DOI: 10.26693/jmbs07.06.038
УДК 616.71–003.93–089.843:611.018.54:611.018–08

Воронцов П. М., Туляков В. О.,
Гуліда Т. І., Леонтьєва Л. В.

ЗМІНИ РОЗРАХУНКОВИХ ІНДЕКСІВ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПІСЛЯ ЗАПОВНЕННЯ ДЕФЕКТУ В МЕТАФІЗІ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ АЛОГЕННИМИ КІСТКОВИМИ ІМПЛАНТАТАМИ

Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

Мета: на основі аналізу розрахункових біохімічних показників мінералізації в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів у кістковій тканині після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами.

Матеріал та методи. Досліджено показники мінералізації кісткової тканини у сироватці крові білих щурів: вміст загального білку, кальцію, активності лужної та кислої фосфатаз, проведено розрахунок показників співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатази, а також ступеня мінералізації.

В роботі використано модель створення транскортикального дефекту у метафізі стегнової кістки критичного розміру у білих щурів.

Результати. Введення алоімплантатів у зону дефекту метафізу стегнової кістки призводило до прискорення перебігу мінералізації кісткової тканини у експериментальних щурів обох вікових груп. Так на 28-у добу при введенні алоімплантатів за відношенням активності лужної та кислої фосфатаз у 3-місячних щурів спостерігалося перевищення відповідного показника у дослідних тварин без заповнення дефекту у 1,26 разів (p = 0,008), а також у 1,34 рази рівень показника на 14-у добу.

Як в умовах використання алоімплантатів для заповнення дефекту, так і при незаповненому дефекті для обох вікових груп максимум маніфестації маркерів формування кісткової тканини був зафіксований на 28-у добу експерименту, причому значення цього максимуму були вищими у групи тварин із алоімплантатами. Якщо при незаповненому дефекті на 90-у добу мало місце різке зниження аналізованих показників, що свідчить про фактичне припинення процесу мінералізації, то в умовах використання алоімплантатів зниження було менш виразним, що є ознакою тривання даних процесів.

У 3-місячних тварини із незаповненим дефектом швидше проходила стадійність процесів мінералізації і на один і той же термін дані процеси були більш розвиненими.

Співвідношення між активністю лужної фосфатази та кислої фосфатази у сироватці крові показало себе більш інформативним і чутливим показником, ніж ступень мінералізації.

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

Ключові слова: алоімплантат, дефект, моделювання, біохімія, мінералізація, розрахункові показники.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження є частиною науково-дослідної роботи відділення трансплантології та відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук України», «Вивчити механізми оптимізації регенерації кістки залежно від віку реципієнта в разі використання алогенних кісткових імплантатів у комбінації з мезенхімальними стромальними клітинами і біологічно активними факторами плазми крові», № держ. реєстрації 0119U102341. У рамках зазначеної теми авторами проведено визначення

динаміки рівнів біомаркерів та розрахункових показників мінералізації у експериментальних білих щурів із транскортикальним дефектом стегнової кістки критичного розміру в умовах встановлення алоімплантатів кісткової тканини.

Вступ. У всьому світі щорічно мільйони пацієнтів потребують ортопедичних операцій з використанням кісткових трансплантатів [1].

Половина всіх ортопедичних операцій вимагає кісткової пластики для успішного результату спондилодезу, реконструктивних процедур і лікування кісткових дефектів, що виникли в результаті травми, пухлини, інфекції або вродженої деформації [2].

За оцінками, частота сповільненого зрощення або незрощення переломів довгих кісток становить від 2,5 % до 46 % залежно від локалізації та тяжкості пошкодження кістки, м'яких тканин і судинних структур [3].

Для оптимізації процесу регенерації кістки за наявності критичного дефекту використовують кістковий матеріал ауто– або алогенного походження. Критичний дефект – це таке ушкодження кістки, за якого неможливе відновлення до початкового стану. Він може утворитися як у разі первинних травм, так і внаслідок хірургічного видалення нежиттєздатних тканин. У процесі лікування таких ушкоджень, наприклад, в разі спондилодезу хребта, застосування кісткових імплантатів посідає друге місце після ауто остеопластики [4].

Вирішальне значення для відновлення біомеханічних властивостей оперованого сегмента скелета, його раннього навантаження та функціональної реабілітації має швидка інкорпорація замісних матеріалів у кістку. Тобто матеріал повинен мати остеоіндуктивні та остеокондуктивні властивості. Кісткові дефекти можуть бути заповнені аутотрансплантатами, алотрансплантатами і ксенотрансплантатами природного або синтетичного походження [5]. «Золотим стандартом» для заміщення дефектів кісток є аутотрансплантація, але використання кісткових аутотрансплантатів для заповнення великих дефектів обмежено через ризик втрати опорної функції внаслідок видалення значних об'ємів материнської кістки, а також не завжди відповідну контурам дефекту форму вилученої тканини, та необхідність додаткових хірургічних втручань для отримання трансплантатів. У зв`язку зі вказаним, поширеною практикою є застосування для заповнення дефектів кісток синтетичних або алогенних кісткових імплантатів [6]. На жаль, останні частково втрачають остеокондуктивні й остеоіндуктивні якості в процесі виготовлення, стерилізації та зберігання [7].

Використання алотрансплантатів при ендопротезуванні з причин нестабільних переламів шийки стегна дозволяє підвищити якісь репозиції, контроль довжини шийки [8].

У зв'язку з цим, для вирішення цієї проблеми уявляється важливим подальше та більш поглиблене вивчення механізмів регенерації – дисрегенерації кістки на різних стадіях та пошук шляхів керування цим процесом [6]

У сучасних умовах при дотриманні технології використання алотрансплантатів призводить однакового відсотку позитивних результатів, як і при встановленні аутотрансплантатів або збагачених кісткових трансплантатів [9, 10].

Мета дослідження: на основі аналізу розрахункових біохімічних показників мінералізації в сироватці крові лабораторних щурів оцінити перебіг метаболічних процесів у кістковій тканині після заповнення дефекту в метафізі стегнової кістки алогенними кістковими імплантатами.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин [11, 12] після ухвалення плану Комітетом із біоетики (протокол № 191 від 22.04.2019) при Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка Національної академії медичних наук України» (Ліцензія МОЗ України на медичну практику від 16 серпня 2012 р. № 02012214).

Експеримент проведений на базі експериментально-біологічної клініки атестованих відділів трансплантології та експериментального моделювання з експериментально–біологічною клінікою (Свідоцтво про відповідність системі вимірювань вимогам ДСТУ ISO 10012:2005 № 01–0020/2019 від 8 лютого 2019 р., чинно до 8 лютого 2021 р.).

В експерименті було використано 60 білих щурів. З них 30 – 3–місячного віку і 30 – 9–місячного віку, яких рандомно розподілили на чотири групи:

I – 15 щурів 3–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки;

II – 15 щурів 3–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки та заповнення його кістковим алоімплантатом;

III – 15 щурів 12–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки;

IV – 15 щурів 12–місячного віку, виконання дефекту в метафізі стегнової кістки та заповнення його кістковим алоімплантатом;

Через 14, 28 і 90 діб після операції відповідно виводили з експерименту по 5 тварин кожної групи.

Хірургічні втручання виконані в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистригання шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком Бетадин® передньолатеральним доступом відкривали ділянку

дистального метафізу стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект критичного розміру – мінімальний дефект, який не загоюється самостійно протягом життя тварини чи впродовж експерименту [13]. Для дистального метафізу стегнової кістки щурів мінімальний розмір критичного дефекту названий діаметром і глибиною 2,5 мм [14]. Циліндричні алоімплантати діаметром 3 мм, довжиною 3 мм розміщували в ділянці дефекту щурів III та VI груп. Після місцевої обробки антибіотиком пошарового зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком.

Лабораторні дослідження виконані у атестованому відділі лабораторної діагностики та імунології ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України», свідоцтво про відповідність засобів вимірювання № 01-0018/2019 від «08» лютого 2019 р., дійсне до 08 лютого 2022 р., акредитаційний сертифікат Головної акредитаційної комісії при МОЗ України вищої категорії № 468 від 13.03.2018 р., дійсний до 12.03.2021 р., сертифікат на систему управління якістю ДП «Харківстандартметрологія» № UA 8O072.02012214.1-2019 від 26.02.2019 р., дійсний до 25.02.2022 р.

Зібрану кров після природного зсідання звільнювали від формених елементів 15 хвилин центрифугуванням при 3000 об./хв. Надосадкову рідину відокремлювали і в ній вимірювали досліджувані показники.

Відбір параметрів біохімічного аналізу проводили таким чином, щоб дослідити показники мінерального обміну кісткової тканини.

- активність лужної та кислої фосфатаз за реакцією з діетаноламіном кінетичними методами згідно з інструкцією «Лужна фосфатаза – кін Сп.Л» та «Кисла фосфатаза – кін Сп.Л»;
- вміст кальцію потенціометричним методом з використанням аналізатора електролітів АЄК–01;
- вміст загального білку біуретовим методом [15].

При виконанні біохімічних досліджень використовували напівавтоматичні біохімічні аналізатори «GBG STAT FAX 1904 plus» та Stardust FC. Проведено розрахунок показників співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатази, а також ступеня мінералізації (відношення вмісту кальцію (для цього перераховано одиниці вимірювання ммоль/л в г/л) до вмісту білку).

Аналіз даних був виконаний з використанням програмних пакетів Microsoft Excel XP та Statsoft Statistica 10.0 (№ ліцензії 00218-04981-27336-AA152). Результати вимірювань представлені як медіана та квартилі (25 %, 75 %) Для порівняння двох груп використовували аналіз Манна–Уїтні. Різницю вважали статистично значущою за умови якщо $p < 0,05$ [16].

Результати дослідження та їх обговорення. *14-а доба. 3-місячні тварини* На 14-у добу в 3-місячних щурів із алоімплантатами не було зафіксовано статистично достовірних розбіжностей із таким у групи експериментальних тварин із незаповненим дефектом ні за ступенем мінералізації, ні за співвідношенням активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові (**таблиця**).

14-а доба. 12-місячні тварини. На 14-у добу в 3-місячних щурів із алоімплантатами рівень ступеня мінералізації та відношення активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові також достовірно не відрізнялися від такого у групи дослідних тварин із незаповненим дефектом (**таблиця**).

28-а доба. 3-місячні тварини. На 28-у добу в 3-місячних щурів із алоімплантатами значення ступеня мінералізації не мало достовірних відмінностей від такого у групи експериментальних тварин із незаповненим дефектом, а також із даними відповідних груп на 14-у добу експерименту (**таблиця**). В той же час за відношенням активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові 3-місячі щури із алоімплантатами перевищували показник у експериментальних тварин із незаповненим дефектом у 1,26 разів ($p = 0,008$). Також дана група тварин у 1,34 рази ($p = 0,008$) перевищувала за аналізованим показником рівень параметрів на 14-у добу.

28-а доба. 12-місячні тварини. 12-місячні щури із незаповненим дефектом на 28-у добу продемонстрували ступень мінералізації, у 1,15 разів нижчий за показник 3-місячної групи дослідних тварин того ж терміну експерименту ($p = 0,008$).

Результати біохімічного дослідження розрахункових показників мінералізації сироватки крові 12-місячних щурів із незаповненим дефектом на 28-у добу досліду характеризувалися падінням рівня ступеня мінералізації у 1,17 разів відповідно до такого у аналогічних тварин на 14-у добу ($p = 0,008$).

12-місячні щури із алоімплантатами на 28-у добу експерименту продемонстрували достовірно вищий рівень ступеня мінералізації у порівнянні до такого у дослідних тварин із незаповненим дефектом того ж віку і терміну дослідження у 1,14 разів ($p = 0,008$), що вказує на сильнішу активацію процесів мінералізації кісткової тканини. Також слід зазначити у аналізованої групи на цей термін збільшення відношення активності лужної фосфатази до кислої. Так, на даний термін експерименту у 12-місячних щурів групи із алоімплантатами відношення активності лужної та кислої фосфатаз достовірно перевищувало у 1,07 рази ($p = 0,046$) рівень відповідного показника у групи тварин 12-місячного віку без заповнення дефекту. Відповідно,

Таблиця – Співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатаз, а також ступінь мінералізації у щурів різного віку після моделювання дефекту в метафізі стегнової кістки з використанням або без алогенних кісткових імплантатів (Me, (25 %; 75 %)) (n = 5)

Термін після втручання	Показники	Групи тварин			
		незаповнений дефект		алоімплантат	
		3-місячні щури, (n = 5)	12-місячні щури, (n = 5)	3-місячні щури, (n = 5)	12-місячні щури, (n = 5)
14 доба	ступінь мінералізації	1,41 (1,36; 1,50) $\cdot 10^{-3}$	1,43 (1,37; 1,46) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 0,436$	1,43 (1,38; 1,47) $\cdot 10^{-3}$ $p_2 = 0,185$	1,40 (1,35; 1,43) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 0,561$ $p_2 = 0,128$
	активність лужної фосфатази/ кислої фосфатази	10,42 (9,45; 11,34)	9,98 (9,10; 10,63) $p_1 = 0,164$	9,66 (9,16; 10,13) $p_2 = 0,116$	10,35 (9,83; 10,94) $p_1 = 0,637$ $p_2 = 0,188$
28 доба	ступінь мінералізації	1,40 (1,35; 1,43) $\cdot 10^{-3}$ $p_3 = 0,425$	1,22 (1,15; 1,27) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 0,008$ $p_3 = 0,008$	1,42 (1,36; 1,49) $\cdot 10^{-3}$ $p_2 = 0,821$ $p_3 = 0,990$	1,39 (1,31; 1,45) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 0,965$ $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,823$
	активність лужної фосфатази/ кислої фосфатази	10,28 (9,56; 11,49) $p_3 = 0,821$	12,40 (12,02; 12,81) $p_1 = 0,008$ $p_3 = 0,008$	12,98 (12,21; 13,27) $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,008$	13,24 (12,93; 13,68) $p_1 = 0,116$ $p_2 = 0,046$ $p_3 = 0,008$
90 доба	ступінь мінералізації	1,32 (1,18; 1,66) $\cdot 10^{-3}$ $p_3 = 0,116$ $p_4 = 1,000$	1,29 (1,22; 1,33) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 0,156$ $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,436$	1,26 (1,21; 1,33) $\cdot 10^{-3}$ $p_2 = 0,136$ $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,0081$	1,26 (1,19; 1,34) $\cdot 10^{-3}$ $p_1 = 1,000$ $p_2 = 0,956$ $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,046$
90 доба	активність лужної фосфатази/ кислої фосфатази	7,79 (7,10; 8,18) $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,008$	7,34 (6,82; 7,38) $p_1 = 0,008$ $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,116$	10,63 (9,16; 11,29) $p_2 = 0,867$ $p_3 = 0,548$ $p_4 = 0,865$	8,66 (8,12; 9,14) $p_1 = 0,008$ $p_2 = 0,008$ $p_3 = 0,008$ $p_4 = 0,008$

Примітки: p_1 – порівняння показників у щурів різного віку з однаковим типом заповнення дефекту на однаковий термін після втручання; p_2 – порівняння показників групи з алоімплантатами з показниками групи з незаповненим дефектом у щурів однакового віку на однаковий термін після втручання; p_3 – порівняння показників на різних термінах експерименту у тварин одного віку та типу заповнення дефекту з показниками тієї ж групи на 14-у добу після операції; p_4 – порівняння показників у груп щурів однакового віку та типу заповнення дефекту на 90-у добу після втручання із показниками на 28-у добу після втручання

відношення активності лужної та кислої фосфатаз у 12-місячних щурів із алоімплантатами на 28-у добу експерименту було достовірно вищим ніж у аналогічної групи тварин на 14-у добу у 1,28 разів (p = 0,008), що також підтверджує тезу про початок широкої активації формування кісткової тканини у дослідних тварин з алоімплантатами на 14-у добу дослідження. (**таблиця**).

90-а доба. 3-місячні тварини. На 90-у добу експерименту 3-місячні щури із алоімплантатами показали зниження у 1,34 разів ступеня мінералізації по відношенню до такого у аналогічної групи дослідних тварин на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,32 рази по відношенню до такого на 28-у добу дослідження (p = 0,008).

90-а доба. 12-місячні тварини. 12-місячні щури із незаповненим дефектом на 90-у добу досліду продемонстрували зниження ступеня мінералізації у 1,11 разів (p = 0,008) відносно аналогічних тварин на 14-у добу експерименту (**таблиця**).

При цьому в них спостерігалося достовірно менше у 1,36 рази відношення активності лужної та кислої фосфатаз величини такого показника у аналогічної за віком та видом лікування групи тварин на 14-у добу (p = 0,008) та у 1,68 разів менше при порівнянні із даними на 28-у добу (p = 0,008) (**таблиця**).

При аналізі результатів обрахування біохімічних показників 12-місячних тварин із алоімплантатами на 90-у добу показано, що на даний термін спостерігалося зниження у 1,11 разів (p = 0,008)

ступеня мінералізації відповідно до показника аналогічної групи дослідних тварин на 14-у добу експерименту та у 1,10 разів відповідно до такого показника на 28-у добу (p = 0,046).

За співвідношенням активності лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові 12-місячних щурів з алоімплантатами на 90-у добу спостерігалося суттєве зниження, що може свідчити про затихання процесів ремоделювання кісткової тканини. Відповідно до даних 12-місячних тварин із алоімплантатами на 14-у добу воно був меншим у 1,20 разів (p = 0,008), в той час як у порівнянні із даними на 28-у добу – меншим у 1,53 разів (p = 0,008). Також група 12-місячних щурів із алоімплантатами на 90-у добу за аналізованим параметром поступалася у 1,23 рази рівню 3-місячних тварин того ж терміну експерименту і умов лікування (p = 0,008).

В той же час 12-місячні тварини мали на 90-у добу вищі у 1,18 разів значення даного показника порівняно із таким у 12-місячних тварин із незаповненим дефектом (p = 0,008).

Це можна розцінювати як те, що вже на 28-у добу експерименту заповнення дефекту алоімплантатом у старших тварин призводило до більш швидкого початку фази мінералізації новозбудованого органічного матриксу, яке тривало із зменшенням інтенсивності на 90-у добу досліду. При відсутності алоімплантації процеси протікали, вірогідно, в тому ж напрямку, але повільніше і менше прискорювалися на контрольні терміни.

Співвідношення між активністю лужної та кислої фосфатаз у сироватці крові показало себе більш інформативним і чутливим показником, ніж ступень мінералізації.

Таким чином, на підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів 3-х і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки в умовах заповнення дефекту кістковими алоімплантатами та із незаповненим дефектом визначено, що введення алоімплантатів у зону дефекту метафізу стегнової кістки призводило до прискорення початку та розширення процесів формування нової кісткової тканини. Якщо максимум маніфестації маркерів формування кісткової тканини був зафіксований вже на 28-у добу експерименту для обох вікових груп та варіантів лікування, причому значення цього максимуму були вищими у групи тварин із алоімплантатами, то при незаповненому дефекті мало місце різке зниження аналізованих показників на 90-у добу, а в умовах використання алоімплантатів зниження було менше виразним. Розрахункові показники співвідношення активності лужної до активності кислої фосфатаз, а також ступінь мінералізації (співвідношення вмісту кальцію та білка) можуть бути використані для оцінювання якості процесу ремоделювання [17].

На 28-у добу у 12-місячних щурів із незаповненим дефектом було вищим відношення активності лужної фосфатази до кислої, що свідчить про активацію початкових стадій мінералізації нової кісткової тканини, а у 3-місячних щурів – був вищим ступінь мінералізації, який відповідає активнішому заповненню кісткової тканини кальцієм на більш пізніх стадіях процесу, що може біти ознакою того, що у 3-місячних тварини із незаповненим дефектом швидше проходила стадійність процесів мінералізації.

Висновки

1. На підставі результатів біохімічного дослідження сироватки крові експериментальних щурів 3- і 12-місячного віку із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки із заповненням дефекту кістковими алоімплантатами та без заповнення визначено, що введення алоімплантатів у зону дефекту метафізу стегнової кістки призводило до прискорення перебігу мінералізації кісткової тканини у експериментальних щурів обох вікових груп.
2. Як в умовах використання алоімплантатів для заповнення дефекту, так і при незаповненому дефекті для обох вікових груп максимум маніфестації маркерів формування кісткової тканини був зафіксований на 28-у добу експерименту, причому значення цього максимуму були вищими у групи тварин із алоімплантатами. Якщо при незаповненому дефекті на 90-у добу мало місце різке зниження аналізованих показників, що свідчить про фактичне припинення процесу мінералізації, то в умовах використання алоімплантатів зниження було менш виразним, що є ознакою тривання даних процесів.
3. У 3-місячних тварини із незаповненим дефектом швидше проходила стадійність процесів мінералізації і на один і той же термін дані процеси були більш розвиненими.
4. Співвідношення між активністю лужної фосфатази та кислої фосфатази у сироватці крові показало себе більш інформативним і чутливим показником, ніж ступень мінералізації.
5. Лікування експериментальних щурів із дефектом критичного розміру у метафізі стегнової кістки алоімплантатами призводить до виявлення в них біохімічних ознак активації регенеративних процесів, але ця активація швидко знижується за інтенсивністю, носить недостатній характер і потребує додаткового посилення за рахунок окремих зовнішніх впливів.

Перспективи подальших досліджень. Проблема заповнення дефектів кісткової тканини при її бракуванні вельми актуальна в усьому світі.

У всьому світі значна кількість хворих потребують ортопедичних втручань з використанням кісткових трансплантатів. Для підвищення їх остеокондуктивних й остеоіндуктивних якостей уявляється важливим подальше та більш поглиблене вивчення механізмів регенерації – дисрегенерації кістки на різних стадіях та пошук шляхів керування цим процесом, що може бути напрямком подальших наукових досліджень. Розробка оптимального протоколу використання алоімплантатів у зазначеної категорії пацієнтів потребує продовження подальшого наукового пошуку.

References

1. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *J Orthop Trauma*. 2019;33(4):203–13. PMID: 30633080. doi: 10.1097/BOT.0000000000001420
2. Bracey DN, Cignetti NE, Jinnah AH, Stone AV, Gyr BM, Whitlock PW, et al. Bone xenotransplantation: A review of the history, orthopedic clinical literature, and a single-center case series. *Xenotransplantation*. 2020;27(5):e12600. PMID: 32372420. doi: 10.1111/xen.126009
3. Xie C, Wang C, Huang Y, Li Q, Tian X, Huang W, et al. Therapeutic effect of autologous bone grafting with adjuvant bone morphogenetic protein on long bone nonunion: a systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res*. 2022 Jun 3;17(1):298. PMID: 35659033. PMCID: PMC9166588. doi: 10.1186/s13018-022-03185-3
4. Bone Grafts and Substitutes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Material Type (Natural, Synthetic), By Application Type (Spinal Fusion, Craniomaxillofacial, Long Bone), By Region, And Segment Forecasts, 2018–2025. 2018. Available from: https://www.grandviewresearch.com/industry–analysis/bone–grafts–substitutes–market
5. Sallent I, Capella-Monsonís H, Procter P, Bozo IY, Deev RV, Zubov D, et al. The few who made it: commercially and clinically successful innovative bone grafts. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Sep;8:952–56. PMID: 32984269. PMCID: PMC7490292. doi: 10.3389/fbioe.2020.00952
6. Nappe CE, Rezuc AB, Montecinos A, Donoso FA, Vergara AJ, Martinez B. Histological comparison of an allograft, a xenograft and alloplastic graft as bone substitute materials. *J Osseointegrat*. 2016;8(2):20–26.
7. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res*. 2019;23:9. PMID: 30915231. doi: 10.1186/s40824-019-0157-y
8. Huang ZY, Su YH, Huang ZP, Wang YB, Du GC, Huang YP, et al. Medial Buttress Plate and Allograft Bone-Assisted Cannulated Screw Fixation for Unstable Femoral Neck Fracture with Posteromedial Comminution: A Retrospective Controlled Study. *Orthop Surg*. 2022 May;14(5):911-918. PMID: 35445587. PMCID: PMC9087460. doi: 10.1111/os.13273
9. Wilson MJ, Hook S, Whitehouse SL, Timperley AJ, Gie GA. Femoral impaction bone grafting in revision hip arthroplasty: 705 cases from the originating centre. *Bone Joint J.* 2016 Dec;98-B(12):1611-1619. PMID: 27909122. doi: 10.1302/0301-620X.98B12.37414
10. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2018;28(3):351–62. PMID: 29080923. doi: 10.1007/s00590-017-2063-04
11. Verkhovna Rada Ukrajini. Evropeyska konventsija pro zakhist khrebetnikh tvarin, sho vikoristovujutsja dlja doslidnikh ta inshikh naukovikh tsiley [European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes]. Strasburg, 18 bereznja 1986 roku: ofitsiyniy pereklsd. Mizhnarodnuy document Rady Evropy. [Ukrainian]. Available from: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text
12. Zakon Ukrajini № 3447-IV, Stattja 26, vid 21.02.2006. Pro zakhyst tvaryn vid zhorstokogo povodzhennja [On the protection of animals from cruel treatment]. [Ukrainian]. Available from: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text
13. Poser L, Matthys R, Schawalder P, Pearce S, Alini M, Zeiter S. A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *Biomed Res Int*. 2014;2014:348635. PMID: 24738053. PMCID: PMC3967594. doi: 10.1155/2014/348635
14. Tao ZS, Wu XJ, Zhou WS, Wu XJ, Liao W, Yang M, et al. Local administration of aspirin with β–tricalcium phosphate/poly–lactic–co–glycolic acid (β–TCP/PLGA) could enhance osteoporotic bone regeneration. *J Bone Miner Metab*. 2019 Nov;37(6):1026–35. PMID: 31076895. doi: 10.1007/s00774-019-01008-w
15. Kamyshnikov VS. *Methods of clinical laboratory research*. 2018. 736 s.
16. Lang TA, Sesik MM. *How to describe statistics in medicine. An annotated guide for authors, editors, and reviewers*. 2011. 480 s.
17. Talashova IA, Gasanova AG, Tkachuk EA. Demonstration of phosphatase activity and electrolyte exchange under the conditions of implantation of calcium phosphate materials. *Heniy Ortopedii*. 2010;4:94–98.

UDC 616.71–003.93–089.843:611.018.54:611.018–08

Changes in Calculated Indices of Biochemical Indicators of Blood Serum of Rats of Different Age after Filling the Defect in the Metaphysis of the Femur Bone with Allogeneous Bone Implants

Vorontsov P. M., Tuljakov V. O., Gulida T. I., Leontjeva L. V.

Abstract. *The purpose of the study* was to analyze estimated biochemical parameters of mineralization in the blood serum of laboratory rats, to evaluate the course of metabolic processes in bone tissue after filling the defect in the metaphysis of the femur with allogeneic bone implants.

Materials and methods. The work uses a model of creating a transcortical defect in the femur metaphysis of a critical size in white rats. Indicators of mineralization of bone tissue in the blood serum of white rats were studied: the content of total protein, calcium, alkaline and acid phosphatase activity, the ratio of alkaline to acid phosphatase activity, as well as the degree of mineralization, were calculated. Based on the results of a biochemical study of the blood serum of 3- and 12-month-old experimental rats with a critical size defect in the metaphysis of the femur with filling of the defect with bone alloimplants and without filling, it was determined that the introduction of alloimplants into the defect zone of the femoral metaphysis led to an acceleration of the course of mineralization of bone tissue in experimental rats of both age groups.

Results and discussion. The introduction of alloimplants into the defect zone of the femoral metaphysis led to an acceleration of bone tissue mineralization in experimental rats of both age groups. Thus, on the 28th day when alloimplants were introduced, the ratio of alkaline and acid phosphatase activity in 3-month-old rats was by 1.26 times higher than the corresponding indicator in experimental animals without defect filling (p=0.008), as well as by 1.34 times – the level indicator on the 14th day. Both in the conditions of using alloimplants to fill the defect, and in the case of an unfilled defect for both age groups, the maximum manifestation of markers of bone tissue formation was recorded on the 28th day of the experiment, and the values of this maximum were higher in the group of animals with alloimplants. If in the case of an unfilled defect on the 90th day there was a sharp decrease in the analyzed indicators, which indicates the actual cessation of the mineralization process, then under the conditions of using alloimplants the decrease was less pronounced, which is a sign of the continuation of these processes. In 3-month-old animals with an unfilled defect, the stages of mineralization processes passed faster and these processes were more developed at the same time. The ratio between the activity of alkaline phosphatase and acid phosphatase in blood serum has proven to be a more informative and sensitive indicator than the degree of mineralization.

Conclusion. Treatment of experimental rats with a critical size defect in the metaphysis of the femur with alloimplants leads to the detection of biochemical signs of activation of regenerative processes in them, but this activation quickly decreases in intensity, is insufficient and requires additional strengthening due to certain external influences.

Keywords: alloimplant, defect, modeling, biochemistry, mineralization, calculated indicators.

ORCID and contributionship:

Petro Vorontsov : 0000 0002-5758-7223 [A,B]
Vladislav Tuljakov : 0000-0002-3187-1592 [D,F]
Tetjana Gulida : 0000 0001 5239 4732 [B,C]
Larisa Leontjeva : 0000 0001 7843 2354 [C,E]

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

CORRESPONDING AUTHOR

Petro Vorontsov

Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology Ukrainian National Academy of Medical Sciences,
Department of Transplantology
80, Pushkinska Str., Kharkiv 64002, Ukraine
tel: +380502000303, e-mail: vorontsov63@ukr.net

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 27.09.2022 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування