

ОГЛЯДИ ТА РЕЦЕНЗІЇ

УДК 616.717/.718-001.5-06-092.9(045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872024281-87>**Огляд моделей незрощення переломів кістки в тварин та їхнє використання для дослідження лікувальної дії біологічної терапії****П. М. Воронцов, В. Є. Мальцева**

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

The bone healing impairment, such as non-union fractures after injuries of long bones, lead to loss of working capacity and result in significant financial costs, which emphasizes the socio-economic significance of the problem. However, it is not known which method of modeling the non-union bone fractures is more optimal for further research into the effectiveness of biological therapy aimed at treating bone healing impairment. For a detailed study of methods of non-union fracture treatment of, it is necessary to determine the developed animal models. The objective was to analyze the existing animal models of fracture nonunion in long bones in vivo and to consider the possibility of their further use to evaluate the effectiveness of the use of modern biotechnologies for the in the management of fracture non-union. It was found that the majority of developed animal models of atrophic long bone non-union were created using small animals, namely rats, mice, and rabbits. A more common method of modeling bone non-union is performing an osteotomy with the formation of a defect of different widths between the bone fragments and subsequent removal of the periosteum proximal and distal to the osteotomy site; damage to the endosteum or removal of bone marrow. Also, in such animal models, researchers use a silicone spacer, a polysulfone plate, or a latex-silicone foil to physically prevent fracture union. In these animal models, studies using mesenchymal stromal cells, platelet-rich plasma or bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) have already been conducted for the management of non-union bone fractures. At the same time, the clinical results of the application of various biological therapies are ambiguous, which determines the conduct of further experimental studies, in particular, in vivo. However, there are disagreements about which in vivo modeling methods give a reproducible result and prevent bone union, which determines the need for further analysis of existing modeling tools for conducting research in this direction. Keywords. Rat, rabbit, mice, osteotomy, femur, tibia, periosteum, bone regeneration.

Порушення регенерації кістки, такі як незрощення переломів після травм довгих кісток, призводять до втрати працездатності й обумовлюють значні фінансові витрати, що підкреслює соціально-економічну значущість проблеми. Проте невідомо, який спосіб моделювання незрощення перелому кістки є оптимальнішим для подальшого дослідження ефективності біологічної терапії? спрямованої на лікування порушень репаративного остеогенезу. Для детального вивчення способів лікування незрощень переломів потрібно визначення розроблених експериментальних моделей на тваринах. Метою було провести аналіз існуючих експериментальних моделей незрощення переломів довгих кісток in vivo та розглянути можливість їхнього подальшого використання для оцінювання ефективності застосування сучасних біотехнологій для лікування порушень регенерації кістки. Виявлено, що переважна кількість розроблених моделей атрофічного незрощення переломів кісток створена з використанням невеликих тварин, а саме щурів, мишей та кролів. Поширенішим способом моделювання незрощення є виконання остеотомії з формуванням різної ширини дефекту між фрагментами кістки та подальшим видаленням періосту проксимальніше та дистальніше ділянки остеотомії; ушкодженням ендосту або видаленням кісткового мозку. Також у таких моделях дослідники застосовують силіконовий спейсер, полісульфонову пластину або латексно-силіконову фольгу для фізичного перешкоджання зрощення перелому. У наведених моделях уже проведені дослідження з використанням мезенхімальних стромальних клітин, збагачених тромбоцитами плазми та морфогенетичного кісткового білка-2 (BMP-2) для лікування незрощення кістки. Водночас клінічні результати застосування різної біологічної терапії є неоднозначними, що обумовлює проведення подальших експериментальних досліджень, зокрема, моделювання in vivo. Проте існують розбіжності щодо того, які способи моделювання дають відтворений результат і перешкоджають зрощенню кістки, що і визначає необхідність подальшого аналізу існуючих засобів моделювання для проведення досліджень у цьому напрямі.

Ключові слова. Щур, кроль, миша, остеотомія, стегнова кістка, великогомілкова кістка, періост, регенерація кістки

Вступ

Ускладнення, які виникають після травматичних переломів довгих кісток (незрощення, уповільнене зрощення та несправжній суглоб) унаслідок порушення репаративного остеогенезу, є актуальною медико-соціальною проблемою. Незважаючи на здатність кістки загоюватися з відновленням первісної структури, у певних випадках, зокрема, й після масивних ушкоджень унаслідок вогнепальних поранень, зрощення не відбувається та розвиваються сталі функціональні порушення, які потребують тривалого лікування та значних фінансових витрат. За даними Харківської травматологічної МСЕК, частота незрощень після лікування діафізарних переломів кінцівок становить від 3 до 28,6 % залежно від локалізації, використаного остеосинтезу та складності травми [1]. У Великобританії за приблизними підрахунками річні витрати на лікування незрощення переломів сягають 320 млн фунтів за загальної чисельності населення 67 млн [2]. Дослідники зі США повідомляють про 4,9 % незрощень на рік після переломів довгих кісток різної локалізації (частіше за все після переломів обох кісток гомілки або стегнової кістки). Складність бойової травми збільшує ризик незрощень до 31 % випадків [3]. Чинниками ризику названі кількість одночасних переломів, застосування нестероїдних протизапальних засобів разом з опіоїдами та хірургічне лікування [4]. У національній базі даних Шотландії частота незрощень після переломів кісток вказана близько 1,9–9 % із найбільшою кількістю на рівні великогомілкової кістки та частіше в осіб віком 35–44 роки, ніж у пацієнтів старших вікових груп [5], що підкреслює актуальність проблеми.

Важливим завданням лікаря в разі невдалого загоєння перелому є коригування механічних умов і біологічних чинників, які призвели до цього. Перше вирішують за допомогою остеосинтезу. Для вдосконалення класичних хірургічних методик лікування незрощених переломів пропонують використовувати біоінженерні підходи, серед яких поширення в клінічній практиці в разі атрофічних незрощень набули лише автологічні трансплантати [2, 6]. Проте їхні відомі недоліки (неможливість отримання достатньої кількості матеріалу, швидка резорбція, необхідність додаткового хірургічного втручання та больові відчуття під час вилучення в пацієнта) зумовили увагу наукової спільноти до інших біологічних матеріалів, які потенційно сприятимуть остеогенезу.

Зокрема, запропоновано використовувати автологічний фібрин [7], алоімпланти [8], мезенхімальні стромальні клітини (МСК) [9], збагачену тромбоцитами плазму, фактори росту [10] тощо.

Проте для вдосконалення методик лікування незрощень зі застосуванням біоінженерних технологій перед усім необхідно обрати експериментальну модель, яка дозволить відтворити механізми порушень репаративного остеогенезу, які виникають після переломів довгих кісток. Для цього проводять експериментальне моделювання *in vivo* з використанням невеликих лабораторних тварин.

Мета: провести аналіз існуючих експериментальних моделей незрощення переломів довгих кісток *in vivo* та розглянути можливість їхнього подальшого використання для оцінювання ефективності застосування біотехнологій під час лікування порушень регенерації кістки.

Матеріал і методи

Аналіз літератури виконано в базі даних PubMed із використанням ключових слів Mesh за таким пошуковим запитом: «Fractures, Ununited» AND «Fracture Healing» AND («Ankle Fractures» OR «Femoral Fractures» OR «Tibial Fractures» OR «Humeral Fractures» OR «Elbow Fractures») AND «Disease Models, Animal». Критеріями включення були оригінальні експериментальні дослідження з доступним повним текстом англійською. Критеріями виключення — дослідження інфікованих переломів, онкологічних захворювань. Глибина пошуку прийнята 10 років.

Результати та їх обговорення

Після виконання пошуку відібрано 28 статей, у яких переважно розглянуто використання мишей, щурів або кролів для дослідження незрощення переломів довгих кісток.

Передумови до розробки експериментальних моделей незрощення переломів in vivo

Одним із ключових етапів у процесі загоєння перелому кістки є відновлення судинної мережі — неоваскуляризація. Проте останнім часом, як повідомили автори нещодавно опублікованого огляду літератури [11], з'являється все більше доказів того, що кісткові мозолі в місці незрощення можуть бути добре васкуляризованими та в них експресується такий проангіогенний медіатор, як фактор росту ендотелію судин (vascular endothelial growth factor, VEGF). А дисрегуляторні порушення обумовлені зниженою експресією проостеогенних цитокінів — кісткових

морфогенетичних білків (Bone Morphogenetic Protein, BMP). Автори [11] висловлюють думку про необхідність стимулювання остеогенезу на стадії ремоделювання кісткового мозоля, а не васкуляризації, за допомогою VEGF на ранніх стадіях загоєння перелому, бо навіть й атрофічні незрощення можуть бути і васкулярними [12].

Водночас, атрофічні моделі незрощення більш перспективні для доклінічних досліджень, тому що цей тип незрощення ймовірно потребує трансплантації або додаткової біологічної терапії, тоді як гіпертрофічні незрощення можна лікувати лише хірургічним втручанням [12].

Існує думка, що під час лікування незрощень кісток необхідно стимулювати не лише остеогенез, а й хондрогенез, оскільки загоєння більшості переломів перебігає шляхом інтрамембранного й ендохондрального кісткоутворення [13]. Проте є труднощі з визначенням стадії регенерації, на якій буде ефективна стимуляція, що потребує комплексних досліджень, у тому числі з використанням методів морфологічного аналізу. Це обумовлює необхідність проведення експериментальних досліджень у цьому напрямі.

Використання експериментальної моделі невеликих тварин, у якій перелом виконаний шляхом відкритої остеотомії та фіксований інтрамедулярно спицею Кіршнера, ймовірно, дозволить визначити стадії порушення репаративного остеогенезу, на яких використання біологічної терапії (фактори росту, МСК, біоінженерні конструкції тощо) буде ефективним для стимуляції хондрой остеогенезу, на відміну від моделі зі закритим переломом, яка передбачає відтворення критичного дефекту. Однією зі сучасних концепцій лікування асептичних незрощень, які виникають після інтрамедулярного остеосинтезу діафізарного перелому, є досягнення зрощення *in situ* без видалення стрижня [14, 15]. Це обумовлено уникненням повторної травматизації та виникненням ускладнень. Описана експериментальна модель передбачає можливість перевірки загоєння перелому в таких випадках без повторного хірургічного втручання.

Моделі незрощення переломів кістки в тварин

Щури. Моделювати незрощення великогомілкової кістки у щурів пропонують шляхом відкритої остеотомії середньої третини її діафіза та подальшого припикання періосту на 2 мм проксимальніше та дистальніше місця перелому з інтрамедулярною фіксацією спицею Кіршнера діаметром 0,8 мм [16]. Це пов'язано з доведеною важливістю добре васкуляризованого періосту як

джерела остеогенних клітин для успішного загоєння перелому [11]. Наведена модель на самцях щурів Sprague-Dawley віком 8 тижнів дозволила досягти незрощення у всіх тварин на 8-й тиждень спостереження, що було підтверджено за допомогою рентгенографії та гістології [16]. Інші дослідники на щурах самцях лінії Wistar після остеотомії діафіза стегнової кістки видалили періост біля місця перелому та виконали фіксацію спицею Кіршнера для отримання незрощення на 6-й тиждень після втручання [17].

На самцях щурів лінії Wistar віком 4–5 міс. модель незрощення великогомілкової кістки відтворили шляхом її остеотомії, видалення періосту й ендосту та фіксацією зовнішнім фіксатором. Характерні ознаки атрофічного незрощення виявлено за допомогою рентгенографії, гістології та мікрокомп'ютерної томографії (мікро-КТ) через 8 тижнів [18]. Запропоновано іншу модель незрощення стегнової кістки у щурів лінії Fischer 344 віком 12 тижнів, у якій крім видалення періосту навколо ділянки перелому, виконали абляцію кісткового мозку, перелом фіксували спицею Кіршнера діаметром 0,8 мм. Відсутність зрощення перелому підтверджено на 12-й тиждень після втручання рентгенологічно, гістологічно за допомогою мікро-КТ [19]. У недавньому дослідженні, де порівняли відтворюваність моделей незрощення стегнової кістки у щурів у випадку простої остеотомії, у поєднанні з видаленням періосту, та ще з видаленням кісткового мозку, автори дійшли висновку, що надійнішою моделлю є третій варіант, коли і періост, і кістковий мозок видаляють [20].

Іншим підходом до перешкоджання впливу м'яких тканин на загоєння перелому стало обгортання діафіза стегнової кістки латексно-силіконовою фольгою після остеотомії, з утворенням щілини 0,38 мм та фіксацією пластиною з 5 отворами. У самців щурів лінії Sprague-Dawley віком 6 міс. це призвело до незрощення стегнової кістки на 10-й тиждень після втручання [21]. На щурах самцях лінії Wistar дослідники створили модель незрощення з використанням спейсера, який вводили у дефект критичного розміру стегнової кістки, що дало змогу досягти незрощення через 4 тижні після втручання, а ще через 4 тижні після видалення спейсера цей стан зберігся [22]. У іншому дослідженні на самцях щурів лінії Sprague-Dawley віком 4 міс. також застосували спейсер із силікону, який розмістили в щілині шириною 3 мм після остеотомії стегнової кістки. Перелом стабілізували 4-гвинтовою пластиною та

підтвердили досягнення незрощення на 4-й тиждень після втручання за допомогою мікро-КТ сканування та гістологічного аналізу [23]. У самок щурів SASCO Sprague-Dawley віком 13 тижнів дослідники отримали незрощення через 8 тижнів після виконання дефекту критичного розміру (8 мм) в середині діяфіза стегнової кістки та фіксації рентгенопрозорою полісульфоновою пластиною [24].

Миші. Аналогічні до описаних для щурів, [16, 17] запропоновані й моделі незрощення кісток для мишей. Зокрема, апробовано відтворення порушення консолидації стегнової кістки на мишах лінії CD1 віком 9 тижнів за допомогою поперечної часткової остеотомії (50 % діаметра) середньої третини діяфіза, з використанням за інтрамедулярний фіксатор голки 25 калібру та припіканням періосту на 2 мм проксимальніше та дистальніше місця перелому. Досягнення незрощення підтверджено гістологічно на 9-й тиждень після втручання [25]. Інший варіант моделювання перелому стегнової кістки на самцях мишей DT віком 10 тижнів передбачав використання пластини з 4 гвинтами для фіксації критичного діяфізарного дефекту, довжиною 1,6 мм та досягнення незрощення на 5-й тиждень після втручання [26]. Для вивчення впливу ішемії на виникнення незрощення дослідники виконали резекцію стегнової артерії в самців мишей 129J/V6 віком 10–14 тижнів до перелому великогомілкової кістки, що дало змогу отримати незрощення на 4-й тиждень спостереження в разі нестабілізованих переломів, але не у випадках їхньої фіксації [27].

Кролі. Для отримання незрощення великогомілкової кістки кролів дослідники пропонують поєднувати її остеотомію з видаленням фрагмента діяфіза розміром 2 мм, періосту й ендосту навколо ділянки перелому та фіксацією пластиною. Це дало змогу досягти порушення консолидації відламків кістки на 8-й тиждень після втручання у самок кролів New Zealand [28–30].

Крім того, у кролів породи New Zealand для досягнення незрощення великогомілкової кістки запропонували виконати дефекти великих розмірів (довжина 10 мм) у метадіяфізарній зоні з подальшим видаленням періосту на 5 мм проксимальніше та дистальніше місця травми та стабілізацію 2 спицями Кіршнера. Автори верифікували модель на 6-му та 12-му тижнях за допомогою рентгенографічного та гістологічного аналізів [31]. Створення дефекту такого ж розміру в кролів і припікання лише періосту на 2 мм в обидва боки від дефекту також призвело до від-

сутності зрощення перелому променевої кістки через 4 тижні після втручання. Автори класифікували атрофічний тип незрощення за допомогою рентгенографії та гістології [32].

Отже, атрофічне незрощення перелому на рівні діяфіза довгих кісток у тварин моделюють, переважно, шляхом виконання відкритої остеотомії, з утворенням дефектів критичного розміру між фрагментами; розміщенням у щілині після остеотомії спейсерів; припіканням/видаленням періосту, ендосту, кісткового мозку, які є джерелами клітин для ангиогенезу й остеогенезу. У кожній із моделей для стабілізації перелому використовують або інтрамедулярно спиці Кіршнера, або пластини з гвинтами, або зовнішні пристрої. Найпоширенішим способом моделювання незрощення є виконання остеотомії з формуванням різної ширини дефекту між кінцями кістки та подальшим видаленням періосту проксимальніше та дистальніше кінців дефекту. Це обумовлено тим, що у регенерації перелому (формування мозоля) більш задіяні клітини періосту, ніж ендосту [33]. В опублікованих роботах наведено застосування тварин обох статей без переваги жодної. Проте серед дослідників немає узгодженості щодо того, яка з моделей дає відтворюваніший результат і надійно створює умови для виникнення незрощення кістки. Через це є необхідність продовжувати розробку експериментальних моделей, які дозволять вивчати механізми порушення регенерації кістки з подальшим розробленням стратегій лікування дисрегенерації.

Варіанти використання експериментальних моделей in vivo для дослідження лікувальної дії біологічної терапії в разі незрощень переломів

Золотим стандартом у лікуванні асептичних незрощень переломів є використання кісткових автотрансплантатів зі стабільною фіксацією відламків [2, 6]. На сьогодні розроблено діамантову концепцію лікування незрощення, в якій викладено чотири умови лікування — три біологічних (МСК, фактори росту й остеоіндуктивні каркаси) та одна біомеханічна (стабілізація перелому) [34].

Використання культивованих МСК вважають одним із перспективних напрямів біологічного лікування асептичних незрощень переломів. Є досвід успішного використання МСК із жирового мозку в доклінічних дослідженнях для оптимізації регенерації кістки в мишей [35, 36] та щурів [37]. Іншим варіантом клітинної терапії є використання вже диференційованих клітин у остеогенному напрямі. Так, ін'єкція остеобластів із міжклітинним матриксом через 6 год.

після перелому сприяла зрощенню перелому на 12-й тиждень у моделі незрощення стегнової кістки щурів, в якій виконували абляцію кісткового мозку та видалення періосту біля ділянки перелому [19, 20]. Необхідність подальших експериментальних досліджень у цьому напрямі підтверджують результати нещодавно опублікованого системного огляду, де виявлено лише три випадки їхнього застосування в клінічній практиці для лікування незрощень, в яких брали участь пацієнти молодого віку після резекції пухлин [6]. Інформації щодо використання МСК із жирового мозку в людей старшого віку для лікування незрощень обмаль [6].

Щодо використання збагаченої тромбоцитами плазми (англ. platelet rich plasma — PRP) у пацієнтів із незрощенням кісток уже більше результатів успішного клінічного застосування. Наприклад, стабілізація перелому (асептичне незрощення з дефектом великогомілкової кістки, тип В за ASAMI) за допомогою апарата Ілізарова з одночасним введенням PRP дало змогу швидше отримати загоєння перелому та зняти пристрій [10]. У системному огляді, який включав 13 клінічних досліджень за участю пацієнтів із переломами довгих кісток, які уповільнено зростаються або не зростаються, показано, що введення PRP під час операції допомогло в 146 випадках із 155 досягти зрощення через 4,64 міс., а в разі лише ін'єкції — у 144 із 183 через 5,15 міс. [38]. Проте залишається нез'ясованим, скільки необхідно ін'єкцій PRP і на який термін для досягнення кращого терапевтичного ефекту у випадку порушення загоєння перелому кістки. В експериментальних дослідженнях на кролях (модель незрощення великогомілкової кістки з дефектом довжиною 10 мм) заповнення желатиною основою з гідроксиапатитом і VEGF дало змогу отримати значно кращі результати щодо зрощення перелому за показниками гістології та рентгенографії, порівняно з кролями з незаповненим дефектом через 6 тижнів після втручання [31]. У аналогічній моделі незрощення кролів використання алотрансплантатів із додаванням VEGF прискорило остеointерацію останнього на 12 тиждень спостереження [39].

Ще одним напрямом біологічної терапії для оптимізації регенерації кісткової тканини у випадку переломів є використання кісткових морфогенетичних білків у поєднанні з різними матрицями, які є єдиними затвердженими біологічними препаратами для прискорення загоєння переломів у США [13]. Це, у свою чергу, пов'язано з неоднозначними результатами клінічних

випробувань зі застосуванням різної біологічної терапії. Для стимуляції остеогенезу зараз експериментально досліджують використання BMP-2 в лікуванні незрощених переломів. На моделі дисрегенерації стегнової кістки щурів доведено, що видалення новоутворених тканин із ділянки незрощення з подальшим застосуванням фібринової матриці з одночасним введенням rhBMP-2 сприяло утворенню значно більшого обсягу кісткової тканини порівняно з тваринами, які не отримували rhBMP-2 [23]. Але відтерміноване в часі лікування незрощеного перелому може бути менш ефективним. Зокрема, на моделі незрощення стегнової кістки щурів дослідники через 8 тижнів після виконання перелому видалили тканини з ділянки критичного дефекту (довжина 8 мм), кінці кістки огорнули нановолокнистою сіткою з полікапролактону та заповнили альгінатом із BMP-2. У групі порівняння тваринам такі самі процедури провели під час виконання моделі. Формування кісткової тканини в зоні критичного дефекту виявилось гіршим у щурів із відтермінованим лікуванням [24]. У кролів із довжиною дефекту 2 мм у великогомілковій кістці, видаленням ендостом і періостом біля дефекту та зафіксованого пластиною з 5 отворами використання rhBMP-2 покращило загоєння перелому, порівняно з кролями без такого лікування, через 7 тижнів після втручання [30]. Проте клінічне використання BMP-2 для лікування незрощених переломів довгих кісток не передбачено протоколами через суперечливі результати щодо ефективності. Його наразі рекомендують лише для лікування відкритих переломів діафіза.

Таким чином, вивчення на тваринах механізмів розвитку ускладнень, які виникають після травматичних переломів довгих кісток (незрощення, уповільнене зрощення, несправжні суглоби), для визначення ефективності новітніх лікувальних стратегій є важливою ланкою доклінічних випробувань. Незважаючи на здатність кістки загоюватися з відновленням первісної структури, у певних випадках, зокрема, й після масивних ушкоджень внаслідок вогнепальних поранень, зрощення не відбувається та розвиваються сталі функціональні порушення, що потребує тривалого лікування та значних фінансових витрат. Згідно з результатами доклінічних випробувань, перспективними напрямками біологічної терапії може бути використання: культивованих МСК, індукованих до диференціації в остеобласти чи хондробласти; PRP, VEGF і BMP-2 на різних носіях (наприклад, алоімплантатах, аутологічному фібрині, желатині, гідроксилапатиті).

Проте клінічне використання означених біотехнологій для лікування незрощених переломів довгих кісток не передбачено протоколами через суперечливі результати щодо ефективності та безпечності, що обумовлює проведення масштабних експериментальних досліджень, зокрема, моделювання *in vivo*.

Задля цього сьогодні описані, апробовані та використовуються експериментальні моделі на дрібних лабораторних тваринах (кролі, щури, миші), які визнані корисними через простоту застосування, легкість відтворення, економічність і етичну виправданість. Результати опублікованих досліджень демонструють придатність таких моделей для з'ясування біологічних чинників, які призводять до розвитку дисрегуляторних процесів у кістці та виникненню ускладнення загоєння переломів, для доклінічних випробувань ефективності створюваних стратегій лікування. Проте незважаючи на численну кількість моделей незрощення в невеликих тварин, у кожній дослідниками-розробниками допускається недолік у вигляді зрощення перелому, що обумовлює необхідність подальшого пошуку кращої моделі незрощення кістки у тварин.

Висновки

На щурах, мишах і кролях розроблено різні експериментальні моделі, на яких доведено можливість отримання незрощення перелому.

Більшість запропонованих моделей засновані на інтрамедулярній фіксації перелому з розширенням діастазу між отломками та порушенням ендосту й періосту.

Наведені експериментальні моделі можуть бути використані для розробки інноваційних технологій лікування порушення регенерації з огляду на досягнення регенераторної медицини.

У зв'язку з розширенням біотехнологічних чинників, які потребують експериментальних досліджень, розробку експериментальних моделей на тваринах потрібно продовжувати.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Список літератури

1. Popsuishapka, O., Litvishko, V., Uzhegova, O., & Pidgaiska, O. (2020). Frequency of complications at shaft fractures according to kharkiv traumatological medical-social expert committee (MSEC) data. *ORTHOPAEDICS, TRAUMATOLOGY and PROSTHETICS*, (1), 20–25. <https://doi.org/10.15674/0030-59872020120-25>
2. SK, S. (2019). Fracture Non-Union: A Review of Clinical Challenges and Future Research Needs. *Malaysian Orthopaedic Journal*, 13(2), 1–10. <https://doi.org/10.5704/moj.1907.001>
3. Harris, A. M., Althausen, P. L., Kellam, J., Bosse, M. J., & Castillo, R. (2009). Complications Following Limb-Threatening Lower Extremity Trauma. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1097/bot.0b013e31818e43dd>
4. Zura, R., Xiong, Z., Einhorn, T., Watson, J. T., Ostrum, R. F., Prayson, M. J., Della Rocca, G. J., Mehta, S., McKinley, T., Wang, Z., & Steen, R. G. (2016). Epidemiology of Fracture Nonunion in 18 Human Bones. *JAMA Surgery*, 151(11), e162775. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.2775>
5. Mills, L. A., Aitken, S. A., & Simpson, A. H. R. W. (2017). The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults. *Acta Orthopaedica*, 88(4), 434–439. <https://doi.org/10.1080/17453674.2017.1321351>
6. Smakaj, A., De Mauro, D., Rovere, G., Pietramala, S., Maccauro, G., Parolini, O., Lattanzi, W., & Liuzza, F. (2022). Clinical Application of Adipose Derived Stem Cells for the Treatment of Aseptic Non-Unions: Current Stage and Future Perspectives — Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3057. <https://doi.org/10.3390/ijms23063057>
7. Grygoriev, V. V. (2020). *Use of biological activity of autofibrin in surgical treatment of fractures*: dissertation of PhD in Medical Sciences. Kharkiv. [in Ukrainian]
8. Nappe, C. E., Rezuc, A. B., Montecinos, A., Donoso, F. A., Vergara, A. J., & B. Martinez. (2016). Histological comparison of an allograft, a xenograft and alloplastic graft as bone substitute materials. *Journal of Osseointegration*, 8(2), 20–26. <https://doi.org/10.23805/jo.2016.08.02.02>
9. Jayankura, M., Schulz, A. P., Delahaut, O., Witvrouw, R., Seefried, L., Berg, B. V., Heynen, G., & Sonnet, W. (2021). Percutaneous administration of allogeneic bone-forming cells for the treatment of delayed unions of fractures: a pilot study. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02432-4>
10. Rollo, G., Bonura, E. M., Falzarano, G., Bisaccia, M., Iborra, J. R., Grubor, P., Filippini, M., Pichierri, P., Hitov, P., Leonetti, D., Russi, V., Daghino, W., & Meccariello, L. (2020). Platelet rich plasma or hyperbaric oxygen therapy as callus accelerator in aseptic tibial non union. Evaluate of outcomes. *Acta Biomedica*, 91(4), 1–11. DOI: 10.23750/abm.v91i4.8818
11. Menger, M. M., Laschke, M. W., Nussler, A. K., Menger, M. D., & Histing, T. (2022). The vascularization paradox of non-union formation. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-022-09832-x>
12. Wildemann, B., Ignatius, A., Leung, F., Taitsman, L. A., Smith, R. M., Pesántez, R., Stoddart, M. J., Richards, R. G., & Jupiter, J. B. (2021). Non-union bone fractures. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00289-8>
13. Kostenuik, P., & Mirza, F. M. (2016). Fracture healing physiology and the quest for therapies for delayed healing and nonunion. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(2), 213–223. <https://doi.org/10.1002/jor.23460>
14. Garnavos, C. (2017). Treatment of aseptic non-union after intramedullary nailing without removal of the nail. *Injury*, 48, S76—S81. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.04.022>
15. Uliana, C. S., Bidolegui, F., Kojima, K., & Giordano, V. (2020). Augmentation plating leaving the nail in situ is an excellent option for treating femoral shaft nonunion after IM nailing: a multicentre study. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. <https://doi.org/10.1007/s00068-020-01333-0>
16. Wu, X.-Q., Wang, D., Liu, Y., & Zhou, J.-L. (2021). Development of a tibial experimental non-union model in rats. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13018-021-02408-3>
17. Oktas, B. (2014). Effect of extracorporeal shock wave therapy on fracture healing in rat femoral fractures with intact and excised periosteum. *Joint Diseases and Related Surgery*, 25(3), 158–162. <https://doi.org/10.5606/ehc.2014.33>
18. Tawonsawatruk, T., Kelly, M., & Simpson, H. (2014). Evaluation of Native Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Local Tissue in an Atrophic Nonunion Model. *Tissue Engineering Part C*:

- Methods*, 20(6), 524–532. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0465>
19. Shimizu, T., Akahane, M., Morita, Y., Omokawa, S., Nakano, K., Kira, T., Onishi, T., Inagaki, Y., Okuda, A., Kawate, K., & Tanaka, Y. (2015). The regeneration and augmentation of bone with injectable osteogenic cell sheet in a rat critical fracture healing model. *Injury*, 46(8), 1457–1464. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.04.031>
 20. Onishi, T., Shimizu, T., Akahane, M., Okuda, A., Kira, T., Omokawa, S., & Tanaka, Y. (2020). Robust method to create a standardized and reproducible atrophic non-union model in a rat femur. *Journal of Orthopaedics*, 21, 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.03.040>
 21. Schmidhammer, R., Zandieh, S., Mittermayr, R., Pelinka, L. E., Leixnering, M., Hopf, R., Kroepfl, A., & Redl, H. (2006). Assessment of Bone Union/Nonunion in an Experimental Model Using Microcomputed Technology. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 61(1), 199–205. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000195987.57939.7e>
 22. Skaliczki, G., Weszl, M., Schandl, K., Major, T., Kovács, M., Skaliczki, J., Redl, H., Szendroi, M., Sziget, K., Mate D., Dobo-Nagy, C., & Lacza, Z. (2012b). Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model. *Acta Physiologica Hungarica*, 99(2), 223–232. <https://doi.org/10.1556/aphysiol.99.2012.2.16>
 23. Schutzenberger, S., Kaipel, M., Schultz, A., Nau, T., Redl, H., & Hausner, T. (2014). Non-union site debridement increased the efficacy of rhBMP-2 in a rodent model. *Injury*, 45(8), 1165–1170. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.05.004>
 24. Cheng, A., Krishnan, L., Pradhan, P., Weinstock, L. D., Wood, L. B., Roy, K., & Guldberg, R. E. (2019). Impaired bone healing following treatment of established nonunion correlates with serum cytokine expression. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(2), 299–307. <https://doi.org/10.1002/jor.24186>
 25. Oetgen, M. E., Merrell, G. A., Troiano, N. W., Horowitz, M. C., & Kacena, M. A. (2008). Development of a femoral non-union model in the mouse. *Injury*, 39(10), 1119–1126. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.04.008>
 26. Chaubey, A., Grawe, B., Meganck, J. A., Dymant, N., Inzana, J., Jiang, X., Connolly, C., Awad, H., Rowe, D., Kenter, K., Goldstein, S. A., & Butler, D. (2013). Structural and biomechanical responses of osseous healing: a novel murine nonunion model. *Journal of Orthopaedics and Traumatology*, 14(4), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s10195-013-0269-4>
 27. Lu, C., Miçlau, T., Hu, D., & Marcucio, R. S. (2006). Ischemia leads to delayed union during fracture healing: A mouse model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(1), 51–61. <https://doi.org/10.1002/jor.20264>
 28. Brownlow, H. C., Reed, A., & Simpson, A. H. R. W. (2002). The vascularity of atrophic non-unions. *Injury*, 33(2), 145–150. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(01\)00153-x](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(01)00153-x)
 29. Reed, A. A. C., Joyner, C. J., Isefuku, S., Brownlow, H. C., & Simpson, A. H. R. W. (2003). Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume*, 85-B(4), 604–610. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.85b4.12944>
 30. Eckardt, H., Christensen, K. S., Lind, M., Hansen, E. S., Hall, D. W. R., & Hvid, I. (2005). Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*, 36(4), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2004.10.019>
 31. Ozturk, B. Y., Inci, I., Egri, S., Ozturk, A. M., Yetkin, H., Goktas, G., Elmas, C., Piskin, E., & Erdogan, D. (2012). The treatment of segmental bone defects in rabbit tibiae with vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded gelatin/hydroxyapatite “cryogel” scaffold. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 23(7), 767–774. <https://doi.org/10.1007/s00590-012-1070-4>
 32. Sharun, K., Pawde, A. M., Banu S. A., Manjusha, K. M., Kailaiselvan, E., Kumar, R., Kinjavdekar, P., & Amarparl. (2021). Development of a novel atrophic non-union model in rabbits: A preliminary study. *Annals of Medicine and Surgery*, 68, 102558. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.102558>
 33. Murao, H., Yamamoto, K., Matsuda, S., & Akiyama, H. (2013). Periosteal cells are a major source of soft callus in bone fracture. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 31(4), 390–398. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0429-x>
 34. Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., & Marsh, D. (2007). Fracture healing: The diamond concept. *Injury*, 38, S3–S6. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(08)70003-2)
 35. Liu, H.-Y., Chiou, J.-F., Wu, A. T. H., Tsai, C.-Y., Leu, J.-D., Ting, L.-L., Wang, M.-F., Chen, H.-Y., Lin, C.-T., Williams, D. F., & Deng, W.-P. (2012). The effect of diminished osteogenic signals on reduced osteoporosis recovery in aged mice and the potential therapeutic use of adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, 33(26), 6105–6112. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.024>
 36. Huang, Z., Gu, H., Yin, X., Gao, L., Zhang, K., Zhang, Y., Xu, J., Wu, L., Yin, J., & Cui, L. (2019). Bone regeneration using injectable poly (γ -benzyl-L-glutamate) microspheres loaded with adipose-derived stem cells in a mouse femoral non-union model. *American Journal of Translational Research*, 11(5), 2641–2656. PMID: PMC6556664
 37. Liu, J., Zhou, P., Long, Y., Huang, C., & Chen, D. (2018). Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0817-1>
 38. Li, S., Xing, F., Luo, R., & Liu, M. (2022). Clinical Effectiveness of Platelet-Rich Plasma for Long-Bone Delayed Union and Nonunion: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.771252>
 39. Ruiz-Iban, M. A., Gonzalez-Lizan, F., Diaz-Heredia, J., Elias-Martin, M. E., & Correa Gorospe, C. (2013). Effect of VEGF-A165 addition on the integration of a cortical allograft in a tibial segmental defect in rabbits. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 23(5), 1393–1400. <https://doi.org/10.1007/s00167-013-2785-4>

Стаття надійшла до редакції 02.05.2024

A REVIEW OF ANIMAL MODELS FOR BONE FRACTURE NONUNION AND THEIR ROLE IN STUDYING BIOLOGICAL THERAPY EFFICACY

P. M. Vorontsov, V. Ye. Maltseva

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

✉ Valentyna Maltseva, Phd in Biol. Sci.: maltseva.val.ev@gmail.com