

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/nvlvet10623

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

UDC 636.92.09:616-001.5/.073:666.3

## X-ray macromorphological and biochemical assessment of consolidation of fractures of long tubular bones under conditions of osteoreplacement with calcium-phosphate ceramics doped with germanium for osteoporosis in rabbits

T. P. Todosiuk<sup>1</sup>✉, M. V. Rublenko<sup>1</sup>, V. M. Vlasenko<sup>1</sup>, N. V. Ulanchych<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems in Material Science named after I.N. Frantsevich, National Academy of Sciences, Kyiv, Ukraine

### Article info

Received 25.04.2022

Received in revised form

30.05.2022

Accepted 31.05.2022

Bila Tserkva National Agrarian  
University, pl. Soborna 8/1, Bila  
Tserkva, 09117 Ukraine.  
Tel.: +38-096-757-71-75  
E-mail: tatyana.todosiuk@gmail.com

Institute for Problems in Material  
Science named after I.N. Frantsevich,  
National Academy of Sciences,  
Krzhizhanovsky Str., 3, Kyiv,  
03142, Ukraine.  
E-mail: ulnata@ukr.net

**Todosiuk, T. P., Rublenko, M.V., Vlasenko, V. M., & Ulanchych, N. V. (2022). X-ray macromorphological and biochemical assessment of consolidation of fractures of long tubular bones under conditions of osteoreplacement with calcium-phosphate ceramics doped with germanium for osteoporosis in rabbits. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 24(106), 149–157. doi: 10.32718/nvlvet10623**

Among several factors that can cause a violation of the course of reparative osteogenesis, previous diseases associated with a change in the structural and functional state of bone tissue and primarily osteoporosis are considered significant. Osteoporotic fractures are difficult to treat. Along with systemic therapy, locally applied bone substitute materials, particularly unalloyed and alloyed calcium phosphate ceramics with pronounced osteoconductive, osteoinductive, and osteointegration properties. The work aims to evaluate the effect of calcium-phosphate ceramics doped with germanium on post-traumatic bone regeneration in conditions of secondary osteoporosis in rabbits. Experimental osteoporosis in rabbits was induced by administration of 0.4 % dexamethasone solution (KRKA, Slovenia) for 21 days at a dose of 1.2 mg/kg of body weight. Experimental (n = 9) and control (n = 9) groups of animals were formed. Animals of the experimental group had defects replaced with granules of hydroxyapatite ceramics, synthesized based on hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate, doped with germanium. In rabbits of the control group, bone defects healed under a blood clot. Blood samples to determine the level of total calcium (Ca) and inorganic phosphorus (P) were taken before surgery and on 7-, 14th, 30th, and 60th day of the study. X-ray studies were performed on the RUM-20 X-ray machine on the 14th, 30th, and 60th day of reparative osteogenesis. Radiologically and macromorphologically, it was established that reparative osteogenesis in the experimental animals proceeds more dynamically compared to the control group and is characterized by a high density of bone tissue at the site of the defect already on the 14th day after the injury, a moderate periosteal and early appearance of the endosteal reaction. The content of total calcium in the animals of the experimental group on the 14th day after the injury was 1.3 times ( $P < 0.001$ ) higher than that of the control and animals before the operation, and on the 30th day, it was 1.2 times ( $P < 0.001$ ) in accordance. The concentration of inorganic phosphorus (P) on the 14th and 30th days of reparative osteogenesis in animals of the experimental group was 1.1 times ( $P < 0.05$ ) lower than in control animals, and on the 60th day in 1.4 times ( $P < 0.01$ ), respectively. Systemic osteoporosis in experimental animals causes a violation of reparative osteogenesis due to the prolongation of the inflammatory-resorptive stage and cartilaginous callus and complicated mineralization of bone regeneration. Calcium-phosphate ceramics is a promising material for replacing bone defects in animals with systemic secondary osteoporosis.

**Key words:** hydroxyapatite composite, bioceramics, bone fractures, compact and spongy bone tissue, rabbits.

## Рентгено-макроморфологічна і біохімічна оцінка консолидації переломів довгих трубчастих кісток в умовах остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою, легованою германієм, за остеопорозу в кролів

Т. П. Тодосюк<sup>1✉</sup>, М. В. Рубленко<sup>1</sup>, В. М. Власенко<sup>1</sup>, Н. В. Ульянчич<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Білоцерківський національний аграрний університет, м. Біла Церква, Україна

<sup>2</sup>Інститут проблем матеріалознавства ім. І. Н. Францевича Національної академії наук України, м. Київ, Україна

Серед низки факторів, що можуть викликати порушення перебігу репаративного остеогенезу, вагомими вважають попередні захворювання, пов'язані зі зміною структурно-функціонального стану кісткової тканини і насамперед остеопороз. Остеопоротичні фрактури погано піддаються лікуванню. У зв'язку з цим, поряд із системною терапією, місцево застосовують остеозаміщувальні матеріали, зокрема нелеговану та леговану кальційфосфатну кераміку з вираженими остеокондуктивними, остеоіндуктивними та остеointegraційними властивостями. Мета роботи – оцінка впливу кальцій-фосфатної кераміки, легованої германієм, на посттравматичну регенерацію кісток в умовах вторинного остеопорозу в кролів. Експериментальний остеопороз у кролів викликали введенням 0,4 % розчину дексаметазону (KRKA, Словенія) протягом 21 доби в дозі 1,2 мг/кг маси тіла. В подальшому прийом препарату відмінили. Було сформовано дослідну (n = 9) та контрольну (n = 9) групи тварин. Тваринам дослідної групи дефекти заміщували гранулами гідроксиапатитної кераміки, синтезованої на основі гідроксиапатиту і β-трикальційфосфату, легованої германієм. У кролів контрольної групи кісткові дефекти загоювалися під кров'яним згустком. Проби крові для визначення рівня загального кальцію (Ca) та неорганічного фосфору (P) відбирали до оперативного втручання та на 7-, 14-, 30-, 60-ту добу дослідження. Рентгенологічні дослідження проводили на рентгенапараті РУМ-20 на 14-, 30-, 60-ту добу репаративного остеогенезу. Рентгенологічно та макроморфологічно встановлено, що репаративний остеогенез у дослідних тварин протікає більш динамічно, порівняно з контрольною групою, і характеризується високою щільністю кісткової тканини в місці дефекту вже на 14-ту добу після травми, помірною періостальною та ранньою появою ендоостальної реакції. Вміст загального кальцію у тварин дослідної групи на 14-ту добу після травми був у 1,3 раза (P < 0,001) вищим за показник контрольних та тварин до операції, а на 30-ту добу в 1,2 раза (P < 0,001) відповідно. Концентрація неорганічного фосфору (P) на 14-ту і 30-ту добу репаративного остеогенезу в тварин дослідної групи була у 1,1 раза (P < 0,05) нижчою, ніж у контрольних тварин, а на 60-ту добу в 1,4 раза (P < 0,01) відповідно. Наявність системного остеопорозу у експериментальних тварин спричиняє порушення репаративного остеогенезу за рахунок подовження запально-резорбтивної стадії та хрящового мозоля і ускладненої мінералізації кісткового регенерата. Кальцій-фосфатна кераміка є перспективним матеріалом для заміщення кісткових дефектів у тварин із системним вторинним остеопорозом.

**Ключові слова:** гідроксиапатитний композит, біокераміка, переломи кісток, компактна і губчаста кісткова тканина, кролі.

### Вступ

Кістковій тканині притаманна складна багаторівнева організація та генетично зумовлена особливість до повної регенерації (реституції), що є оптимальним для забезпечення метаболічної, захисної та опорно-рухової функції осьового скелету та кісток вільних кінцівок у тварин. За певних порушень загального стану організму (імунологічної реактивності, неспецифічних механізмів захисту, ендокринної системи) та місцевих механізмів (мікроциркуляції, трофічних розладів, інфекційних процесів) спостерігається її порушення (дисрегенерація), що зумовлює відхилення як фізіологічного відновлення структурної організації кісткової тканини, так і її біомеханічних властивостей після травми (Sturmer, 1996; Brusko & Naiko, 2005; Bumeister & Pohorelov, 2008; Podaropoulos et al., 2009; Rublenko et al., 2015; Chemerovskiy, 2020; Shevchenko, 2020).

Серед низки факторів, що можуть викликати порушення перебігу репаративного остеогенезу, вагомими вважають попередні захворювання, пов'язані зі зміною структурно-функціонального стану кісткової тканини і насамперед остеопороз.

Остеопороз – це системне захворювання скелета, що характеризується зниженням щільності та міцності кісток, причиною якого є порушення метаболізму кісткової тканини і, як наслідок, підвищення ризику низькоенергетичних переломів (Egermann &

Schneider, 2005; Raisz, 2005; Wang et al, 2005; Abu-Amer et al, 2007; Oheim, 2016).

Остеопороз зазвичай розвивається безсимптомно, але є певна клінічна картина, яка вказує на можливий розвиток даної патології.

Залежно від причини, як у гуманній, так і у ветеринарній медицині, розрізняють первинний та вторинний остеопороз. Первинний розвивається як самостійна патологія, коли втрата кісткової тканини та зменшення її маси пов'язані з природними змінами (постменопаузальний, сенільний, ювенальний). Вторинний – виникає внаслідок ряду основних захворювань органів і систем (ревматичних, гормональних, аутоімунних патологій, хвороб органів кровотворення), ранньої оваріоектомії, довготривалої імібілізації за високоенергетичних переломів кісток, дії токсичних речовин або ж під впливом тривалого застосування лікарських препаратів, зокрема глюкокортикоїдів (Goldhahn et al., 2005; Smith et al., 2009; Oheim et al, 2012a; Oheim et al., 2012b; Bonucci & Balanti, 2014; Słupski et al., 2021; Oheim et al., 2022).

Остеопоротичні переломи належать до тяжких наслідків системного остеопорозу. Такого роду фрактури, внаслідок порушення процесів регенерації кісткової тканини та ризиків нестабільної фіксації уламків, пов'язаних з порушенням структурно-функціонального стану кісткової тканини, погано піддаються лікуванню. Відхилення від механізмів відновлення цілісності пошкоджених кісток нерідко призводять до уповільненої консолидації або навіть до

зупинки репаративної регенерації з подальшим стійким незрощенням кісток, утворенням несправжнього суглоба тощо (Giannoudis et al., 2007; Haaland et al., 2009). У зв'язку з цим проблема репаративної регенерації кістки в умовах остеопорозу є однією з актуальних як у гуманній, так і у ветеринарній медицині.

За патологій кістково-суглобового апарату дуже важливим є визначення остеорепаративного потенціалу хворих на остеопороз тварин та створення оптимальних умов перебігу репаративного остеогенезу як у ранній післяопераційний період, так і під час подальшої реабілітації. З цією метою, поряд із системною терапією, місцево застосовують остеозаміщувальні матеріали, зокрема нелеговану та леговану кальцій-фосфатну кераміку з вираженими остеоіндуктивними, остеоіндуктивними та остеоінтеграційними властивостями (Rublenko et al., 2015; Rublenko & Semeniak, 2015; Shevchenko, 2020).

Біологічні процеси, які підвищують потенціал загоєння остеопоротичних переломів, також варто розглядати як доповнення до хірургічного втручання. Зокрема, іони мікроелементів, якими безпосередньо легують керамічні матеріали, впливають на структурно-функціональний зв'язок між материнською кісткою та імплантом.

Отже, остеоіндуктивні властивості кераміки забезпечуються безпосередньо гідроксиапатитом та  $\beta$ -трикальційфосфатом. Остеоіндуктивний ефект імплантанта може бути досягнутий за рахунок легування композитних матеріалів різноманітними мікроелементами (Si, Ge, Na, K, Zn, Al, Ag, Cu), що володіють вираженими остеоіндуктивними властивостями.

На даний час для гуманної медицини синтезовано значну кількість германійорганічних з'єднань та комплексів, що володіють низькою токсичністю, високою біологічною активністю та позитивно впливають на організм тварини загалом. Германій належить до рідкісних мікроелементів. Завдяки своїм властивостям має широкий спектр біологічної дії, а саме підвищує імунний статус організму, забезпечує перенесення кисню в тканинах, проявляє протипухлинну дію, володіє знеболювальним ефектом. Хоча біологічна роль германію та його сполук ще не досить вивчена, однак встановлено, що сполуки германію підсилюють процес кровотворення в кістковому мозку (Fujii et al., 1993; Bian et al., 2017; Li et al., 2017).

Таким чином, незважаючи на певні успіхи у розробленні матеріалів для остеозаміщення, які відрізняються за фізичними показниками, хімічною структурою та механізмом дії, проблема вибору засобів для забезпечення оптимального перебігу репаративного остеогенезу за системного остеопорозу вимагає подальшого вивчення, тому дослідження в цьому напрямку є актуальними.

**Мета роботи** – оцінка впливу кальцій-фосфатної кераміки, легованої германієм, на посттравматичну регенерацію кісток в умовах вторинного остеопорозу в кролів.

## Матеріал і методи досліджень

Дослідження проводилися на базі кафедри хірургії та хвороб дрібних домашніх тварин Білоцерківського національного аграрного університету згідно з Законом України “Про захист тварин від жорстокого поводження” від 28.03.2006 р., Правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях від 13.11.1987 р., та Наказом МОН № 416/20729 від 16 березня 2012 р. “Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах”. Проект виконання представлених досліджень схвалено Етичним комітетом БНАУ протокол № 1 від 23 січня 2019 року.

Дослідження проводили на клінічно здорових кролях породи Каліфорнійський білий, віком 3 міс., масою тіла 2,5 кг, яких утримували в умовах віварію Білоцерківського НАУ. Тварини перебували в індивідуальних клітках у кімнаті з примусовою вентиляцією, комбінованим освітленням і щоденним прибиранням. Годівлю забезпечували спеціалізованим комбікормом для кролів із розрахунку 200 г на одну голову за добу з вільним доступом до води.

Експериментальний остеопороз у кролів викликали введенням 0,4 % розчину дексаметазону (KRKA, Словенія) протягом 21 доби в дозі 1,2 мг/кг маси тіла (Waters et al., 2000; Povorozniuk et al., 2012). В подальшому прийом препарату відмінили.

Було сформовано дослідну ( $n = 9$ ) та контрольну ( $n = 9$ ) групи тварин. За оперативного втручання застосовували таке анестезіологічне забезпечення: 2 % розчин ацепромазину внутрішньом'язово (0,5–1,0 мг/кг), внутрішньовенно – розчин тіопенату із розрахунку 5–8 мг/кг та інфільтраційну анестезію на місці розрізу 0,5 % розчином лідокаїну (3–4 мг/кг). Також було сформовано групу із клінічно здорових кролів.

Модельні дефекти формували з латеральної поверхні дистальної ділянки метафіза стегнової кістки (губчаста кісткова тканина) та дорсо-латеральної поверхні в ділянці діафізу променевої кістки (компактна кісткова тканина). Оперативний доступ проводили з дотриманням правил асептики та антисептики. Після розтину окістя формували дірчасті кісткові дефекти свердлом діаметром 3 мм та 4,2 мм на променевій та стегнової кістках відповідно. Тваринам дослідної групи (ГТлGe) дефекти заміщували гранулами гідроксиапатитної кераміки, синтезованої на основі гідроксиапатиту і  $\beta$ -трикальційфосфату, легованої германієм. У кролів контрольної групи кісткові дефекти загоювалися під кров'яним згустком. На рани м'яких тканин накладали вузлові шви із синтетичного шовного матеріалу поліпропілену.

Тваринам щоденно у післяопераційний період проводили загальне клінічне дослідження та візуальну оцінку ранового процесу. Загоєння ран відбувалося за первинним натягом, тому шви знімали на 7 добу.

Тварин виводили з дослідів на 14-ту, 30-ту, 60-ту добу шляхом внутрішньовенного введення тіопенату в дозі 50 мг/кг (тіопентал натрію, ООО Бровафарма, Україна).

Рентгенологічні дослідження виконували на рентгенапараті РУМ-20, отримані рентгензнімки відцифровували на електронний носій AGFA HEALTHCARE N.V. CR 10-X (Germany). При цьому проводили бальну оцінку консолидації перелому в умовах остеопорозу за розробленими нами рентгенологічними критеріями (табл. 1), яку сумували протягом всіх термінів дослідження.

Рівень загального кальцію (Ca) та неорганічного фосфору (P) в сироватці крові визначали наборами “Філісіт-Діагностика” (Україна) на 7-му, 14-ту, 30-ту, 60-ту добу.

Статистичну обробку результатів проводили за програмою Statistica 10 (StatSoft Inc, USA, 2011). Дані у таблицях подані у вигляді  $x \pm SD$  ( $x \pm$  відхилення). Між групами відмінності визначали за допомогою ANOVA,  $P < 0,05$  вважались достовірними (з урахуванням поправки Бонферроні).

### Таблиця 1

Бальна оцінка консолидації переломів довгих трубчастих кісток за остеопорозу в кролів

№ п/п	Показники	Кількість балів
<i>Рентгендіагностика</i>		
<i>ступінь щільності кісткової тканини</i>		
1.	– 14 доба	3
	– 30 доба	2
	– 60 доба	1
<i>ступінь поширення періостальної реакції</i>		
2.	– в межах дефекту	3
	– за межами дефекту	2
	– зміни в суміжній (ліктьовій) кістці	1
<i>реакція ендоосту</i>		
3.	– 14 доба	3
	– 30 доба	2
	– 60 доба	1
	– реакція ендоосту відсутня	0

### Результати дослідження

Наступної доби після відтворення модельного перелому порушень функції травмованої кінцівки не спостерігали. В ділянці травми виявляли незначні набряк, гіперемію та підвищення місцевої температури, що є ознаками розвитку запальної реакції. З країв рани були помітні виділення незначної кількості серозного ексудату, який з часом підсихав, утворюючи кірочки. На 3-тню добу ексудатія припинялася, підвищення місцевої температури не виявляли. На 7-му добу післяопераційного періоду набряк та болючість тканин в ділянці травми були відсутні. Виявляли з'єднання країв рани щільною сполучнотканинною спайкою, часткове відшарування струпа та процеси епітелізації, що свідчить про загоєння рани та є підставою для зняття швів.

Поряд з цим пальпаторно, починаючи з 14-ї доби репаративного остеогенезу у тварин обох груп як на діафізах променевих кісток, так і на дистальних епіфізах стегнових кісток, виявляли не болюче ущільнення періосту, яке у дослідній групі повністю зникало до

30-ї доби. Проте у тварин контрольної групи ущільнення було дещо більше за розміром, порівняно з тваринами дослідної групи, та залишалося до завершення терміну спостережень.

За результатами рентгенологічного дослідження (рис. 1 а) на 14-ту добу репаративного остеогенезу в дослідних тварин у місці сформованого модельного дефекту візуалізувалися гранули кераміки, помірна періостальна реакція, обмежена безпосередньо навколо місця травми з помірно підвищеною рентгенологічною щільністю. За травми компактною кістковою тканиною у тварин дослідної групи рентгенологічно встановлена більш виражена реакція ендоосту. Натомість реакція ендоосту у контрольних тварин виявилася незначною.

На рентгенограмах контрольних тварин чітко візуалізувалося місце дефекту та виявляли ущільнення періосту, яке значно поширюється проксимально та дистально від нього. Щодо діафізу променевої кістки, то хмароподібна тінь поширювалася майже по всій його поверхні, що свідчить про інтенсивну запальну реакцію з утворенням масивного хрящово-кісткового мозоля.

На 30-ту добу на рентгенограмах дослідних тварин візуалізувалися незначні залишки періостальної реакції, місце дефекту характеризувалося підвищеною рентгенологічною щільністю. Гранули композитного матеріалу втратили свою структурованість і щільність, що свідчить про початок його резорбції.

Водночас у контрольних тварин рентгенологічно на 30-ту добу спостерігали ущільнення періосту майже по всій довжині променевої кістки з поширенням на ліктьову і утворенням масивного кісткового мозоля. У ділянці дистального метафізу стегнової кістки навколо дефекту виявляли явища остеосклерозу з точковими ділянками остеопорозу (рис. 1 б).

На 60-ту добу у тварин дослідної групи місце дефекту мало підвищену рентгенологічну щільність з незначними залишками композитного матеріалу, а реакція періосту була відсутня. Дистальний метафіз стегнової кістки набув шорсткого вигляду з ділянками остеопорозу, що може бути ознакою ремоделювання ділянки травми. На рентген знімках контрольних тварин ділянки сформованого дефекту мали низьку рентгенологічну щільність, натомість візуалізувався надмірний об'єм кісткового регенерату та періостальна реакція, яка все ще поширювалася як на променево, так і на ліктьову кістки (рис. 1 в).

За бальної оцінки рентгенограм встановлено, що в тварин дослідної групи за імплантації гранул кераміки, легованої германієм, ступінь щільності кісткової тканини була вищою у 2,5 раза ( $P < 0,001$ ) порівняно з показниками контрольної групи. За оцінки реакції пері- та ендоосту спостерігалася схожа динаміка. Отже, за проведення бальної оцінки встановлено, що репаративний остеогенез у дослідних тварин протікає більш динамічно, а саме в 2,7 раза ( $P < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою і характеризується високою щільністю кісткової тканини в місці дефекту вже на 14-ту добу після травми, помірно періостальною та ранньою появою ендоостальної реакції (табл. 2).



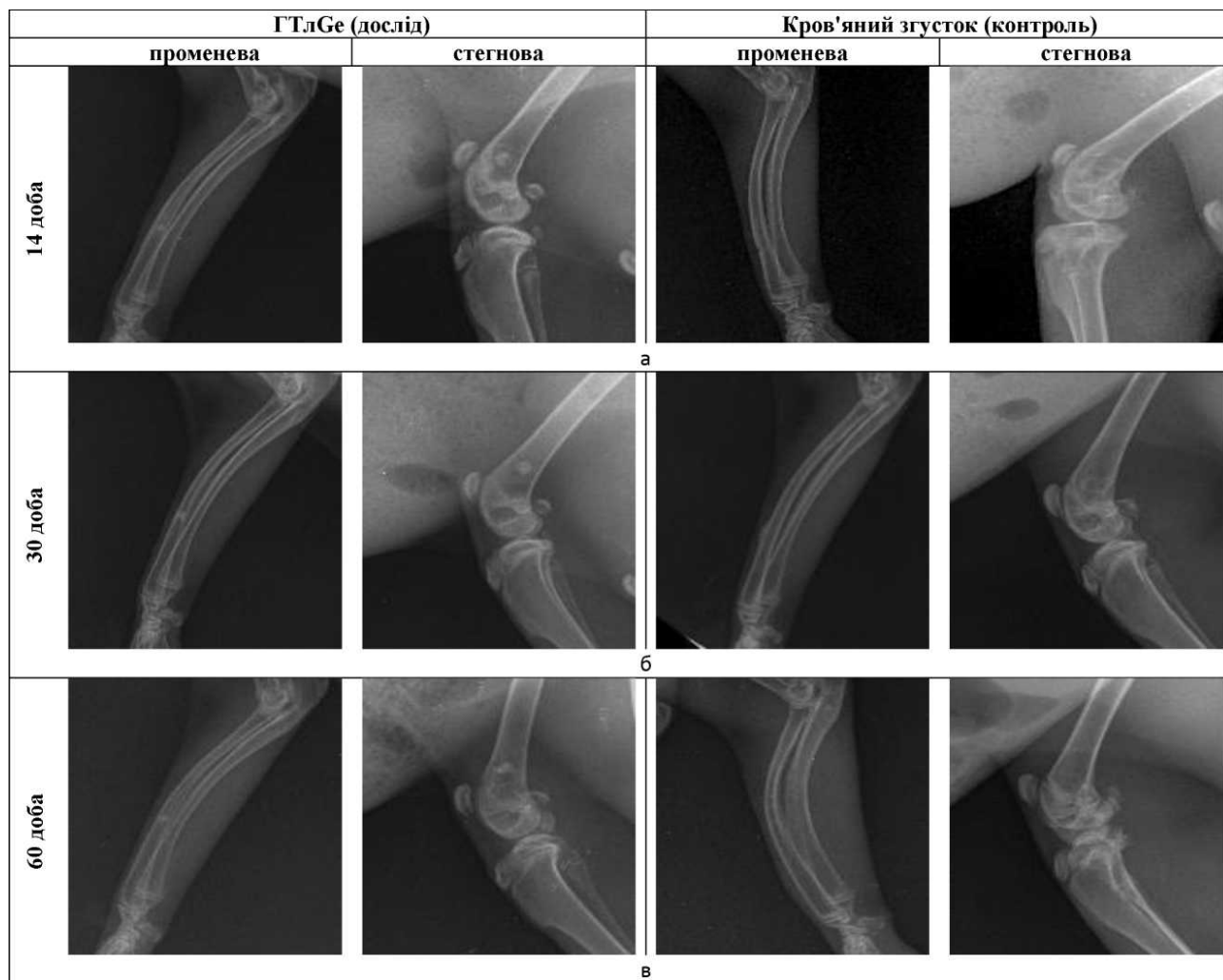


Рис. 1. Рентгенограми кісток кролів з остеопорозом за репаративного остеогенезу

Таблиця 2

Бальна оцінка репаративного остеогенезу в кролів з остеопорозом за рентгенологічного дослідження

№ п/п	Показники	Кількість балів	
		ТТлGe	Контроль
<i>Рентгенодіагностика</i>			
1	ступінь щільності кісткової тканини	2,78 ± 0,15***	1,11 ± 0,11
2	поширення періостальної реакції	2,89 ± 0,11***	1,22 ± 0,15
3	реакція ендоосту	2,67 ± 0,17***	0,78 ± 0,15
<i>Загальна оцінка</i>		2,78 ± 0,06***	1,03 ± 0,13

Примітка: \*\*\* – P < 0.001 порівняно з показниками контрольної групи

За макроморфологічного дослідження фрагментів променевих та стегнових кісток на 14-ту добу репаративного остеогенезу у тварин дослідної групи в місці дефекту виявляли гранули кераміки, повністю занурені у сформований фіброзно-хрящовий регенерат, який рівномірно заповнював ділянку дірчастого дефекту і лише незначно виступав над поверхнею кістки. Значного розростання періосту не спостерігали. У контрольній групі місце сформованого дефекту виявилось не повністю замощеним новоутвореною тканиною, про що свідчила кратероподібна форма кісткового регенерату значного розміру. Проте виявляли масивні, зі значним поширенням за межі травмованої ділянки. розростання періосту (рис. 2 а).

На 30-ту добу репаративного остеогенезу макрокартини кісткових фрагментів дослідних тварин була такою: кістковий дефект повністю заповнений новоутвореною тканиною, яка не підвищувалася щодо рівня площини кісткової поверхні, та щільно вкритий періостом без ознак його надмірних розростань. У товщі регенерату візуалізувалися фрагменти гранул композиту. У тварин контрольної групи ділянка дефекту не мала щільної консистенції, в її центрі візуалізувався кратероподібний кістковий мозоль, але значно меншого розміру порівняно з попереднім терміном дослідження. Розростання періосту залишалися досить масивними і значно поширювалися за межі травмованої ділянки (рис. 2 б).

На 60-ту добу репаративного остеогенезу в дослідних тварин виявляли сформовану кісткову тканину із залишками гранул композитного матеріалу, що міцно з'єднані з кісткою. Ознак періостальної реакції не спостерігали. У контрольних зразках на 60-ту добу досить значними залишалися розростання періосту.

Місце травми не повністю було виповнене новоутвореною кістковою тканиною, в його центрі все ще візуалізувався невеликого розміру кратероподібний дефект з ознаками резорбції кісткової тканини (рис. 2 в).

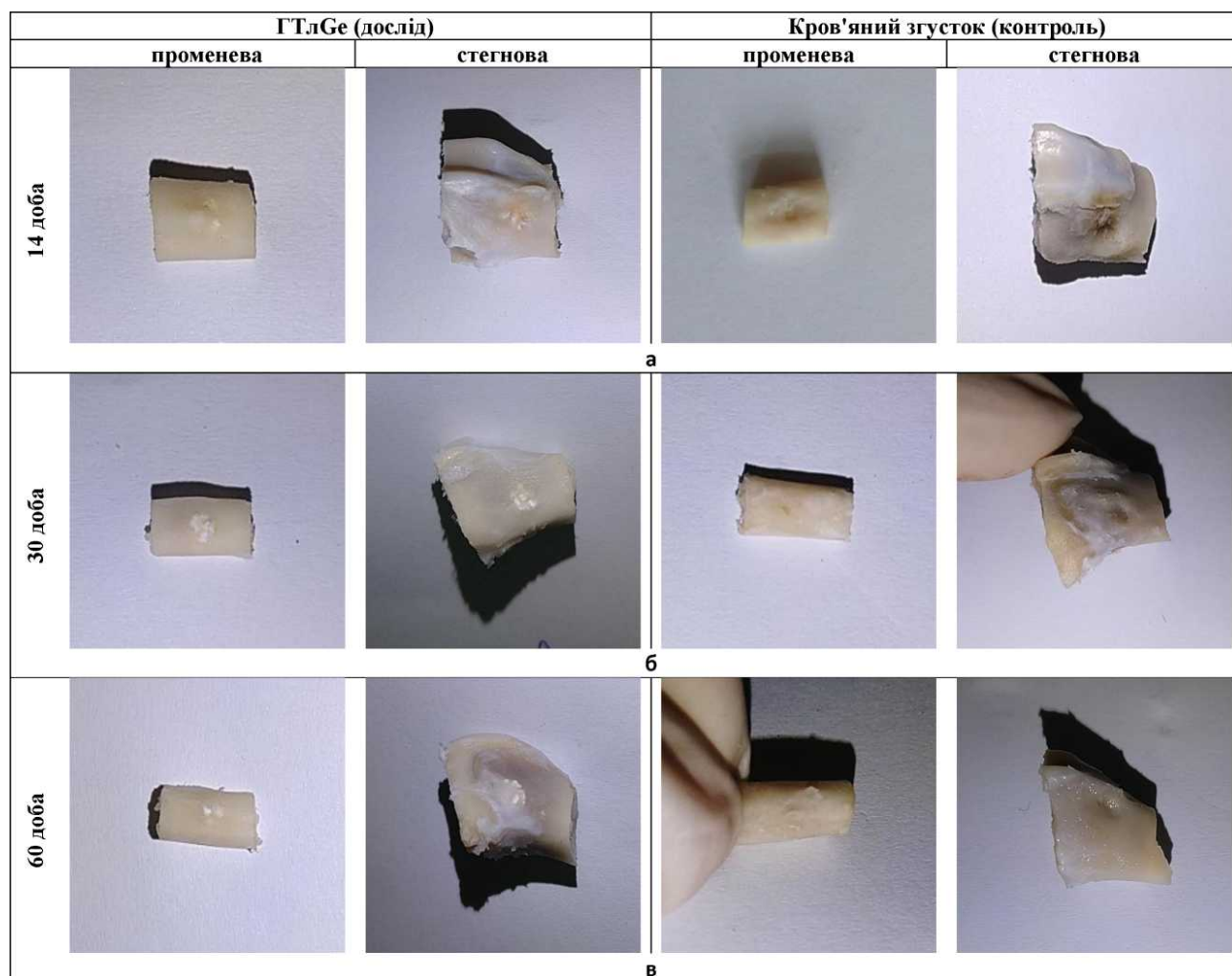


Рис. 2. Макроморфологічна оцінка фрагментів кісток кролів з остеопорозом за репаративного остеогенезу

Вміст загального кальцію у тварин дослідної групи протягом дослідження зазнав певних змін. Вже на 7 добу репаративного остеогенезу він становив  $1,41 \pm 0,02$  ммоль/л, що в 1,1 раза ( $P < 0,001$ ) вище за показник контрольних тварин. На 14-ту добу після травми рівень Ca в сироватці крові дослідних тварин був у 1,3 раза ( $P < 0,001$ ) вищим за показник контрольних та тварин до операції, а на 30-ту добу в 1,2 раза ( $P < 0,001$ ) відповідно. На 60-ту добу репаративного остеогенезу вміст Ca становив  $1,5 \pm 0,04$  ммоль/л, що в 1,2 раза вище за показник контрольних тварин. Варто зазначити, що у тварин, яким дефект лишали загоюватися під кров'яним згустком, рівень загального Ca суттєво не змінювався протягом усього періоду дослідження (табл. 3).

Концентрація неорганічного P в сироватці крові на 7 добу репаративного остеогенезу в обох групах суттєво не змінилася. Проте, вже на 14-ту добу після

травми у тварин дослідної групи рівень P був у 1,1 раза ( $P < 0,05$ ) нижчим, ніж у контрольних тварин. На 30-ту добу концентрація P у тварин дослідної групи складала  $2,14 \pm 0,04$  ммоль/л, що 1,1 раза ( $P < 0,01$ ) нижче за показник контрольних і в 1,2 раза – за показники тварин до операції. На 60-ту добу рівень неорганічного P продовжував знижуватися і становив  $1,7 \pm 0,03$  ммоль/л, що в 1,4 раза ( $P < 0,01$ ) нижче за показники контрольних тварин (табл. 3).

Протягом дослідження значних змін кальцій-фосфорного індексу в тварин контрольної групи не виявляли. Проте в дослідній, починаючи з 7-ї доби, фіксували достовірну різницю показників щодо контрольних тварин. На 7-му добу Ca:P співвідношення було 1,2 : 1, на 14-ту та 30-ту добу – 1,4:1. На 60 добу репаративного остеогенезу Ca:P індекс дещо збільшився і склав 1,6:1 порівняно з контрольною групою тварин (табл. 3).

Таблиця 3

Динаміка біохімічних показників крові за репаративного остеогенезу у кролів з остеопорозом

Доба	Са, ммоль/л	Р, ммоль/л	Са:Р
Норма (n = 27)	2,57 ± 0,03	1,44 ± 0,04	1,82 ± 0,07
0 до операції, (n = 18)	1,25 ± 0,04	2,52 ± 0,05	0,5 ± 0,02
7 ГТлГе, (n = 9)	1,41 ± 0,02***	2,5 ± 0,05	0,57 ± 0,02**
Контроль, (n = 9)	1,25 ± 0,02	2,56 ± 0,05	0,49 ± 0,01
14 ГТлГе, (n = 9)	1,68 ± 0,06***	2,3 ± 0,08*	0,74 ± 0,02***
Контроль, (n = 9)	1,3 ± 0,02	2,51 ± 0,03	0,52 ± 0,01
30 ГТлГе, (n = 6)	1,57 ± 0,03***	2,14 ± 0,04**	0,74 ± 0,02***
Контроль, (n = 6)	1,26 ± 0,04	2,37 ± 0,04	0,53 ± 0,02
60 ГТлГе, (n = 3)	1,5 ± 0,04**	1,7 ± 0,03**	0,88 ± 0,03***
Контроль, (n = 3)	1,26 ± 0,02	2,31 ± 0,03	0,54 ± 0,02

Примітка: значення Р: \* – &lt;0,05; \*\* – &lt;0,01; \*\*\* – &lt; 0,001, порівняно з контрольною групою

Отже, зміни показників загального кальцію, неорганічного фосфору та їх співвідношення загалом відповідає рентгенографічним та макроморфологічним змінам, що характерні для репаративного остеогенезу за використання кальцій-фосфатної кераміки в умовах сформованого вторинного остеопорозу. При цьому результати досліджень підтверджують покращення перебігу регенерації кісткової тканини за використання гідроксиапатиту з β-трикальційфосфатом, легованого германієм.

### Обговорення

Проблема остеопорозу у ветеринарній медицині може розглядатися з різних позицій, зокрема, з медико-біологічної точки зору та безпосередньо як проблематика тварин різних видів. Особливу увагу у вивченні даного захворювання приділяють дрібним домашнім тваринам. Це насамперед пов'язано з багатфакторністю етіології, подовженням віку тварин, порушеннями оптимальних процедур розведення, наслідком якого є недосконале генотипування нащадків, екологічними факторами і, що важливо для тварин-компаньйонів, умовами утримання та годівлі, оскільки у шкірі цих тварин не відбувається синтезу вітаміну D.

Щодо практичних питань дослідження тварин з остеопорозом – це складність клініко-діагностичних алгоритмів, низька доступність засобів і способів діагностики (денситометрія, магнітно-резонансна томографія, подвійна енергетична рентгенівська абсорбціометрія, комп'ютерна томографія) та недостатнє використання лабораторних методів дослідження крові при діагностиці тварин з підозрою на остеопороз, зокрема на вміст загального та іонізуючого кальцію, неорганічного фосфору та безпосередньо біохімічних маркерів кісткового метаболізму (лужної фосфатази та її кісткового ізоферменту, тартратрезистентної кислоти фосфатази, остеокальцину, паратгормону, вітаміну D, карбокситермінального пропептиду колагену I типу, дезоксипіридиноліну).

У зв'язку з цим досить часто спочатку діагностують власне нозологічні форми, зумовлені остеопорозом, такі як деформації кісток кінцівок, дисплазії кульшового та ліктьового суглобів, асептичний некроз

головки стегнової кістки, переломи кісток і лише постфактум в процесі подальших досліджень виявляють їх причину, а саме системний остеопороз.

Остеопоротичні фрактури, внаслідок порушення структурно-функціонального стану кісткової тканини, погано піддаються лікуванню (Haaland et al., 2009). Тому є необхідність застосування додаткових засобів для створення оптимальних умов перебігу репаративного остеогенезу, а саме місцеве застосування остеозаміщувальних матеріалів, зокрема легованої іонами мікроелементів кальцій-фосфатної кераміки (Rublenko et al., 2015; Chemerovskiy, 2020).

На підставі раніше проведених досліджень (Rublenko et al., 2015; Chemerovskiy, 2020; Todosiuk, 2020) було розроблено композитний матеріал, до складу якого входить гідроксиапатит з β-трикальційфосфатом, легований германієм.

За результатами дослідження використання гідроксиапатитної кераміки, легованої германієм, зумовлює більш динамічний перебіг репаративного остеогенезу у тварин дослідної групи порівняно з контрольними. Так, вже на 14-ту добу після травми як за рентгенологічних, так і макроморфологічних досліджень ділянка дефекту характеризується підвищеною рентгенщільністю, помірною періостальною та ранньою ендостальною реакцією.

Динаміка вмісту макроелементів у сироватці крові кролів і собак зазвичай, за репаративного остеогенезу не є показовою, оскільки зміни відбуваються в межах фізіологічної норми на підставі розподільного механізму їх у системі кісткового скелету (Chemerovskiy, 2020; Shevchenko, 2020). Натомість в умовах системного остеопорозу набувають розвитку гіпокальціємія і гіперфосфатемія, що ускладнюють репаративний остеогенез. Проте за остеозаміщення гідроксиапатитною керамікою, легованою германієм, достовірно відбувається процес поступового вирівнювання Са:Р індекса, що, найімовірніше, свідчить про задіявання для цього мікроелементів із композитного матеріалу.

Отже, гідроксиапатитний композит з β-трикальційфосфатом, легований германієм, може бути перспективним у травматології та ортопедії тварин-компаньйонів як за травматичних, так і за низькоенергетичних переломів кісток, зумовлених систе-

мними остеопоротичними змінами кісткової тканини безпосередньо у тварин-компаньйонів.

### Висновки

1. Наявність системного остеопорозу в експериментальних тварин спричиняє порушення репаративного остеогенезу за рахунок подовження запально-резорбтивної стадії та хрящового мозоля і ускладненої мінералізації кісткового регенерата.

2. Кальцій-фосфатна кераміка є перспективним матеріалом для заміщення кісткових дефектів у тварин з системним вторинним остеопорозом.

### Конфлікт інтересів

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів в даній роботі.

### Подяка/фінансування

Дослідження виконані відповідно до затвердженої теми дисертаційної роботи “Застосування біоінженерних композитів на основі гідроксиапатиту, колагену і фібрину для оптимізації регенерації тканин опорно-рухового апарату в тварин” (протокол № 4 від 28 листопада 2019 року) та виконання Держбюджетної тематики “Доклінічні дослідження виробів із зроблених біоматеріалів” № 48/1 від 27.08.19 р. в рамках виконання науково-дослідної роботи “Розробка та доведення до впровадження в клінічну практику кісткових імплантів різного призначення з новітніх біоматеріалів для відновлення кісткової тканини та функції кісток після поранень в бойових діях” (Договір № 515 від 17 квітня 2019 р.) відповідно до цільової науково-технічної програми НАН України “Дослідження і розробки з проблем підвищення обороноздатності і безпеки держави” та Розпорядження Президії НАН України від 16.04.2019 № 255.

### References

Abu-Amer, Y., & Darwech, I. & Otero, J. (2007). Osteoporosis and Osteopetrosis. DOI: 10.1002/9780470015902.a0006017.

Bian, D., Zhou, W., Den, J., & Li, Y. (2017). Development of magnesium-based biodegradable metals with dietary trace element germanium as orthopaedic implant applications. *Acta Biomaterialia*, 64, 421–436. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.10.004.

Bonucci, E., & Ballanti, P. (2014). Osteoporosis-bone remodeling and animal models. *Toxicol Pathol*, 42(6), 957–969. DOI: 10.1177/0192623313512428.

Brusko, A. T., & Haiko, H. V. (2005). Funktsionalnaia perestroika kostei u ee klynycheskoe znachenye [Functional reconstruction of bones and its clinical significance]. *Luhansk, Luhanskyi hosudarstvennyy medytsynskiy unyversytet* (in Russian).

Bumeister, V. I., & Pohorelov, M. V. (2008). Suchasnyi pohliad na reparatyvnyi osteohenez. [A modern view of reparative osteogenesis]. *Svit medytsyny ta biolohii*, 4, 104–110 (in Ukrainian).

Chemerovskiy, V. O. (2020). *Renthenohrafichna, makromorfolohichna i hematolohichna otsinka*

*hidroksyapatytnoi keramiky z riznyimi fizyko-khimichnymy vlastyvostyami* [Radiographic, macromorphological and hematological evaluation of hydroxyapatite ceramics with different physical and chemical properties]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny*, 1, 140–152. DOI: 10.33245/2310-4902-2020-154-1-140-152 (in Ukrainian)

Egermann, M. J., & Schneider, G. E. (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 16, 129–138. DOI: 10.1007/s00198-005-1859-7.

Fujii, A., Kuboyama, N., Yamane, J., Nakao, S., & Furukawa, Y. (1993). Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats. *General Pharmacology: The Vascular System*, 24(6), 1527–1532. DOI: 10.1007/s10653-017-0061-0.

Giannoudis, P., Tzioupis, C., Almkali, T., & Buckley, R. (2007). Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different?: A basic science perspective. *Injury*, 38(1), S90-S99. DOI: 10.1016/j.injury.2007.02.014.

Goldhahn, J., Jenet, A., Schneider, E., & Lill, C. A. (2005). Slow rebound of cancellous bone after mainly steroid-induced osteoporosis in ovariectomized sheep. *J Orthop.Trauma*, 19(1), 23–28. DOI: 10.1097/00005131-200501000-00005.

Haaland, P. J., Sjöström, L., Devor, M., & Haug, A. (2009). Appendicular fracture repair in dogs using the locking compression plate system: 47 cases. *Vet. Comp. Orthop Traumatol.*, 22(4), 309–315. DOI:10.3415/VCOT08-05-0044.

Li, L., Ruan, T., Lyu, Y., & Wu, B. (2017). Advances in Effect of Germanium or Germanium Compound on Animals. *Journal of Biosciences and Medicines*, 5(7), 56–73. DOI: 10.4236/jbm.2017.57006.

Oheim, R., Amling, M., Ignatius, A., & Pogoda, P. (2012a). Large animal model for osteoporosis in humans: the ewe. *Eur Cell Mater*, 24, 372–385. DOI: 10.22203/ecm.v024a27.

Oheim, R., Beil, F.T., Barvencik, F., Egermann, M., Amling, M., Clarke, I. J. et al. (2012b). Targeting the lateral but not the third ventricle induces bone loss in ewe: An experimental approach to generate an improved large animal model of osteoporosis. *Trauma Acute Care Surg*, 72(3), 720–726. DOI: 10.1097/TA.0b013e318238b3bd.

Oheim, R., Schinke, T., Amling, M., & Pogoda, P. (2016). Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? *Injury*, 47(1), S3–S9. DOI: 10.1016/S0020-1383(16)30002-X.

Oheim, R., Tsourdi, E., Seefried, L., Beller, G., Schubach, M., Vettorazzi, E. et al. (2022). Genetic Diagnostics in Routine Osteological Assessment of Adult Low Bone Mass Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*, 107(7), e3048–e3057. DOI: 10.1210/clinem/dgac147.

Podaropoulos, L., Veis, A.A., Papadimitriou, S., Alexandridis, C., et al. (2009). Bone regeneration using b-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. *Implantol*, 35(1), 28–36. DOI: 10.1563/1548-1336-35.1.28.

Povorozniuk, V. V., Dedukh, N. V., Hryhoreva, N. V., & Hopkalova, Y. V. (2012). Eksperymentalnyi osteoporoz. [Experimental osteoporosis]. Kyiv (in Ukrainian).



- Raisz, L. G. (2005). Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest*, 115(12), 3318–3325. DOI: 10.1172/JCI27071.
- Rublenko, M. V., & Semeniak, S. A. (2015). Morfo-renthenolohichna i biokhimichna kharakterystyka reparatyvnoho osteohenezu za zamishchennia kistkovykh defektiv Biomin-HT u tvaryn. [Morpho-radiological and biochemical characteristics of reparative osteogenesis for replacing bone defects with Biomin-HT in animals]. *Nauk. visnyk vet. medytsyny: zb. nauk. prats. Bila Tserkva*, 1(118), 98–106 (in Ukrainian).
- Rublenko, M. V., Andriiets, V. H., Semeniak, S. A., & Ulianchych, N. V. (2015). Vykorystannia kompozytnykh materialiv za perelomiv trubchastykh kistok u tvaryn. [The use of composite materials for fractures of tubular bones in animals]. *Bila Tserkva* (in Ukrainian).
- Shevchenko, S. M. (2020). Dynamika hematolohichnykh pokaznykiv, makromorfolohichna i renthenolohichna kartyny reparatyvnoho osteohenezu v kroliv za vykorystannia trombocytnykh kontsentrativ ta hidroksyapatytoi keramiky. [Dynamics of hematological indicators, macromorphological and X-ray pictures of reparative osteogenesis in rabbits using platelet concentrates and hydroxyapatite ceramics]. *Naukovyi visnyk veterynarnoi medytsyny*, 1, 153–164. URL: <https://nvvm.btsau.edu.ua/en/content/dynamics-hematological-parameters-macromorphological-and-radiological-results-reparative#bootstrap-fieldgroup-nav-item--annotation> (in Ukrainian).
- Słupski, W., Jawien, P., & Nowak, B. (2021). Botanicals in Postmenopausal Osteoporosis. *Nutrients*, 13(5), 1609. DOI: 10.3390/nu13051609.
- Smith, S. Y., Jollette, J., & Turner, C. H. (2009). Skeletal health: primate model of postmenopausal Osteoporosis. *Am J Primatol*, 71, 752–765. DOI: 10.1002/ajp.20715.
- Sturmer, K. M. (1996). Pathophysiology disrupted bone healing. *Orthopaede*, 25(5), 386–393. DOI: 10.1007/s001320050039.
- Todosiuk, T. P. (2020). Rentheno- ta makromorfolohichna otsinka reparatyvnoho osteohenezu za implantatsii hidroksyapatytnoho kompozytu, lehovanoho hermaniiem [X-ray and macromorphological evaluation of reparative osteogenesis after implantation of hydroxyapatite composite doped with germanium]. *Nauk. visnyk vet. med.*, *Bila Tserkva*, 2, 183–194. DOI: 10.33245/2310-4902-2020-160-2-183-194 (in Ukrainian).
- Wang, J. W., Li, W., Xu, S. W. et al. (2005). Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chin. J. Traumatol*, 8(2), 111–116. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15769311>.
- Waters, R. V., Gamradt, S. C., Asnis, P. et al. (2000). Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *Acta Orthop. Scand*, 71(3), 316–321. DOI: 10.1080/000164700317411951.