

УДК 616.718.4-089.844-092.9]:[591.143:57.088.6]](048.3)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872023134-40>

## Біохімічні показники сироватки крові щурів різного віку після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки аlogenними кістковими імплантатами

П. М. Воронцов, Ф. С. Леонтєва, В. О. Туляков

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків

*Bone defects that do not heal on their own are a significant problem in orthopaedic and trauma surgery. One of the approaches to its solution is the use of bone alloimplants (AloI). Objective. On the basis of the analysis of biochemical indicators of the metabolism of connective tissue in the blood serum of laboratory rats, the course of metabolic processes after the filling of the defect in the metaphysis of the AloI femur was evaluated. Methods. A model of creating a transcortical defect of critical size (diameter 3 mm, depth 3 mm) in the metaphysis of the femur of 3- and 6-month-old rats was used. In animals of groups I (n = 15, age 3 months) and III (n = 15, 12 months) the defects were left unfilled, II (n = 15, 3 months) and IV (n = 15, 12 months) — filled with structural AloI. After 14, 28 and 90 days, the content of glycoproteins, total chondroitin sulphates (CS), protein and calcium, activity of alkaline and acid phosphatases in blood serum was investigated. Results. The introduction of AloI leads to an increase in the content of glycoproteins for all periods of observation in rats of both age groups. 14 days after implantation in 12-month-old rats, compared to 3-month-old rats, a 1.30 times higher level of CS in blood serum was determined ( $p = 0.008$ ), which is due to their higher content in the area of connective tissue implantation; the activity of alkaline phosphatase decreased by 1.80 times ( $p = 0.016$ ) and acid phosphatase by 1.50 times ( $p = 0.018$ ), which indicates a delay in the formation and reorganization of bone tissue. However, the level of CS under the conditions of the establishment of AloI on the 90th day was lower compared to the corresponding groups without plasticity of the defect: in 3-month-old rats by 1.44 times ( $p = 0.008$ ), in 12-month-old rats by 1.52 times ( $p = 0.008$ ). Conclusions. According to the indicators of biochemical markers of connective tissue metabolism, the use of AloI for plasticity of defects of a critical size in the metaphysis of the femur of rats leads to the activation of bone regeneration with a greater manifestation in younger recipients compared to groups with an unfilled defect. Key words. Allograft, bone defect, experimental modelling, regeneration, biochemistry, connective tissue.*

*В ортопедичній і травматологічній хірургії дефекти кісток, які не загоюються самостійно, становлять значну проблему. Одним із підходів до її розв'язання є використання кісткових алоімплантатів (АлоІ). Мета. На підставі аналізу біохімічних показників метаболізму сполучної тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки АлоІ. Методи. Використано модель створення транскортикального дефекту критичного розміру (діаметр 3 мм, глибина 3 мм) в метафізі стегнової кістки щурів віком 3 та 6 міс. У тварин груп I (n = 15, вік 3 міс.) і III (n = 15, 12 міс.) дефекти залишали незаповненими, II (n = 15, 3 міс.) і IV (n = 15, 12 міс.) — заповнювали структурними АлоІ. Через 14, 28 і 90 днів досліджено вміст у сироватці крові глікопротеїнів, загальних хондроїтинсульфатів (ХС), білка та кальцію, активність лужної та кислої фосфатаз. Результати. Введення АлоІ призводить до підвищення вмісту глікопротеїнів на всі терміни спостереження у щурів обох вікових груп. Через 14 днів після імплантації у 12-місячних щурів порівняно з 3-місячними визначено підвищений рівень у сироватці крові ХС в 1,30 разу ( $p = 0,008$ ), що обумовлено більшим вмістом у них в ділянці імплантації сполучної тканини; знижену в 1,80 разу ( $p = 0,016$ ) активність лужної фосфатази та в 1,50 разу ( $p = 0,018$ ) — кислої фосфатази, що свідчить про затримку утворення й реорганізацію кісткової тканини. Проте, рівень ХС за умов встановлення АлоІ на 90-ту добу був нижчим порівняно з відповідними групами без пластики дефекту: в 3-місячних щурів у 1,44 разу ( $p = 0,008$ ), у 12-місячних — у 1,52 разу ( $p = 0,008$ ). Висновки. За показниками біохімічних маркерів метаболізму сполучної тканини використання АлоІ для пластики дефектів критичного розміру в метафізі стегнової кістки щурів призводить до активації регенерації кістки з більшим проявом у молодших реципієнтів порівняно з групами з незаповненим дефектом.*

**Ключові слова.** Алоімплантат, дефект кістки, експериментальне моделювання, регенерація, біохімія, сполучна тканина

## Вступ

Щорічно мільйонам пацієнтів у світі необхідні ортопедичні втручання з використанням кісткових трансплантатів через наслідки травм, дегенеративні онкологічні захворювання, інфекційні ускладнення тощо [1].

В ортопедичній і травматологічній хірургії дефекти кісток становлять значну клінічну проблему в повсякденній практиці [2]. Вони виникають унаслідок інфекцій і пухлин кісток, які здебільшого видаляють хірургічно з наступною реконструкцією кістки [3]. Крім того, переломи після високоенергетичних травм (зокрема, вибухових і вогнепальних) та внаслідок остеопоротичних порушень часто супроводжуються дефектами кісток, які не загоюються самостійно, що обумовлює виконання процедур із нарощування кісткової тканини [4]. На сьогодні півмільйона пацієнтів щорічно отримують лікування дефектів кісток у Сполучених Штатах і Європі з приблизною вартістю понад 3 млрд доларів США [5].

Реконструкцію дефектів кісток виконують за допомогою авто- та алоімплантатів, замінників кісткової тканини — біоматеріалів, зокрема, біоактивної кераміки, біоскла, синтетичних або природних полімерів [6].

Алоімплантати мають переваги перед автокісткою, а саме: достатній обсяг матеріалу, який можна використати у вигляді блоків, чипсів чи грануляту, що дає змогу заповнювати дефекти різної конфігурації. Також немає необхідності компрометувати скелетні структури пацієнта для одержання тканини трансплантата й, відповідно, можна уникнути ускладнень на донорській ділянці, що може статися за використанням авто-трансплантатів [7]. До того ж, застосування алоімплантатів може бути таким саме успішним, як автологічного матеріалу [8].

Проте необхідно розробляти нові підходи для покращення функціональної спроможності, приживлення імплантатів та якості життя пацієнтів економічно ефективним способом, частиною яких обов'язково буде алогенна кісткова пластика [9].

*Мета:* на підставі аналізу біохімічних показників метаболізму сполучної тканини в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами.

## Матеріал і методи

Експериментальні дослідження проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до

піддослідних тварин [10, 11] після ухвалення плану комітетом із біоетики при ДУ «ІХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» (протокол № 191 від 22.04.2019).

### *Дизайн експерименту*

У дослідженні порівняно метаболічні особливості регенерації кістки після створення транскортикальних дефектів критичного розміру (глибина 3 мм, діаметр 3 мм) в дистальному метафізі стегнової кістки лабораторних щурів і заповнення їх чи ні алогенними кістковими імплантатами. Використано 48 білих щурів: 24 віком 3 міс. на початок експерименту, 24 — 12 міс., яких у випадковий спосіб розподілили на чотири групи:

- I (n = 9, вік 3 міс.) — дефект залишали незаповненим;
- II (n = 15, вік 3 міс.) — у дефекті розміщували структурний кістковий алоімплантат відповідного розміру та форми;
- III (n = 9, вік 12 міс.) — дефект залишали незаповненим;
- IV (n = 15, вік 12 міс.) — заповнення дефекту алоімплантатом.

Техніка хірургічного втручання та виготовлення алоімплантатів аналогічна описаній в роботі [12].

Через 14, 28 і 90 днів після операції виводили з експерименту по 5 тварин із груп II та IV, по 3 — груп I і III шляхом декапітації через необхідність отримання крові для біохімічного дослідження.

### *Біохімічні методи*

Зібрану кров після природного зсідання звільнювали від формених елементів за допомогою центрифугування протягом 15 хв, 3000 об/хв. Надосадкову рідину відокремлювали і в ній вимірювали досліджувані показники.

Відбір параметрів біохімічного аналізу проводили таким чином, щоб дослідити показники запалення та метаболізму кісткової тканини, а також загального соматичного стану експериментальних тварин. Оцінювали вміст глікопротеїнів за модифікованим методом О. П. Штенберга та Я. Н. Доценко (реакція з молібдатом амонію у сірчанокислотному середовищі) [13] та хондроїтинсульфатів за методом Nemeth–Csoka у модифікації Л. І. Слуцького (реакція з риванолом) [14]; активність лужної та кислотної фосфатази за реакцією з діетаноламіном кінетичними методами згідно з інструкцією «Лужна фосфатаза – кін Сп. Л» та «Кисла фосфатаза – кін Сп. Л». Вміст кальцію визначали за потенціометричним методом із використанням аналізатора електролітів АСК–01, загального білка — біуретовим методом [13].

*Статистичний аналіз* даних виконаний із використанням програм «IBM SPSS Statistics 20» та «Microsoft Office Excel 2007». Результати вимірювань наведені як медіана та квартилі (25 %, 75 %) Для порівняння двох груп використовували аналіз Манна–Уїтні. Різницю вважали статистично значущою за умови якщо  $p < 0,05$  [15].

## Результати та їх обговорення

### *Порівняння у вікових групах*

У процесі порівняння результатів біохімічних досліджень показників сироватки крові щурів після моделювання *незаповненого дефекту* критичного розміру достовірна різниця між показниками 3- та 12-місячних щурів на однаковий термін дослідження виявлена лише за активністю кислотої фосфатази, яка була більшою у молодших тварин у 1,28 разу на 28-му добу експерименту ( $p = 0,008$ ) (таблиця).

На відміну від цього за умов використання для пластики дефекту *алогенних кісткових імплантатів* визначено суттєві відмінності за вмістом у сироватці крові тварин різних вікових груп глікопротеїнів, хондроїтинсульфатів, активності лужної та кислотої фосфатаз. Зокрема, у 12-місячних щурів рівень глікопротеїнів у сироватці крові виявився нижчим, ніж у 3-місячних в 1,10 разу ( $p = 0,008$ ) через 14 діб після імплантації, вищим в 1,40 разу ( $p = 0,008$ ) і 1,20 разу ( $p = 0,032$ ) — через 28 і 90 діб відповідно. Це відображає підвищення в них порівняно з 3-місячними щурами на пізніші терміни експерименту формування вуглеводно-білкових комплексів, які утворюються на стадії запалення, початкової перебудови сполучної тканини. Зазначена особливість також може бути наслідком більшого вмісту сполучної тканини в ділянці імплантації. Також у тварин старшого віку порівняно з молодшими через 14 діб після імплантації визначено підвищений рівень у сироватці крові хондроїтинсульфатів в 1,30 разу ( $p = 0,008$ ), знижену в 1,80 разу ( $p = 0,016$ ) активність лужної фосфатази, в 1,50 разу ( $p = 0,018$ ) — кислотої, що свідчить про затримку утворення та реорганізацію кісткової тканини. Показник вмісту загального білка та кальцію не відрізнявся у вікових групах на жоден із термінів спостереження (таблиця).

### *Порівняння у групах з алоімплантатом і незаповненим дефектом*

У щурів 3-місячного віку із *незаповненим дефектом* на 28-му добу встановлено зниження рівня глікопротеїнів у 1,35 разу ( $p = 0,008$ ), причому на 90-ту добу зазначений показник знову підви-

щився майже до початкових значень — в 1,25 разу порівняно зі значеннями 28-му добу.

На 28-му добу зафіксовано також тимчасове зниження вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові 3-місячних тварин із незаповненим дефектом із подальшим поверненням на початковий рівень. Зокрема, на 28-му добу показник був знижений у 1,40 разу, а потім підвищився в 1,44 разу ( $p = 0,008$ ) (таблиця).

У щурів 3-місячного віку зі встановленими кістковими алоімплантатами рівень глікопротеїнів у сироватці крові був вищим на всі терміни дослідження порівняно з групою з незаповненим дефектом: на 14 добу — в 1,20 разу ( $p = 0,016$ ), 28-му — в 1,50 разу ( $p = 0,036$ ), 90-ту — 1,20 разу ( $p = 0,032$ ), що можна пояснити відповіддю організму на введення чужорідного матеріалу. При цьому з плином часу досліджуваній показник у групі з алоімплантатом достовірно знижувався: в 1,40 разу ( $p = 0,008$ ) через 28 діб, в 1,20 разу ( $p = 0,008$ ) — через 90 порівняно з таким на 14-ту добу.

Активність лужної фосфатази в сироватці крові тварин з алоімплантатами порівняно з групою з незаповненим дефектом суттєво не відрізнялась на всіх термінах спостереження, проте знижувалася з перебігом часу: через 90 діб — в 1,21 разу ( $p = 0,008$ ) порівняно з величиною на 14-ту добу.

Активність кислотої фосфатази у тварин з алоімплантатами була вищою в 1,59 разу ( $p = 0,008$ ) через 28 діб після операції порівняно з групою з незаповненим дефектом і не відрізнялася на інші терміни спостереження. Проте знижувалася з плином часу: через 28 діб — в 1,32 разу ( $p = 0,008$ ), через 90 — в 1,34 разу ( $p = 0,009$ ) порівняно з показником на 14-ту добу. Це можна пояснити підвищеним темпом формування кісткової тканини до 28-ї доби експерименту та, відповідно, значною функціональною діяльністю остеокластів та остеобластів і зниженням активності процесу в подальшому, коли відбувається реорганізація регенерату.

Рівні кальцію та загального білка достовірно не відрізнялися у групах щурів 3-місячного віку з алоімплантатами і незаповненим дефектом, водночас рівень хондроїтинсульфатів на 90-ту добу був нижчим в умовах встановлення алоімплантатів у 1,44 разу ( $p = 0,008$ ).

У тварин з алоімплантатами рівень хондроїтинсульфатів змінювався з перебігом часу: був нижчим порівняно з 14-ю добою в 1,19 разу ( $p = 0,008$ ) через 28 діб, в 1,18 разу ( $p = 0,046$ ) — через 90, не відрізнявся між термінами 28 і 90 діб (таблиця).

Таблиця

**Біохімічні показники сироватки крові тварин різного віку після моделювання дефекту критичного розміру в метафізі стегнової кістки з використанням або без алогенних кісткових імплантатів (Me, (25 %; 75 %))(n = 5)**

Термін після втручання, доба	Показник	Група щурів			
		незаповнений дефект		алоімплантат	
		3-місячні	12-місячні	3-місячні	12-місячні
1	2	3	4	5	6
14	Глікопротеїни, г/л	0,76 (0,68; 0,78)	0,68 (0,62; 0,70) p <sub>1</sub> = 0,200	0,92 (0,88; 0,97) p <sub>2</sub> = 0,016	0,81 (0,78; 0,84) p <sub>1</sub> = 0,008 p <sub>2</sub> = 0,016
	Загальний білок, г/л	63,8 (59,4; 79,3)	62,1 (59,6; 65,6) p <sub>1</sub> = 0,686	56,7 (54,9; 63,4) p <sub>2</sub> = 0,190	65,7 (60,4; 67,3) p <sub>1</sub> = 0,151 p <sub>2</sub> = 0,730
	Са, ммоль/л	2,26 (2,12; 2,46)	2,23 (2,13; 2,31) p <sub>1</sub> = 0,886	2,02 (2,01; 2,23) p <sub>2</sub> = 0,190	2,30 (2,15; 2,35) p <sub>1</sub> = 0,151 p <sub>2</sub> = 0,556
	Хондроїтинсульфати, г/л	0,367 (0,204; 0,410)	0,331 (0,301; 0,387) p <sub>1</sub> = 0,886	0,300 (0,286; 0,350) p <sub>2</sub> = 0,730	0,384 (0,374; 0,399) p <sub>1</sub> = 0,008 p <sub>2</sub> = 1,000
	Активність лужної фосфатази, Од/л	400,0 (347,3; 468,5)	318,5 (271,5; 360,0) p <sub>1</sub> = 0,486	343,0 (296,0; 408,0) p <sub>2</sub> = 0,116	295,0 (276,0; 416,0) p <sub>1</sub> = 0,016 p <sub>2</sub> = 0,730
	Активність кислої фосфатази, Од/л	38,4 (29,2; 47,6)	31,9 (29,8 38,3) p <sub>1</sub> = 0,769	35,5 (32,1; 37,2) p <sub>2</sub> = 0,256	28,5 (23,9; 33,0) p <sub>1</sub> = 0,116 p <sub>2</sub> = 0,632
28	Глікопротеїни, г/л	0,56 (0,44; 0,68) p <sub>3</sub> = 0,013	0,65 (0,56; 0,70) p <sub>1</sub> = 0,200 p <sub>3</sub> = 0,413	0,67 (0,64; 0,71) p <sub>2</sub> = 0,036 p <sub>3</sub> = 0,008	0,95 (0,87; 1,07) p <sub>1</sub> = 0,008 p <sub>2</sub> = 0,036 p <sub>3</sub> = 0,008
	Загальний білок, г/л	67,3 (62,3; 72,4) p <sub>3</sub> = 0,434	74,8 (74,4; 89,3) p <sub>1</sub> = 0,100 p <sub>3</sub> = 0,664	64,1 (61,0; 70,1) p <sub>2</sub> = 0,250 p <sub>3</sub> = 0,095	68,4 (60,8; 70,4) p <sub>1</sub> = 0,841 p <sub>2</sub> = 0,036 p <sub>3</sub> = 0,421
	Са, ммоль/л	2,35 (2,35; 2,38) p <sub>3</sub> = 0,738	2,40 (2,38; 2,60) p <sub>1</sub> = 0,100 p <sub>3</sub> = 0,562	2,27 (2,18; 2,36) p <sub>2</sub> = 0,250 p <sub>3</sub> = 0,016	2,37 (2,16; 2,38) p <sub>1</sub> = 0,841 p <sub>2</sub> = 0,036 p <sub>3</sub> = 0,019
	Хондроїтинсульфати, г/л	0,262 (0,177; 0,314) p <sub>3</sub> = 0,017	0,232 (0,207; 0,254) p <sub>1</sub> = 0,200 p <sub>3</sub> = 0,008	0,253 (0,218; 0,304) p <sub>2</sub> = 0,856 p <sub>3</sub> = 0,008	0,274 (0,241; 0,305) p <sub>1</sub> = 1,000 p <sub>2</sub> = 0,856 p <sub>3</sub> = 0,008
	Активність лужної фосфатази, Од/л	439,0 (421,0; 486,0) p <sub>3</sub> = 0,127	414,0 (383,0; 469,0) p <sub>1</sub> = 0,116 p <sub>3</sub> = 0,010	348,0 (339,5; 426,0) p <sub>2</sub> = 0,143 p <sub>3</sub> = 0,956	302,0 (269,0; 344,5) p <sub>1</sub> = 0,046 p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,256
	Активність кислої фосфатази, Од/л	42,7 (36,1; 50,1) p <sub>3</sub> = 0,282	33,4 (31,9; 36,9) p <sub>1</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,256	26,8 (23,9; 30,7) p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,018	22,8 (19,1; 25,4) p <sub>1</sub> = 0,056 p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,116
90	Глікопротеїни, г/л	0,70 (0,66; 0,70) p <sub>3</sub> = 0,047 p <sub>4</sub> = 0,008	0,73 (0,70; 0,90) p <sub>1</sub> = 0,200 p <sub>3</sub> = 0,085 p <sub>4</sub> = 0,016	0,80 (0,77; 0,85) p <sub>2</sub> = 0,030 p <sub>3</sub> = 0,008 p <sub>4</sub> = 0,008	0,93 (0,86; 1,14) p <sub>1</sub> = 0,032 p <sub>2</sub> = 0,143 p <sub>3</sub> = 0,016 p <sub>4</sub> = 1,000
	Загальний білок, г/л	71,9 (67,10; 86,40) p <sub>3</sub> = 0,314 p <sub>4</sub> = 0,256	74,6 (63,50; 77,50) p <sub>1</sub> = 1,000 p <sub>3</sub> = 0,055 p <sub>4</sub> = 1,000	76,7 ( 69,9; 93,0) p <sub>2</sub> = 0,571 p <sub>3</sub> = 0,008 p <sub>4</sub> = 0,032	75,6 (68,8; 96,4) p <sub>1</sub> = 1,000 p <sub>2</sub> = 0,571 p <sub>3</sub> = 0,032 p <sub>4</sub> = 0,056

Продовження таблиці

1	2	3	4	5	6
90	Са, ммоль/л	2,38 (2,35; 2,55) p <sub>3</sub> = 0,251 p <sub>4</sub> = 1,000	2,40 (2,25; 2,45) p <sub>1</sub> = 1,000 p <sub>3</sub> = 0,071 p <sub>4</sub> = 1,000	2,41 (2,38; 2,55) p <sub>2</sub> = 1,000 p <sub>3</sub> = 0,013 p <sub>4</sub> = 0,208	2,38 (2,33; 2,42) p <sub>1</sub> = 0,310 p <sub>2</sub> = 0,393 p <sub>3</sub> = 0,776 p <sub>4</sub> = 0,204
	Хондроїтинсульфати, г/л	0,367 (0,324;0,412) p <sub>3</sub> = 1,000 p <sub>4</sub> = 0,008	0,415 (0,380;0,465) p <sub>1</sub> = 0,100 p <sub>3</sub> = 0,0460 p <sub>4</sub> = 0,008	0,255 (0,241; 0,288) p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,046 p <sub>4</sub> = 0,222	0,273 (0,267;0,296) p <sub>1</sub> = 0,222 p <sub>2</sub> = 0,008 p <sub>3</sub> = 0,008 p <sub>4</sub> = 1,000
	Активність лужної фосфатази, Од/л	311,0 (271,0;379,0) p <sub>3</sub> = 0,032 p <sub>4</sub> = 0,008	250,2 (208,0; 321,1) p <sub>1</sub> = 0,100 p <sub>3</sub> = 0,407 p <sub>4</sub> = 0,008	278,0 (244,5; 308,5) p <sub>2</sub> = 0,393 p <sub>3</sub> = 0,008 p <sub>4</sub> = 0,008	245,0 (210,5;292,5) p <sub>1</sub> = 0,690 p <sub>2</sub> = 0,865 p <sub>3</sub> = 0,841 p <sub>4</sub> = 0,116
	Активність кислої фосфатази, Од/л	39,9 (35,6; 44,2) p <sub>3</sub> = 0,956 p <sub>4</sub> = 0,256	34,0 (26,4; 42,6) p <sub>1</sub> = 0,129 p <sub>3</sub> = 0,400 p <sub>4</sub> = 0,956	26,5 (19,9; 35,6) p <sub>2</sub> = 0,032 p <sub>3</sub> = 0,007 p <sub>4</sub> = 0,009	28,2 (21,8; 34,3) p <sub>1</sub> = 0,045 p <sub>2</sub> = 0,748 p <sub>3</sub> = 0,863 p <sub>4</sub> = 0,051

Примітка. p<sub>1</sub> — порівняння показників у щурів різного віку з однаковим типом заповнення дефекту на той самий термін після втручання; p<sub>2</sub> — порівняння показників групи з алоімплантатами з показниками групи з незаповненим дефектом у щурів однакового віку на той самий термін після втручання; p<sub>3</sub> — порівняння показників на різних термінах експерименту у тварин одного віку та типу заповнення дефекту з показниками тієї ж групи на 14-ту добу після втручання; p<sub>4</sub> — порівняння показників у груп щурів однакового віку та типу заповнення дефекту на 90-ту добу після втручання із показниками на 28-му добу після втручання.

У щурів 12-місячного віку із незаповненим дефектом також на 28-му добу спостерігали тимчасове зменшення вмісту в сироватці крові хондроїтинсульфатів із подальшим значним підвищенням на 90-ту добу. А саме: на 28-му добу експерименту показник в аналізованій групі був у 1,43 разу меншим, ніж на 14-ту (p = 0,008), а на 90-ту — в 1,78 разу більшим, ніж на 28-ту (p = 0,008) і, навіть, у 1,31 разу вищим, ніж на 14-ту (p = 0,008), що може свідчити про активацію в обох вікових групах із незаповненим дефектом формування сполучної тканини на 28-му добу (таблиця). Причому, у молодших щурів цей процес затихав на 90-ту добу, а в старших активне формування сполучної тканини тривало.

Крім того, на 90-ту добу у 12-місячних щурів із незаповненим дефектом виявлено зменшення в 1,66 разу активності лужної фосфатази порівняно з 14-ю добою (p = 0,008) і в 1,66 разу — порівняно з 28-ю (p = 0,008), що вказує на затихання процесу формування кісткової тканини.

У щурів 12-місячного віку зі встановленими кістковими алоімплантатами рівень глікопротеїнів у сироватці крові виявився вищим в 1,2 разу (p = 0,016) через 14 днів, в 1,5 разу (p = 0,036) — через 28 порівняно з групою з незаповненим дефектом і статистично значуще не відрізнявся

через 90 днів. На відміну від 3-місячних щурів зі встановленими алоімплантатами, із плином часу досліджуваній показник у групі 12-місячних тварин збільшувався: був більшим порівняно з 14-ю добою в 1,20 разу (p = 0,008) через 28 днів, в 1,14 разу (p = 0,016) — через 90.

Вміст кальцію та загального білка в сироватці крові щурів 12-місячного віку з алоімплантатами через 28 днів після операції був трохи нижчим (в 1,10 разу, p = 0,036) порівняно з групою з незаповненим дефектом, а на інші терміни суттєво не відрізнявся. Рівень загального білка виявився вищим в 1,20 разу (p = 0,032) через 90 днів після операції порівняно з 14-ю добою та не відрізнявся на інші терміни.

Рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові щурів цього віку з алоімплантатами нижчий у 1,52 разу (p = 0,008) через 90 днів після операції порівняно з показником групи з незаповненим дефектом, що відображує скорочення утворення в них сполучної тканини. На інші терміни спостереження статистично значущих відмінностей між групами за цим показником не встановлено. При цьому у тварин з алоімплантатами вміст хондроїтинсульфатів поступово зменшувався: був нижчим порівняно з 14-ю добою в 1,42 разу (p = 0,008) через 28 днів, у 1,41 разу (p = 0,008) — через 90.

У тварин із незаповненим дефектом пік значень вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові визначено на 90-ту добу експерименту — підвищення у 1,25 разу ( $p = 0,008$ ) порівняно з 14-ю добою, незважаючи на те, що на 28-му показник був меншим, ніж на 14-ту в 1,42 разу ( $p = 0,008$ ).

У сироватці крові 12-місячних щурів з алоімплантатами на 28-му добу активність лужної фосфатази була меншою в 1,37 разу, кислоти — в 1,47 разу ( $p = 0,008$ ) порівняно з групою цього віку, де дефект залишали незаповненим. Показники не змінювалися протягом експерименту.

### Обговорення

На підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові 3- та 12-місячних щурів, яким моделювали дефект критичного розміру (глибина 3 мм, діаметр 3 мм) в метафізі стегнової кістки, визначено, що введення алоімплантатів у зону дефекту призводить до підвищення вмісту глікопротеїнів у сироватці крові на всі терміни спостереження незалежно від віку реципієнта. Це може бути пов'язано з реакцією на імплантат як чужорідне тіло та процесом його перебудови, який ще триває через 90 діб після операції. Дійсно, за допомогою гістологічних досліджень, проведених у межах цього експерименту, показано, що близько 10 % від початкового розміру алоімплантата залишилось у ділянці дефекту наприкінці дослідження (90 діб) у щурів обох вікових груп [12]. У клінічних умовах у результаті гістологічного аналізу тканин пацієнтів визначено не повну перебудову структурних алоімплантатів із формуванням сполучної тканини [16, 17].

Ми встановили вищий рівень хондроїтинсульфатів у сироватці крові 12-місячних щурів, яким встановлювали алоімплантат, через 14 діб після імплантації порівняно з 3-місячними тваринами, що, імовірно, пов'язано з більшим у 2,1 разу ( $p = 0,005$ ) вмістом у ділянці імплантації сполучної тканини [12]. Крім того, на цей термін у старших щурів визначено нижчу порівняно з молодшими активність лужної фосфатази у сироватці крові, що свідчить про уповільнення процесів утворення кісткової тканини, а саме, зменшення активності остеобластів. Унаслідок цього відносна площа кісткової тканини у 12-місячних щурів виявилася у 2,4 разу ( $p = 0,0001$ ) меншою порівняно з 3-місячними [12].

Ознаки активації реорганізації кісткового регенерату починали проявлятися на 14-ту добу у тварин з алоімплантатами, продовжувалися на

28-му добу та мінімізувалися на 90-ту з більшою вираженістю у 3-місячних тварин. У 12-місячних щурів зі встановленими алоімплантатами реакції були повільнішими: ознаки активації перебудови кісткової тканини за вмістом метаболічних маркерів у них проявлялися на 28-му добу та продовжувалися з частковим зниженням на 90-ту.

### Висновки

На підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові визначено, що введення алоімплантата призводить до підвищення вмісту глікопротеїнів на всі терміни спостереження у щурів обох вікових груп. Підвищення рівня хондроїтинсульфатів зафіксовано у щурів 12-місячного віку через 14 діб після імплантації порівняно і з 3-місячними тваринами, що обумовлено більшим вмістом у них у ділянці імплантації сполучної тканини. На цей термін у старших щурів також визначено зниження активності лужної фосфатази порівняно з тваринами 3-місячного віку, що свідчить про уповільнення процесів кісткоутворення, а саме, зменшення активності остеобластів.

Лікування експериментальних щурів із дефектом критичного розміру в метафізі стегнової кістки алоімплантатами призводить до виявлення в них біохімічних ознак активації регенеративних процесів, але ця активація носить недостатній характер і потребує додаткового посилення за рахунок окремих зовнішніх впливів.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

### Список літератури

1. Bone transport combined with bone graft and internal fixation versus simple bone transport in the treatment of large bone defects of lower limbs after trauma / Q. Huang, Y. B. Xu, C. Ren [et al.] // *BMC musculoskeletal disorders*. — 2022. — Vol. 23 (1). — Article ID: 157. — DOI: 10.1186/s12891-022-05115-0.
2. Allografts and spinal fusion / J. D. Cohen, L. E. Kanim, A. J. Tronits, H. W. Bae // *International Journal of Spine Surgery*. — 2021. — Vol. 15 (s1). — P. 68–93. — DOI: 10.14444/8056.
3. Accelerated bone growth, but impaired implant fixation in allograft bone mixed with nano-hydroxyapatite - an experimental study in 12 canines / L. Petersen, J. Baas, M. Sørensen [et al.] // *Journal of experimental orthopaedics*. — 2022. — Vol. 9 (1). — Article ID: 35. — DOI: 10.1186/s40634-022-00465-z.
4. Critical-size bone defects: is there a consensus for diagnosis and treatment? / A. Nauth, F. Schemitsch, B. Norris [et al.] // *Journal of orthopaedic trauma*. — 2018. — Vol. 32 (Suppl. 1). — P. S7–S11. — DOI: 10.1097/BOT.0000000000001115.
5. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? / H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, F. Rossi, G. Perale // *J. Clin. Periodontol.* — 2019. — Vol. 46. — P. 92 — 102. — DOI: 10.1111/jcpe.13058.
6. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical

- evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery / P. Baldwin, D. J. Li, D. A. Auston [et al.] // *Journal of Orthopaedic Trauma*. — 2019. — Vol. 33 (4). — P. 203–213. — DOI: 10.1097/bot.0000000000001420.
7. Maheswaran W. Bone grafts in trauma and orthopaedics / W. Maheswaran // *Archunan Sandris Petronis Cureus*. — 2021. — Vol. 13 (9). — Article ID : e17705. — DOI: 10.7759/cureus.17705.
  8. Union, complication, reintervention and failure rates of surgical techniques for large diaphyseal defects: a systematic review and meta-analysis / P. Feltri, L. Solaro, A. Di Martino [et al.] // *Scientific reports*. — 2022. — Vol. 12 (1). — Article ID: 9098. — DOI: 10.1038/s41598-022-12140-5.
  9. Lei P. F. Bone defects in revision Total knee arthroplasty and management / P. F. Lei, R. Y. Hu, Y. H. Hu // *Orthopaedic surgery*. — 2019. — Vol. 11 (1). — P. 15–24. — DOI: 10.1111/os.12425.
  10. European Convention for the protection of vertebrate animals used for research and other scientific purposes. Strasbourg, 18 March 1986: official translation. Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137). 21.
  11. On protection of animals from cruel treatment: Law of Ukraine №3447-IV of February 21, 2006. The Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
  12. Histological evaluation of the incorporation and remodeling of structural allografts in critical size metaphyseal femur defects in rats of different ages / N. Ashukina, V. Maltseva, P. Vorontsov [et al.] // *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. — 2022. — Vol. 63 (2). — DOI: 10.47162/RJME.63.2.y
  13. Kamyshnikov V. S. Clinical and biochemical laboratory diagnostics: reference book: in 2 volumes [Kliniko-biokhimi-cheskaya laboratornaya diagnostika: spravochnik: v 2 t.] / V. S. Kamyshnikov. — 2nd ed. — Minsk : Interpressservice, 2003. — Vol. 1. — 2003. — 495 p.; Vol. 2. — 2003. — 463 p. (in russian).
  14. Morozenko D. V. Research methods markers of connective tissue metabolism in modern clinical and experimental medicine [Metody doslidzhennya markeriv metabolizmu spoluchnoyi tkanyny u klinichniy ta eksperymental'niy medytsyni] / D. V. Morozenko, F. S. Leontieva // *Molodyy vchenyy*. — 2016. — No. 2 (29). — P. 168–172. (in Ukrainian).
  15. Lang T. A. How to describe statistics in medicine. A guide for authors, editors and reviewers [Kak opisyyvat' statistiku v meditsine. Rukovodstvo dlya avtorov, redaktorov i retsenzentov] / T. A. Lang, M. M. Sesik. — Moscow : Practical Medicine, 2011. — 480 p. (in russian)
  16. Incorporation of morselized bone grafts: a study of 24 acetabular biopsy specimens / S. van der Donk, P. Buma, T. J. J. H. Slooff [et al.] // *Clinical orthopaedics and related research*. — 2002. — No. 396. — P. 131–141. — DOI: 10.1097/00003086-200203000-00022.
  17. Structural bulk allografts in acetabular reconstruction. Analysis of two grafts retrieved at post-mortem / J. P. Hooten Jr, C. A. Engh, R. D. Heekin, T. N. Vinh // *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. — 1996. — Vol. 78 (2). — P. 270–275.

Стаття надійшла до редакції 20.11.2022

## BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD SERUM OF RATS OF DIFFERENT AGES AFTER FILLING THE DEFECT IN THE METAPHYSIS OF THE FEMUR WITH ALLOGENEIC BONE IMPLANTS

P. M. Vorontsov, F. S. Leontjeva, V. O. Tuljakov

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

✉ Petro Vorontsov, MD, PhD in Traumatology and Orthopaedics: vorontsov64@ukr.net

✉ Frieda Leontyeva, PhD in Biol. Sci: alwisia@i.ua

✉ Vladyslav Tuliakov, DSci in Pharmacy: tulakov1967v@gmail.com