційний період клінічні дослідження проводили за критеріями наявності та інтенсивності набряку тканин, термінів початку опирання на травмовану кінцівку, повного відновлення її функції та рентгенологічно підтвердженої консолідації перелому.

Проби крові для біохімічних досліджень відбирали після травми не пізніше 24 годин та на 3, 7, 14, 21 і 42 добу після остеосинтезу.

Додатково сформували групу клінічно здорових собак, що надходили в клініку дрібних домашніх тварин Білоцерківського НАУ для проведення планової вакцинації ($n = 10$). У них за згодою власників відбирали зразки крові, оскільки для низки досліджуваних біохімічних показників відсутні референтні значення.

Активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази (КЛФ) визначали у сироватці крові за (Vagner et al., 1981). Принцип методу полягає у розщепленні 4-

фенілфосфату з утворенням 4-нітрофенолу та ортофосфату.

Рівень активності тартрат-резистентної кислої фосфатази (ТрКФ) у сироватці крові визначали наборами реактивів ТОВ “Лабораторія Гранум” (Україна). Принцип методу полягає у розщепленні альфанафтилфосфату на альфа-нафтол + фосфат з використанням як специфічного агента для кісткового ізоферменту кислої фосфатази тартрату.

Рівень загального кальцію (Ca), неорганічного фосфору (P) і загального білка – наборами “Філісіт-Діагностика” (Україна).

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

Таблиця 1

Клінічні критерії динаміки консолидації переломів довгих трубчастих кісток у собак

Клінічні критерії	Контрольна група (n = 10), доба	Перша дослідна група (n = 10), доба	Друга дослідна група (n = 10), доба
зникнення набряку тканин	7,5 ± 0,5 (5–10)	6,2 ± 0,33* (5–8)	6,3 ± 0,23* (5–7)
початок опирання на травмовану кінцівку	12,8 ± 0,51 (11–15)	11,2 ± 0,39* (10–13)	9,6 ± 0,27**** (9–11)
повне відновлення функції кінцівки	36,6 ± 1,33 (28–42)	29,4 ± 0,83*** (26–35)	25,9 ± 0,7**** (22–29)
консолидація перелому	63,0 ± 0,89 (60–67)	48,0 ± 1,1*** (45–52)	42,8 ± 0,95**** (40–48)

Примітки: 1) контрольна група, остеосинтез без остеозаміщення; перша дослідна група, остеосинтез із остеозаміщенням кісткових дефектів фібрином, збагаченим тромбоцитами; друга дослідна група, остеосинтез із остеозаміщенням кісткових дефектів фібрином, збагаченим тромбоцитами та гранулами гідроксиапатиту з β-трикальційфосфатом; 2) значення P: * – $< 0,05$; ** – $< 0,01$; *** – $< 0,001$ порівняно з контрольною групою; 3) значення p: ● – $< 0,05$; ●● – $< 0,01$; ●●● – $< 0,001$ порівняно з тваринами першої дослідної групи

Після встановлення пластин рентгенологічне дослідження засвідчило репозицію уламків плечових, променевих та ліктьових кісток, тобто їх проксимальних і дистальних відділів як у контрольній, так і в дослідних групах. У другій дослідній групі ледь візуалізувалися гранули гідроксиапатиту із β трикальційфосфатом у ділянці кісткового дефекту.

На 21 добу (рис. 1) у тварин контрольної групи рентгенологічно чітко візуалізується місце дефекту кісток передпліччя. Проксимально та дистально від нього виявляли збільшення інтенсивності пері- та ендоостанньої реакції та ділянки з підвищеною рентгенологічною щільністю. Зниження рентгенщільності і явища остеорезорбції були виявлені за остеосинтезу плечових кісток (рис. 2).

У першій дослідній групі спостерігали на кістках передпліччя помірну періостальну реакцію, місце дефекту ще візуалізувалося. На плечових кістках у цей період регенерат був неоднорідним з ділянками

Результати досліджень

Клініко-рентгенологічне дослідження. Через 7–10 діб після остеосинтезу краї ран були з'єднані сполучно-тканинною спайкою у стані епітелізації, що свідчило про необхідність зняття швів.

Початок опирання на кінцівку у дослідних групах реєстрували з 9–11-ї, а в контрольній – після 11–15 діб (табл. 1). Повне відновлення функції кінцівки в дослідних групах було швидшим в 1,2–1,4 раза ($P < 0,001$) порівняно з контрольною групою. Також у цих групах рентгенологічно було встановлено більш ранню консолидацію переломів у 1,3 та 1,5 раза відповідно.

Між групами також було виявлено деякі відмінності, а саме: у другій дослідній групі достовірно підтверджений ранній початок опирання на травмовану кінцівку, відновлення її функції та консолидація перелому з достовірністю ($P < 0,01$) порівняно з першою дослідною групою.

різної рентгенощільності. Місце дефекту було ледь помітним, хмароподібна тінь виступала над поверхнею кістки у місці дефекту.

Водночас у тварин другої дослідної групи на 21 добу виявляли у ділянці передпліччя потужну реакцію ендо- та періосту, остання поширювалася майже на всю довжину як променевих, так і ліктьових кісток місце дефекту не візуалізувалось. На плечових було посилення рентгенологічної щільності проксимальніше і дистальніше від місця дефекту, що ще чітко проглядався, більшою мірою за рахунок ендостальної реакції.

На 42 добу в тварин контрольної групи у кістках передпліччя все ще чітко візуалізувалося місце дефекту, в зоні кістково-мозкового каналу відмічали ділянки однорідної підвищеної рентгенощільності навколо дефекту. Періостальна реакція мала вигляд неоднорідного хмароподібного утворення, яке виступало над поверхнею ділянки кісткової травми.

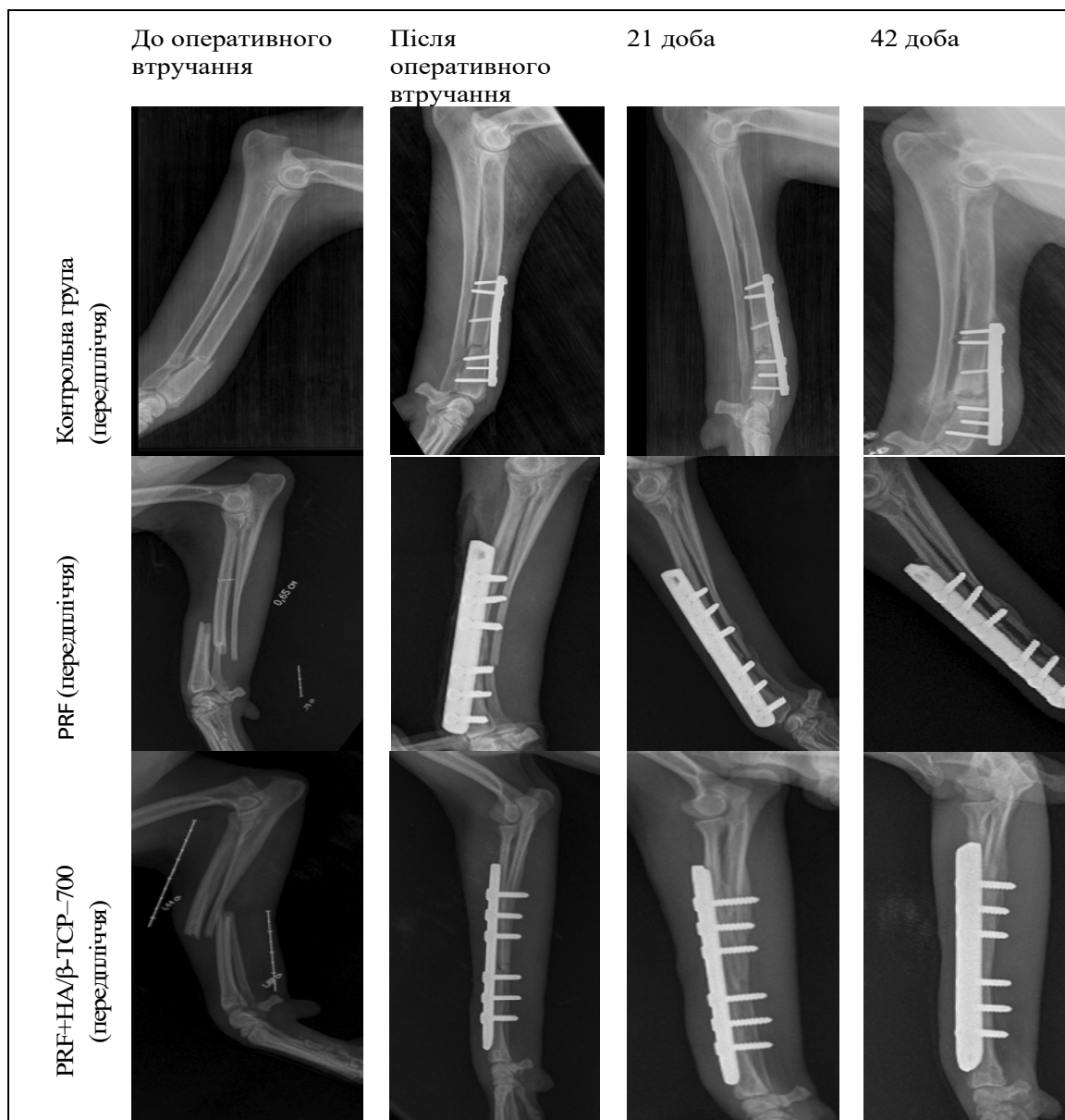


Рис. 1. Рентгенограми кісток передпліччя собак контрольної та дослідних груп

У плечових кістках виявляли потоншення коркового шару кістки та зменшення її рентгенощільності, місце дефекту чітко видиме, консолидація не відбулася.

У відповідний період у першій дослідній групі на кістках передпліччя не візуалізувалося місце дефекту. Воно було виповнене кістковим регенератом високої щільності, проксимально від місця кісткової травми виявляли реакцію періосту.

У плечових кістках першої дослідної групи на 42-гу добу відбулася консолидація, ділянка кістково-мозкового каналу в місті дефекту мала дещо підвищену рентгенощільність та помірну періостальну реакцію дистальніше від місця кісткового дефекту.

У другій дослідній групі в ділянці передпліччя теж відбулася консолидація перелому. Від місця кісткової

травми проксимально виявляли зону періостальної реакції, проте місце дефекту мало однорідну рентгенощільність. За дослідження плечових кісток у собак другої дослідної групи місце дефекту було виповнене кістковим регенератом. Незначно візуалізувалися гранули композитного матеріалу, що входили до його складу і надавали йому неоднорідності. Дистально від місця дефекту виявляли зону періостальної реакції, що свідчило про перебіг репаративного остеогенезу переважно у межах кісткової травми.

Отже, за результатами рентгенологічного дослідження, за відсутності заміщення кісткових дефектів виникає подовження термінів консолидації переломів та посилення проліферації пері- та ендоосту як компенсуючого процесу.



Рис. 2. Рентгенограми плечових кісток собак різних груп до та після остеосинтезу

Біохімічні дослідження. Встановлено динамічні зміни маркерів кісткового метаболізму впродовж стадій репаративного остеогенезу, так, активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази (КЛФ), яка відображає активність остеобластів, на 3 добу після остеосинтезу в усіх групах збільшувалася в 1,4 раза ($P < 0,001$) порівняно з показниками у клінічно здорових собак. У наступні терміни, хоча і в усіх групах спостерігалася загальна закономірність динаміки активності цього остеогенного фермента, проте виявилися певні якісні та часові відмінності.

Так, в обох дослідних групах після застосування фібрину, збагаченого тромбоцитами як самостійно, так і у комбінації з кальцій-фосфатною керамікою максимальна активність КЛФ спостерігалась на 14 добу, за відсутності достовірної різниці між цими групами. Водночас у контрольній групі вона досягла піку на 21 добу.

При цьому вона виявилася вищою за показники контрольної групи. В першій дослідній групі на

14 добу в 1,1 раза ($P < 0,05$), а у другій на 7 та 14 добу – в 1,1 ($P < 0,05$) та 1,2 раза ($P < 0,001$), тобто в 2-й дослідній прослідковувалася тенденція до більшої активності КЛФ.

Загалом у дослідних групах відповідно до динаміки КЛФ остеогенез виявився більш раннім.

Досить показовою виявилася динаміка активності остеорезорбтивної тарtrat-резистентної кислоти фосфатази. Спочатку за кісткової травми її рівень знижувався в 1,2 раза ($P < 0,05$). Після остеосинтезу та остеозаміщення він поступово збільшувався, що проте достовірним виявилось в контрольній групі на 42 добу, в першій дослідній на 21, а в другій на 14 добу.

З одного боку, це свідчить про більш ранні процеси запальної остеорезорбції в дослідних групах, без яких неможливі остеогенні, та репаративного ремоделювання кісткових регенератів. З іншого, це відображає в другій дослідній групі остеointegraційні процеси кальцій-фосфатної кераміки.

Динаміка вмісту загального білка виявилася без достовірних змін у всіх групах.

Зміни вмісту в сироватці крові макроелементів за репаративного остеогенезу відбувалися в межах фізіологічної норми: для Са – 2,3–3,0 ммоль/л, для Р – 1,3–1,9 ммоль/л. Хоча після травми рівень фосфору виявився зменшеним в 1,1 раза (P < 0,01). Далі на 3-тю добу після остеосинтезу його концентрація була все ще нижчою у контрольній (P < 0,05) та першій

дослідній (P < 0,01) групі порівняно з показниками клінічно здорових тварин, проте достовірності різниці між групами не встановлено.

Концентрація кальцію на 3-тю добу після оперативного втручання була в усіх групах зниженою в 1,2 раза (P < 0,001), а далі поступово поверталася до норми і в другій дослідній групі у період з 21-ї до 42-ї доби в 1,1 раза (P < 0,01) виявилася вищою за показники клінічно здорових тварин.

Таблиця 2

Динаміка біохімічних показників у собак

Показники	Групи	Клінічно здорові (n = 10)	Після травми (n = 30)	3 доба	7 доба	14 доба	21 доба	42 доба
КЛФ, Од/л	I			29,38 ± 1,32***	31,5 ± 1,22***	33,25 ± 0,996***	38,0 ± 0,86***	30,6 ± 0,51***
	II	20,8 ± 1,24	23,08 ± 0,73	28,33 ± 1,02***	33,5 ± 0,89***	37,0 ± 0,91***	32,0 ± 0,71***	25,89 ± 1,14***
	III			28,25 ± 1,38***	36,0 ± 1,29***	38,5 ± 0,65***	31,8 ± 0,58***	23,25 ± 1,32**
ТрКФ, Од/л	I			21,41 ± 0,62	23,8 ± 0,60	22,6 ± 0,62	25,51 ± 0,89	30,58 ± 0,82***
	II	24,2 ± 1,26	20,78 ± 0,71*	23,28 ± 1,09	22,8 ± 0,70	23,65 ± 0,68	27,98 ± 0,59**	31,64 ± 0,67***
	III			22,98 ± 0,51	21,9 ± 0,88	27,25 ± 1,09**	30,65 ± 0,92***	29,9 ± 0,52***
Загальний білок, г/л	I			65,98 ± 1,55	70,04 ± 1,11	70,73 ± 0,97	69,78 ± 0,86	71,26 ± 1,68
	II	70,24 ± 2,21	68,41 ± 0,73	68,13 ± 1,28	69,57 ± 0,83	70,64 ± 0,59	70,5 ± 1,82	70,78 ± 1,56
	III			66,7 ± 1,05	69,93 ± 0,45	69,9 ± 1,33	70,92 ± 0,84	73,03 ± 0,93
Са, ммоль/л	I			2,05 ± 0,04***	2,23 ± 0,04***	2,33 ± 0,02***	2,21 ± 0,03***	2,43 ± 0,02
	II	2,46 ± 0,02	2,37 ± 0,05	2,08 ± 0,03***	2,29 ± 0,04**	2,38 ± 0,05	2,32 ± 0,08	2,49 ± 0,03
	III			2,13 ± 0,07***	2,30 ± 0,04**	2,53 ± 0,04***	2,60 ± 0,04***	2,60 ± 0,04***
Р, ммоль/л	I			1,31 ± 0,03*	1,39 ± 0,03	1,36 ± 0,02	1,41 ± 0,03	1,42 ± 0,03
	II	1,41 ± 0,03	1,3 ± 0,02**	1,3 ± 0,02**	1,39 ± 0,03	1,41 ± 0,04	1,45 ± 0,04	1,43 ± 0,03
	III			1,33 ± 0,03	1,42 ± 0,03	1,36 ± 0,03	1,41 ± 0,03	1,42 ± 0,04

Примітки: 1) I – контрольна, II – перша дослідна, III – друга дослідна групи; 2) значення P: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 порівняно з показниками контрольної групи; 3) значення P: • < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001 порівняно з клінічно здоровими тваринами

Це, найімовірніше, вказує про інтенсивний перерозподіл кальцію в межах кісткової тканини у період мінералізації кісткового регенерату та частково є відображенням остеointegraції та остеорезорбції кальцій-фосфатної кераміки.

За використання фібрину, збагаченого тромбоцитами, та гідроксиапатитної кераміки його рівень був із 14-ї і до 42-ї доби достовірно вищим у 1,1–1,2 раза (P < 0,01–0,001) порівняно з контрольною групою.

Отже, за клініко-рентгенологічними критеріями консолідації переломів і динамікою маркерів кісткового метаболізму остеозаміщення гідроксиапатитом з β-трикальційфосфатом та аутофібрином, збагаченим тромбоцитами, чи локальне використання тромбоци-

тарного аутофібрину має патогенетичні підстави для широкого застосування в травматології тварин-компаньонів.

Обговорення

Консолідація осколкових переломів відбувається за вторинним типом. При цьому нерідко стадії репаративного остеогенезу подовжуються внаслідок втраченого репаративного потенціалу за порушень ендостального чи періостального живлення кісткової тканини. Остеозаміщення, як один із методів оптимізації лікування осколкових переломів, вимагає певних характеристик або властивостей для матеріалів, якими

заповнюють кісткові дефекти. Композити чи кераміка виконують функцію матриці, тобто володіють остеокондуктивними властивостями (Wang et al., 2017). Фібрин, збагачений тромбоцитами, (PRF) як елемент регенеративної PRP-терапії, здатний до поступового виділення факторів росту із альфа-гранул та забезпечення адгезивних процесів, що сприяють міграції остеогенних клітин (Ho-Shui-Ling et al., 2018).

Під час репаративної регенерації кісткової тканини відбуваються процеси її синтезу та резорбції, які забезпечують відповідні клітини остеобласти та остеокласти. Перша стадія репаративного остеогенезу, як було встановлено попередніми дослідженнями, супроводжується надмірною запальною реакцією та підвищенням концентрацій білків гострої фази, що негативно впливає на процеси регенерації і подовжує консолідацію переломів. За даними (Rublenko et al., 2020), заміщення кісткових дефектів керамікою на основі гідроксиапатиту і β -трикальційфосфату, легуваної кремнієм, репаративний остеогенез прискорюється в 1,5 раза за рахунок ранньої мінералізації кісткового регенерату і скорочення його запально-резорбтивної стадії.

Також встановлено (Rublenko et al., 2014; Rublenko et al., 2015), що кальцій-фосфатна кераміка може забезпечити остеокондуктивний ефект та сприяти скороченню запально-резорбтивної фази. Для поліпшення властивостей та надання оптимальних характеристик композитним матеріалам проводяться дослідження щодо їх поєднання з низкою біологічних матеріалів, таких як стовбурові клітини, кісткові морфогенетичні білки, фактори росту, що містяться в гранулах тромбоцитів аутологічних матеріалів, виготовлених з власної крові пацієнта (Metineren et al., 2016; Croes et al., 2017; Dmitrijev & Khomyn, 2018). Проте за недостатньої апробації у ветеринарній ортопедії таких матеріалів їх використання доволі обмежене. При цьому за результатами клініко-рентгенологічних досліджень виникає більш динамічний перебіг консолідації переломів. За результатами власних попередніх досліджень (Shevchenko & Rublenko, 2020), застосування PRF та його комбінація з кальцій-фосфатними матеріалами сприяє скороченню запально-резорбтивної стадії. Також ці дослідження свідчать про те, що використання PRF та гранул гідроксиапатиту і β -трикальційфосфату не викликають негативних реакцій в організмі пацієнтів.

Обґрунтування ефективності впливу на метаболізм кісткової тканини вищезазначених матеріалів для оптимізації загоєння переломів у собак проводять шляхом визначення низки біохімічних маркерів, таких як кістковий ізофермент лужної фосфатази і тарtrat-резистентна кислота фосфатаза. При цьому оцінку вмісту макроелементів під час консолідації переломів також використовують для моніторингу регенерації кісткової тканини. Проте інформативність концентрації кальцію і фосфору в сироватці крові має доволі дискусійний характер (Rublenko et al., 2014).

Динаміка змін у дослідних групах кісткового ізоферменту лужної фосфатази – одного із тканинспецифічних ізоферментів, що виробляється остеобlastами, може свідчити про більш динамічний перебіг

остеорепаративних процесів (Sousa et al., 2011). Клітини остеокластичного ряду виробляють тарtrat-резистентну кислоту фосфатазу. Кисневі з'єднання, які вона генерує, руйнують компоненти кісткової матриксу і її рівень в сироватці крові є відображенням процесів остеорезорбції. Зменшення активності тарtrat-резистентної кислоти фосфатази у ранній період зумовлений зниженням функції остеокластів під час гострозапального процесу, а вища активність у дослідних групах на 21 добу свідчить про більш ранній початок перебудови кісткового мозоля та відповідно більш швидкий перебіг остеорепарації.

Висновки

1. За результатами клініко-рентгенологічного дослідження застосування PRF чи у складі композиту із гідроксиапатитом і β -трикальційфосфатом за переломів плечових кісток та передпліччя прискорює консолідацію переломів і сприяє меншій інтенсивності її запально-резорбтивної стадії.

2. Застосування PRF з кальцій-фосфатною керамікою для остеозаміщення сприяє оптимізації процесів регенерації в зоні кісткової травми за рахунок активації клітин остеобластичного ряду та зменшення інтенсивності остеорезорбтивної реакції з більш ранньою реакцією ремоделювання кісткового регенерату.

Відомості про конфлікт інтересів

Автори стверджують про відсутність конфлікту інтересів.

References

- Aghamohammadi Ameghani, B., Tavakoli, A., Hasani Tabatabaei, M., & Valizadeh, S. (2021). Effects of mineral trioxide aggregate and platelet-rich fibrin on histological results of direct pulp capping in dogs. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 35(1), 13–22. DOI: 10.32067/GIE.2021.35.01.01.
- Atala, A., Lanza, R., Mikos, A. G., & Nerem, R. (2019). *Principles of Regenerative Medicine*, 3 edn, Academic Press. URL: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128098806/principles-of-regenerative-medicine>.
- Badran, Z., Abdallah, M. N., Torres, J., Tamimi, F. (2018). Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. *Platelets*, 29(2), 105–112. DOI: 10.1080/09537104.2017.1327656.
- Bahney, C. S., Zondervan, R. L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J. W., Ahn, J., Mielau, T., Marcucio, R. S., & Hankenson, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 37, 35–50. DOI: 10.1002/jor.24170.
- Chemerovskiy, V. O., Rublenko, M. V., Rublenko, S. V., Ulanchych, N. V., Firstov, S. O., & Kolomiiets, V. V. (2021). Effect of implants of hydroxyapatite with tricalcium phosphates alloyed with Si on histomorphological and biochemical parameters in cases of bone defects of rabbits. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(2), 281–288. DOI: 10.15421/022137.
- Croes, M., Boot, W., Kruyt, M. C., et al. (2017). Inflammation-Induced Osteogenesis in a Rabbit Tibia Mod-

- el. Tissue engineering, 23(11), 73–685. DOI: 10.1089/ten.tec.2017.0151.
- Cuervo, B., Rubio, M., Chicharro, D., Damiá, E., et al. (2020). Objective Comparison between Platelet Rich Plasma Alone and in Combination with Physical Therapy in Dogs with Osteoarthritis Caused by Hip Dysplasia. *Animals (Basel)*, 10(2), 175. DOI: 10.3390/ani10020175.
- Davis, V., Abukabda, A., Radio, N., Witt-Enderby, P., Clafshenkel, W., Cairone, J., & Rutkowski, J. (2014). Platelet-Rich Preparations to Improve Healing. Part II: Platelet Activation and Enrichment, Leukocyte Inclusion, and Other Selection Criteria. *Journal of Oral Implantology*, 40(4), 511–521. DOI: 10.1563/AAID-JOIID-12-00106.
- Dmitrijev, V. S., & Khomyn, N. M. (2018). Application of means of stimulation of regenerative osteogenesis for complex treatment of dogs with fractures of the limb bones. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 20(92), 156–160. DOI: 10.32718/nvlvet9232.
- Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E. et al. (2018). Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells Current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143–162. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017.
- Li, Z., Müller, R., & Ruffoni, D. (2018). Bone remodeling and mechanobiology around implants: Insights from small animal imaging. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(2), 584–593. DOI: 10.1002/jor.23758.
- Metineren, H., Dülgeroğlu, T.C., Metineren, M. H., Aydin, E., & Kocak, C. (2016). Effectiveness of platelet-rich fibrin on tendon healing: experimental study in a rat model. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(7), 14260–14265. URL: <https://e-century.us/files/ijcem/9/7/ijcem0024817.pdf>.
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Bigham-Sadegh, A. (2014). Bone morphogenetic proteins: A powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 40(5), 459–481. DOI: 10.1002/biof.1177.
- Rabillard, M., Grand, J. G., Dalibert, E., Fellah, B., Gauthier, O., & Niebauer, G. W. (2009). Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar osteotomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 22(6), 460–466. DOI: 10.3415/VCOT-09-04-0048.
- Rublenko, M. V., Chemerovskiy, V. A., Andriiets, V. G., Ulyanchich, N. V., Kolomiets, V. V., & Koryak, A. S. (2020). Otsinka vykorystannia hidroksyapatytovoi keramiky, lehovanoi kremniem, dlia likuvannia frahmentovanykh perelomiv kistok u sobak [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 (in Ukrainian).
- Rublenko, M. V., Dudka, V. B., & Semenjak, S. A. (2015). Morfo-rentgenologichna i biohimichna harakterystyky reparatyvnogo osteogenezu za zamyslhennja kistkovykh defektiv biominom-GT u tvaryn [Morpho-radiological and biochemical characteristics of reparative osteogenesis with replacement of bone defects by biomine-GT in animals]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medycyny*, 99(1), 98–106 (in Ukrainian).
- Rublenko, M. V., Semenjak, S. A., & Ulyanchich, N. V. (2014). Dinamika biomarkeriv reparatyvnogo osteogenezu za umov zamyslhennja kistkovykh defektiv [Dynamics of biomarkers of reparative osteogenesis for conditions of replacement of bone defects]. *Naukovij visnyk LNUVMBT imeni S. Z. Gzhickogo*, 16(3), 287–294 (in Ukrainian).
- Semeniak, S. A., Rublenko, S. V., & Danyleiko, Y. M. (2014). Struktura perelomiv kistok u sobak v umovakh mehapolisu [The structure of fractures in dogs in the minds of the metropolis]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medycyny*, 13(108), 218–224 (in Ukrainian).
- Shevchenko, S. M. (2020). Dynamics of hematological indications, macromorphological and radiological picture of reparative osteogenesis in rabbits for platelet concentrates and hydroxyapatite ceramics. *Scientific Journal of Veterinary Medicine*, 1, 153–164.
- Shevchenko, S. M., & Rublenko, M. V. (2020). Gistologichna harakteristika zgustkiv fibrinu, zbagachenih trombocitami i oderzhanih za riznih rezhimiv centrifuguvannja krovi [Histological characteristics of Platelet-Rich Fibrin clots obtained under various modes of blood centrifugation]. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 22(99), 84–93. DOI: 10.32718/nvlvet9914 (in Ukrainian).
- Shevchenko, S. M., Rublenko, M. V., Ulyanchich, N. V., & Klymenko, P. P. (2021). Gistomorfologichna harakteristika osteozamyslhennja u kroliv gidroksiapatitnoju keramikoju ta fibrinom, zbagachenim trombocitami [Histomorphological characteristics of bone replacement in rabbits with hydroxyapatite ceramics and Platelet-Rich Fibrin]. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*, 23(102), 43–52. DOI: 10.32718/nvlvet10207.
- Snyder, R. J., Schultz, G., Wachuku, C., Rashid, A. M., & Ead, J. K. K. (2020). Proposed Mechanism of Action of Topically Applied Autologous Blood Clot Tissue: A Quintessential Cellular and Tissue Based Therapy. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 13, 20–140. DOI: 10.7547/20-140.
- Sousa, C., Abreu, H., Viegas, C., Azevedo, J., Reis, R., Gomes, M., & Dias, I. (2011). Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(4), 1007–1011. DOI: 10.1590/S0102-09352011000400029.
- Vagner, V. K., Putilin, V. M., & Harabuga, G. G. (1981) Metody i rezul'taty issledovaniya izofermentov (kishechnoj i pechenochnoj frakcij) syvorotochnoj shchelochnoj fosfatazy pri ostryh hirurgicheskikh zabojevanijah organov bryushnoj polosti [The research methods and results (intestinal and hepatic

- fractions) of serum alkaline phosphatase in case of acute surgical diseases of the abdominal organs]. *Voprosy medicinskoj himii*, 27(6), 752–755 (in Russian).
- Vertenten, G., Gasthuys, F., Cornelissen, M., Schacht, E., & Vlaminc, L. (2010) Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 23(3), 153–162. DOI: 10.3415/VCOT-09-03-0038.
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224–247. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007.
- Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res*, 7, 232–243. DOI: 10.1302/2046-3758.73.BJR-2017-0270.R1.
- Yang, Y., & Xiao, Y. (2020). Biomaterials Regulating Bone Hematoma for Osteogenesis. *Adv. Healthcare Mater*, 9(23), 2000726. DOI: 10.1002/adhm.202000726.
- Yeroshenko, O. V. (2012). Reaktsiia bilykh hostroi fazy u sobak z perelomamy kistok peredplichchia [Reaction of acute phase proteins in dogs with fractures of the forearm bones]. *Biolohiia tvaryn*, 14, 1–2 (in Ukrainian).
- Zhou, R., Wang, Y., Chen, Y., Chen, S. et al. (2017). Radiographic, Histologic, and Biomechanical Evaluation of Combined Application of Platelet-rich Fibrin with Blood Clot in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*, 43(12), 2034–2040. DOI: 10.1016/j.joen.2017.07.021.