

АНОТАЦІЯ

Тодосюк Т.П. Клініко-експериментальне обґрунтування остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою, легованою германієм, за складних осколкових переломів кісток у собак. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – Ветеринарна медицина (21 – Ветеринарна медицина). Білоцерківський національний аграрний університет. Біла Церква, 2023.

Клініко-експериментально обґрунтовано остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою, легованою германієм, за складних осколкових переломів довгих трубчастих кісток у тварин.

Вперше доведено, що остеокондуктивний керамічний матеріал у фазовому складі 65 мас.% гідроксиапатиту і 35 мас.% β -трикальційфосфату завдяки вмісту в ньому 0,8 мас.% германію у формі гранул з нано-, мезо- та макропорами і адсорбційною активністю 120,3 мг/г набуває остеоіндуктивних та підвищених остеointegraційних властивостей, які зумовлюють ранні неоангіогенез та потужні остеобластичну і ендостальну реакції з формуванням повноцінної кісткової тканини на поверхні та у порах остеозаміщувального матеріалу з поступовою його біодеградацією, відображенням чого є динамічні зміни у сироватці крові біохімічних маркерів кісткового метаболізму, посилення ендотеліальної функції та антикоагулянтного потенціалу крові, урівноважений перебіг гострофазної та остеоімунологічної реакцій.

При цьому рентгенологічно імплантація легової германієм кальцій-фосфатної кераміки у дефекти губчастої ділянки стегнової і компактної ділянки променевої кісток у кролів, порівняно з нелеговою, характеризується на 14-у добу помірною обмеженою періостальною реакцією з підвищеною рентгенщільністю чи явищами периостального остеосклерозу в разі губчастої кістки, динамічним зменшенням на 30-у добу

структурованості і щільності гранул імплантату та обмеженою остеосклеротичною реакцією ендоосту за відсутності компенсаторних змін у ліктьовій кістці, формуванням на 60-у добу рентгеноархітектоніки стегнової чи променевої кістки близької до норми. Заразом макроморфологічно встановлено значно менші розростання періосту, динамічне виповнення дефектів регенератом ідентичним материнській кістковій тканині і глибинним розташуванням керамічних гранул, що свідчить про виражені остеointegraційні властивості керамічних матеріалів та їх контрольовану біорезорбцію.

Доведено, що остеоіндуктивна дія легованої германієм кальцій-фосфатної кераміки виражається в підвищеній міграції в зону кісткового дефекту остеогенних клітин, ранніх і потужних неоангіогенезі та остеобластичній реакції (14-а доба) на фоні помірного і обмеженого запально-резорбтивного процесу, в інтенсивному формуванні та ремоделюванні пластинчастої кісткової тканини (30-а доба) навколо і у порах остеозаміщувального матеріалу, а також з боку ендоосту з поступовою резорбцією його гранул (60-а доба), що також відображає посилені остеointegraційні процеси. При цьому виражена, з наростанням до 30-ої доби, ендостальна реакція у зоні кісткового дефекту є свідченням його консолідації близької до первинного натягу.

Остеозаміщення леговою германієм кальцій-фосфатною керамікою модельних кісткових дефектів у кролів супроводжується реактивними змінами морфологічних показників крові, помірною тромбоцитарною реакцією, більшими в 1,1–1,2 рази ($p < 0,001$) піками лейкоцитарних індексів. При чому рівень церулоплазміну в 1,1–1,2 ($p < 0,001$) рази менший, ніж за остеозаміщення нелеговою керамікою. Також менший у 1,6 рази ($p < 0,001$) рівень втрати антикоагуляційного потенціалу крові з динамічним відновленням активності протеїна С на 30-у добу дослідження. Піковий рівень у крові оксиду азоту на 14-у добу свідчить про посилення ендотеліальної функції, що власне забезпечує інтенсивний неоангіогенез.

Урівноважений перебіг остеоімунологічних реакцій засвідчує короткочасне, лише протягом 14–30-ої діб, підвищення в 1,2–1,3 рази ($p < 0,001$) рівня циркулюючих імунних комплексів.

За остеозаміщення кісткових дефектів трубчастих кісток у кролів легованою германієм кальцій-фосфатною керамікою встановлено оптимізований і динамічний перебіг репаративного остеогенезу, про що засвідчують показники маркерів кісткового метаболізму, зокрема кісткового ізоферменту лужної фосфатази та тартрат-резистентної кислої фосфатази. При цьому, підвищення кальцій-фосфорного індекса з 7 до 30-ої діб відображає інтенсивний перерозподіл кальцію та фосфору в межах кісткової системи. Піки активності кісткового ізоферменту лужної фосфатази в період 14–30-ої діб свідчать про ранню остеобластичну реакцію та інтенсивний остеогенез, а тартрат-резистентної кислої фосфатази лише на 14-у добу – про обмежену і швидкоплинну запально-резорбтивну фазу репаративного остеогенезу.

За індукції вторинного остеопорозу в кролів дексаметазоном рентгенологічні ознаки з'являються вже на 14-у добу у вигляді великопетлистого рисунка губчастої речовини проксимальної епіфізарно-метафізарної ділянки стегнової кістки з посиленою рентгенщільністю контурів кортикального шару кістки. Розвиток остеопорозного процесу супроводжується гіпокальціємією і гіперфосфатемією, за яких на 14-у та 21-у доби вміст у сироватці крові загального кальцію зменшується в 1,4 та 2,1 рази ($p < 0,001$), а фосфору – збільшується в 1,5 та в 1,8 рази ($p < 0,001$), відповідно. Також кортикоїд-індукований остеопороз характеризується збільшенням активності кісткового ізофермента лужної фосфатази та остеорезорбтивної тартратрезистентної кислої фосфатази в 1,1 і в 1,2 рази ($p < 0,001$), відповідно, що свідчить про перевагу процесів остеорезорбції. Поряд з цим в 1,1 рази ($p < 0,001$) знижується рівень оксиду азоту в сироватці крові, що свідчить про зниження ендотеліальної функції. Заразом збільшення кількості еритроцитів і лейкоцитів в крові є проявом прискореного їх виходу із кістково-мозкового депо під дією кортикостероїдного гормону.

Вперше доведено, що встановлені остеозаміщувальні характеристики кальцій-фосфатної кераміки, легованої германієм, реалізуються і у разі дефектів трубчастих кісток у кролів з кортикостероїд-індукованим остеопорозом, у яких кістковий регенерат формується в 2,7 рази ($p < 0,001$) швидше, ніж за природнього під кров'яним згустком. Макро- і гістоморфологічна оцінки кісткових регенератів підтверджують реалізацію остеокондуктивних, остеоінтеграційних і остеоіндуктивних властивостей кальцій-фосфатної кераміки, легованої германієм, в умовах системного остеопорозу.

У кролів з остеопорозом остеозаміщення германієвмісною керамікою супроводжується помірним лейкоцитозом та усуненням посттравматичної олігохромемії на 14-у добу репаративного остеогенезу зі зменшенням рівня гіпокальціємії на 7-у добу і гіперфосфатемії на 30-у добу. При цьому активність кісткової лужної фосфатази з піком на 14-у добу більша в 1,1–1,3 рази ($p < 0,001$) за контрольні показники з піком на 30-у добу, а тартрат-резистентної кислої фосфатази в 1,2 рази ($p < 0,001$) на 14-у добу, що свідчить про ранню та інтенсивну остеогенну реакцію.

Вперше клініко-експериментально обґрунтовано, що остеозаміщення леговою германієм кальцій-фосфатною керамікою після накісткового остеосинтезу за складних осколкових переломів довгих трубчастих кісток у собак за клініко-рентгенологічними критеріями прискорює їх консолідацію в 1,5 рази ($p < 0,001$), порівняно з використанням нелегованої кальцій-фосфатної кераміки, та супроводжується динамічним усуненням еритроцитопенії, меншим рівнем лейкоцитарної реакції і церулоплазміну та вищим рівнем альбуміну, що свідчить про менший ступінь запально-деструктивних процесів.

Заразом встановлено, що патохімічна фаза репаративного остеогенезу в цьому разі супроводжується помірною і швидкоплинною реакцією гострої фази, вдвічі ($p < 0,001$) меншою втратою активності протеїна С з нормалізацією її рівня вже на 14-у добу, підвищенням на 14-у і 30-у в 1,5 рази

($p < 0,001$) вмісту оксиду азоту ендотеліального походження та меншим у 1,2–1,6 рази ($p < 0,001$) рівнем циркулюючих імунних комплексів, тобто помірною остеоімунологічною реакцією, формуванням піків активності загальної лужної фосфатази та її кісткового ізофермента і остеорезорбтивної тартратрезистентної кислої фосфатази на 14-у добу (за нелегованої кераміки на 30-у) з нормалізацією їх активності на 60-у добу за відсутності достовірних змін у динаміці Ca:P індекса, що забезпечує баланс між процесами остеорезорбції і ремоделювання регенерату кісткової тканини.

Отже, остеозаміщення леговою германієм керамікою осколкових переломів трубчастих кісток у собак, порівняно з використанням нелегованої кальцій-фосфатної кераміки, відновлює репаративний потенціал травмованої кісткової тканини та прискорює її консолідацію і супроводжується помірною і швидкоплинною реакцією гострої фази та імунотрансдукцією, посиленням ендотеліальної функції та антикоагулянтного потенціалу крові, збалансованою динамікою активності біохімічних маркерів кісткового метаболізму, що в цілому відображає оптимізований перебіг репаративного остеогенезу.

Обґрунтовано і запропоновано імплантацію кальцій-фосфатної кераміки, легової германієм, за остеозаміщення кісткових дефектів для прискорення консолідації складних осколкових переломів довгих трубчастих кісток різного генезу в собак, що апробовано і підтверджено відповідними актами про впровадження в низці клінік дрібних домашніх тварин України. Водночас запропоновано поряд із біохімічними маркерами кісткового метаболізму (тартрат-резистентної кислої фосфатази, кісткового ізофермента лужної фосфатази та їх співвідношення), визначення стану ендотеліальної функції за рівнем оксиду азоту, антикоагулянтного стану за активністю протеїну С та остеоімунологічної реакції за вмістом у сироватці крові циркулюючих імунних комплексів, Ca:P співвідношення в оцінюванні перебігу репаративного остеогенезу як за високоенергетичних переломів довгих трубчастих кісток у собак, так і в умовах системного остеопорозу.

Матеріали дисертаційної роботи висвітлені у науково-практичній монографії Рубленко М.В., Тодосюк Т.П., Чемеровський В.О., Ульянович Н.В., Фірстов С.О., Коломієць В.В. Остеозаміщення кальцій-фосфатною керамікою, легованою кремнієм і германієм, за переломів кісток у тварин: науково-практична монографія. М.В. Рубленко та ін. Біла Церква: БНАУ, 2023. 83 с. (затверджено та рекомендовано до друку Вченою радою Білоцерківського НАУ (протокол № 3 від 23.03.2023 р.) і використовуються у викладанні дисциплін «Загальна і спеціальна хірургія великих тварин», «Травматологія і ортопедія дрібних домашніх тварин», «Ветеринарна хірургія», «Хвороби собак і котів», «Хвороби дрібних тварин», «Хірургічні хвороби тварин з анестезіологією» «Хвороби екзотичних тварин та дикої фауни» та у наукових дослідженнях 5-ти факультетів ветеринарної медицини і 2-х науково-дослідних інститутів України, що підтверджено відповідними актами.

Ключові слова: остеозаміщення, біоактивна кераміка, регенерація, переломи кісток, кісткова тканина, германій, вторинний остеопороз, собаки, імунні комплекси.

SUMMARY

Todosyuk T.P. Clinical-experimental substantiation of bone replacement with germanium-doped calcium-phosphate ceramics for complex bone fragment fractures in dogs. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the Doctor of Philosophy scientific degree in specialty 211 – Veterinary Medicine (21 – Veterinary Medicine). Bela Tserkva National Agrarian University. Bila Tserkva, 2023.

Osteoreplacement with germanium-doped calcium-phosphate ceramics for complex fragment fractures of long tubular bones in animals is clinically and experimentally substantiated.

For the first time, it was proved that the osteoconductive ceramic material in the phase composition of 65 wt.% hydroxyapatite and 35 wt.% β -tricalcium phosphate due to its content of 0.8 wt.% germanium in the form of granules with nano-, meso- and macropores and an adsorption activity of 120,3 mg/g acquires osteoinductive and increased osteointegration properties, which lead to early neoangiogenesis and powerful osteoblastic and endosteal reactions with the formation of full-fledged bone tissue on the surface and in the pores of the bone substitute material with its gradual biodegradation, which is reflected by dynamic changes in the blood serum of bone metabolism's biochemical markers, strengthening of endothelial function and anticoagulant potential of blood, balanced course of acute phase and osteoimmunological reactions.

At the same time, X-ray implantation of germanium-doped calcium-phosphate ceramics into defects of the cancellous area of the femur and compact radii in rabbits, compared to the unalloyed one, is characterized on the 14th day by a moderate limited periosteal reaction with increased X-ray density or phenomena of periosteal osteosclerosis in the case of cancellous bone, a dynamic decrease on the 30th day of the structure and density of the implant granules and the limited osteosclerotic reaction of the endosteum in the absence of compensatory changes in the ulna, the formation on the 60th day of X-ray architectonics of the femur or radius close to normal. Macromorphologically, much smaller periosteum growths, dynamic filling of defects with regenerate identical to the parent bone tissue, and deep location of ceramic granules have been established, which indicates pronounced osseointegration properties of ceramic materials and their controlled bioresorption.

It has been proven that the osteoinductive effect of germanium-doped calcium-phosphate ceramics is expressed in the increased migration of osteogenic cells to the bone defect zone, early and powerful neoangiogenesis and osteoblastic reaction (14th day) against the background of a moderate and limited inflammatory-resorptive process, in intensive formation and remodeling lamellar bone tissue (30th day) around and in the pores of the bone substitute material, as

well as from the endosteum with gradual resorption of its granules (60th day), which also reflects enhanced osseointegration processes. At the same time, the pronounced endosteal reaction in the area of the bone defect, increasing up to the 30th day, is evidence of its consolidation close to the initial tension.

Osteoreplacement with germanium-doped calcium-phosphate ceramics of model bone defects in rabbits is accompanied by reactive changes in blood morphological indicators, a moderate platelet reaction, 1.1–1.2 times greater ($p < 0.001$) peaks of leukocyte indices. At the same time, the level of ceruloplasmin is 1.1–1.2 ($p < 0.001$) times lower than in osteoreplacement with unalloyed ceramics. Also, the level of anticoagulation potential's loss of blood with a dynamic recovery of protein C activity on the 30th day of the study is also 1.6 times lower ($p < 0.001$). The peak level of nitric oxide in the blood on the 14th day indicates an increase in endothelial function, which subsequently ensures intensive neoangiogenesis. A balanced course of osteoimmunological reactions is evidenced by a short-term increase in the level of circulating immune complexes by 1.2–1.3 times ($p < 0.001$) only within 14–30 days.

An optimized and dynamic course of reparative osteogenesis was established for bone defects of tubular bones in rabbits with germanium-doped calcium-phosphate ceramics, as evidenced by the indicators of markers of bone metabolism, in particular, the bone isoenzyme of alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. At the same time, an increase in the calcium-phosphorus index from the 7th to the 30th day reflects the intensive redistribution of calcium and phosphorus within the bone system. Peak activity of the bone isoenzyme of alkaline phosphatase in the period of 14–30 days indicates an early osteoblastic reaction and intensive osteogenesis, and tartrate-resistant acid phosphatase activity on the 14th day indicates a limited and rapid inflammatory-resorptive phase of reparative osteogenesis.

With the induction of secondary osteoporosis in rabbits with dexamethasone, X-ray signs appear already on the 14th day in the form of a large loop pattern of the spongy substance of the proximal epiphyseal-metaphyseal area of the femur

with increased X-ray density of the contours of the cortical bone layer. The development of the osteoporotic process is accompanied by hypocalcemia and hyperphosphatemia, during which, on the 14th and 21st days, the content of total calcium in blood serum decreases by 1.4 and 2.1 times ($p < 0.001$), and phosphorus increases by 1.5 and 1.8 times ($p < 0.001$), respectively. Also, corticoid-induced osteoporosis is characterized by an increase in the activity of bone isoenzyme alkaline phosphatase and osteoresorptive tartrate-resistant acid phosphatase by 1.1 and 1.2 times ($p < 0.001$), respectively, which indicates the superiority of osteoresorption processes. Along with this, the level of nitric oxide in blood serum decreases by 1.1 times ($p < 0.001$), which indicates a decrease in endothelial function. An infectious increase in the number of erythrocytes and leukocytes in the blood is a manifestation of their accelerated release from the bone marrow depot under the influence of corticosteroid hormones.

It was proved for the first time that the established osteoreplacement characteristics of calcium-phosphate ceramics doped with germanium are also realized in the case of defects of tubular bones in rabbits with corticosteroid-induced osteoporosis, in which bone regenerate is formed 2.7 times ($p < 0.001$) faster than in natural under a blood clot. Macro- and histomorphological evaluations of bone regenerates confirm the realization of osteoconductive, osteointegrative and osteoinductive properties of calcium-phosphate ceramics doped with germanium in conditions of systemic osteoporosis.

In rabbits with osteoporosis, osteoreplacement with germanium-containing ceramics is accompanied by moderate leukocytosis and elimination of post-traumatic oligochromemia on the 14th day of reparative osteogenesis with a decrease in the level of hypocalcemia on the 7th day and hyperphosphatemia on the 30th day. At the same time, the activity of bone alkaline phosphatase with a peak on the 14th day higher by 1.1–1.3 times ($p < 0.001$) than the control indicators with a peak on the 30th day, and tartrate-resistant acid phosphatase by 1.2 times ($p < 0.001$) on the 14th, which indicates an early and intensive osteogenic reaction.

For the first time, it was clinically and experimentally substantiated that osteosubstitution with germanium-doped calcium-phosphate ceramics after periosteal osteosynthesis for complex fragment fractures of long tubular bones in dogs according to clinical and radiological criteria accelerates their consolidation by 1.5 times ($p < 0.001$), compared to the use of unalloyed calcium-phosphate ceramics and is accompanied by a dynamic elimination of erythrocytopenia, a lower level of leukocyte reaction and ceruloplasmin and a higher level of albumin, which indicates a lower degree and a limited level of inflammatory and destructive processes.

It has now been established that the pathochemical phase of reparative osteogenesis in this case is accompanied by a moderate and rapid reaction of the acute phase, twice ($p < 0.001$) less loss of protein C activity with normalization of its level already on the 14th day, an increase on the 14th and 30th 1.5 times ($p < 0.001$) the nitric oxide content of endothelial origin and 1.2–1.6 times lower ($p < 0.001$) the level of circulating immune complexes, that is, a moderate osteoimmunological reaction, the peaks' formation in the activity of total alkaline phosphatase and its bone isozyme and osteoresorptive tartrate-resistant acid phosphatase on the 14th day (for unalloyed ceramics on the 30th) with normalization of their activity on the 60th day in the absence of reliable changes in the dynamics of the Ca:P index, which ensures a balance between the processes of osteoresorption and remodeling of bone regeneration fabrics.

Therefore, compared to the use of unalloyed calcium-phosphate ceramics, osteoreplacement with germanium-doped ceramics for fragment fractures of tubular bones in dogs restores the reparative potential of the injured bone tissue and accelerates its consolidation, and is accompanied by a moderate and rapid reaction of the acute phase, immune complex formation, strengthening of endothelial function and anticoagulant potential of blood, balanced dynamics of the activity of bone metabolism's biochemical markers, reflecting the optimized course of reparative osteogenesis.

The implantation of germanium-doped calcium-phosphate ceramics for osteoreplacement of bone defects to accelerate the consolidation of complex fragmentary fractures of long tubular bones of various genesis in dogs has been justified and proposed, which has been approved and confirmed by relevant acts on implementation in a number of small pet clinics of Ukraine. At the same time, along with biochemical markers of bone metabolism (tartrate-resistant acid phosphatase, bone isoenzyme of alkaline phosphatase and their ratio), determination of endothelial function by the level of nitric oxide, anticoagulant status by protein C activity, and osteoimmunological reaction by the content of circulating immune complexes in the blood serum, Ca:P ratio are proposed in assessing the course of reparative osteogenesis both in high-energy fractures of long tubular bones in dogs and in conditions of systemic osteoporosis.

The materials of the dissertation work are covered in the scientific and practical monograph M.V. Rublenko, T.P. Todosyuk, V.O. Chemerovskyi, N.V. Ulyanchych, S.O. Firstov, V.V. Kolomiets. Osteoreplacement with calcium-phosphate ceramics doped with silicon and germanium for bone fractures in animals: a scientific and practical monograph. M.V. Rublenko and others. Bila Tserkva: BNAU, 2023. 83 p. (approved and recommended for publication by the Scientific Council of Bila Tserkva National University of Science and Technology (protocol № 3 dated 23.03.2023)) and are used in the teaching of the disciplines "General and special surgery of large animals", "Traumatology and orthopedics of small domestic animals", "Veterinary surgery", "Diseases of dogs and cats", "Diseases of small animals", "Surgical diseases of animals with anesthesiology", "Diseases of exotic animals and wild fauna" and in scientific studies of 5 faculties of veterinary medicine and 2 research institutes of Ukraine, which is confirmed by relevant acts.

Key words: osteoreplacement, bioactive ceramics, regeneration, bone fractures, bone tissue, germanium, secondary osteoporosis, dogs, immune complexes.