

УДК 619:617.57-001.5-089.2:612.12:639.7

БИОМАРКЕРИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ В СОБАК ЗА ОСТЕОСИНТЕЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ БІОКОМПОЗИТНОГО МАТЕРІАЛУ

Рубленко М.В., Семеняк С.А.

Білоцерківський національний аграрний університет,
м. Біла Церква, e-mail: rublenko@meta.ua

У статті відображена інформативність маркерів метаболізму кісткової тканини за репаративного остеогенезу осколкових переломів стегнової кістки, а також при заміщенні дефекту біокомполитом коллапан у собак. Встановлена динаміка активності лужної фосфатази та її кісткового ізоферменту, тартрат-резистентної кислоти фосфатази, а також вмісту Са, Р і Мг у сироватці та фібриногену у плазмі крові на різних стадіях репаративного остеогенезу. Максимальна активність лужної фосфатази спостерігалась на 3-ю добу після остеосинтезу, яка менш виражена при застосуванні коллапану. При цьому активність кісткового ізоферменту лужної фосфатази підвищувалась у два піки на 3-ю та 14-у добу. Тартрат-резистентна кислота фосфатаза за умов застосування біокомполиту має два піки на 7-у та 60-у добу. Вміст фібриногену у плазмі крові досягав максимального значення на 3-ю добу після остеосинтезу та в подальшому більш динамічно знижувався при використанні коллапану. Концентрація Са, Р і Мг у сироватці крові не мають істотного значення в прогнозуванні перебігу репаративного остеогенезу.

Ключові слова: собака, біомаркери, репаративний остеогенез, біокомполити

Серед різноманітних травматичних ушкоджень у собак переломи трубчастих кісток займають істотне місце та можуть сягати 85 % від загальної кількості травм локомоторного апарату. Найчастіше [1–3] спостерігаються фрактури стегнової кістки, а частка осколчастих переломів серед трубчастих кісток може сягати від 25 до 60 %. Такі переломи потребують застосування складніших методик остеосинтезу, тривалого періоду реабілітації та мають більший відсоток ускладнень (незрощення, псевдосуглоби, остеомієліти тощо).

Осколкові фрактури, як правило, супроводжуються дефектами кісткової тканини, що потребує їх заміщення, для чого останнім часом запропоновані різноманітні біокомполити. Однак здебільшого дослідники основну увагу звертають на удосконалення різних методів остеосинтезу [4–5], застосування вітамінів і мікроелементів [6], лазерного випромінювання [7] і протизапальних препаратів [8]. Поряд з цим, поза увагою залишаються питання біомеханіки переломів і репаративного остеогенезу, його патогенезу та специфічних критеріїв їх оцінки.

Зовсім нещодавно серед останніх для оцінки метаболізму кісткової тканини у собак почали використовувати ряд біохімічних маркерів: лужна фосфатаза та її кістковий ізофермент, остеокальцин, с-термінальний телопептид колагена I типу [9], тартрат-резистентна кислота фосфатаза [10]. Однак деякі експериментальні дослідження [11] не підтверджують їх діагностичну інформативність, що може бути пов'язано з неоднаковою чутливістю різних маркерів за певних кісткових патологій та змінах кісткового метаболізму. Звідси випливає необхідність у подальших дослідженнях цієї проблеми.

Щодо нетрадиційних маркерів – кальцію, фосфору та магнію, як основних макроелементів неорганічної субстанції кісткової тканини, то інформативність динаміки їх вмісту в сироватці крові при загоєнні переломів кісток має досить дискусійний характер. Так, згідно [12–13] вміст Са, Р, Мп, разом з активністю лужної фосфатази характеризує активність кісткового метаболізму, а інтенсивність фосфорно–кальцієвого обміну можна використовувати в якості тестів для оцінки перебігу репаративної регенерації. Однак за іншими даними [14–15] рівень кальцій–фосфорного обміну доцільніше визначати в кістковому регенераті, що досить складно для практичної ветеринарної медицини.

Мета дослідження – визначити інформативність ряду специфічних і неспецифічних маркерів репаративного остеогенезу за остеосинтезу в собак з використанням біокомполитного препарату коллапан за осколчатих переломів стегнової кістки.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконували на собаках з осколчатими діафізарними переломами та дефектами стегнової кістки (n=14), які надходили до хірургічної клініки Білоцерківського НАУ, та були розділені на контрольну (n=7) і дослідну групи (n=7). Діагноз встановлювали за сукупністю клінічних та рентгенологічних ознак.

Тваринам обох груп через 20 хв після премедикації атропіном (0,03 мг/кг, п/к), в/в вводили 2,5 % розчин тіопенату (10 мг/кг) та виконували епідуральну анестезію 2 % лідокаїном згідно з рекомендаціями [16]. Після підготовки операційного поля проводили латеральний доступ до стегнової кістки та екстракортикальний остеосинтез опорною пластиною. Собакам дослідної групи після накладання пластини та визначення об'єму дефекта проводили його заміщення гранулами препарату «Коллапан Л», (ООО «Интермедапатит», Росія), який містить у своєму складі гідроксиапатит, колаген та лінкоміцин. Дефект заповнювали на 2/3 об'єму, оскільки гранули в подальшому набухають. У контрольній групі дефект не заповнювали, а залишали під кров'яним згустком. Рану ушивали пошарово.

У післяопераційний період тваринам застосовували цефазолін у загальноприйнятих дозах протягом 7 днів. Репаративний остеогенез контролювали клінічно і рентгенологічно. Проби крові відбирали до операції, а також на 3, 7, 14, 30 та 60-ту добу після остеосинтезу. У сироватці крові визначали активність лужної фосфатази (ЛФ) та її кісткового ізоферменту (КЛФ) за Вагнером В.К. зі співав. [17], тартрат-резистентну кислоту фосфатазу (ТРКФ) – наборами фірми «Вітал», (Росія), вміст кальцію (Са), фосфору (Р), магнію (Mg) – наборами «Філісіт–Діагностика» (Україна), фібриногену (Fg) за Беліцер В.О. зі співав. [18].

Результати досліджень. Розрізняють [19] 5 тканинспецифічних ізоферментів ЛФ (печінковий, кістковий, кишковий, плацентарний і нирковий), а у собак виділяють і 6–кортикостероїд-індукований, який з'являється в сироватці хворих на гіперадренокортицизм, тому зміни активності загальної ЛФ важко інтерпретувати, на відміну від показників її ізоферментів, які можуть відображати патологію певних органів.

У тварин дослідної групи відбувалось поступове підвищення активності КЛФ в сироватці крові (табл.1) з двома піками на 3-ю (30,2±1,7 од/л) та на 14-у добу (28,2±1,6 од/л), що перевищувало до операційний рівень в 1,2 і 1,1 рази, відповідно.

Таблиця 1 – Біохімічні показники крові в динаміці репаративного остеогенезу

Термін дослідження	Fg, г/л	ЛФ, од/л	КЛФ, од/л	ТРКФ нмоль/(с·л)	Са, ммоль/л	Р, ммоль/л
Клінічно здорові n=14	2,1±0,2	41,4±2,9	21,4±2,7	28,7±0,69	2,67±0,08	1,27±0,11
До операції n=14	4,4±0,3***	53,9±3,0	25,5±1,3	23,6±0,82***	2,63±0,05	1,16±0,09
3-а доба	<u>6,3±0,4</u> 6,2±0,3	<u>60,2±2,6</u> 78,1±4,1*** ++	<u>30,2±1,7</u> 47,9±2,0*** +++	<u>22,1±0,87</u> 20,1±1,14	<u>2,72±0,04</u> 2,71±0,15	<u>1,54±0,13</u> 1,70±0,05
7-а доба	<u>5,2±0,2</u> 5,2±0,4	<u>45,2±3,5</u> 67,5±4,9*** ++	<u>22,4±1,1</u> 37,2±2,7***	<u>33,0±1,39</u> 29,8±1,32	<u>2,64±0,04</u> 2,72±0,14	<u>1,73±0,16</u> 1,51±0,11
14-а доба	<u>4,0±0,4</u> 5,4±0,4	<u>41,8±3,4</u> 52,3±5,8	<u>28,2±1,6</u> 32,4±2,9	<u>28,9±1,47</u> 23,7±1,21	<u>2,60±0,06</u> 2,56±0,13	<u>1,54±0,12</u> 1,47±0,12
30-а доба	<u>3,1±0,3</u> 4,4±0,8	<u>39,7±5,9</u> 45,4±5,2	<u>23,9±2,0</u> 24,6±1,5	<u>22,6±0,89</u> 30,0±1,68 ++	<u>2,58±0,07</u> 2,44±0,09	<u>1,38±0,07</u> 1,30±0,09
60-а доба	<u>3,4±0,2</u> 3,4±0,4	<u>36,4±4,2</u> 45,7±6,3	<u>21,2±1,3</u> 23,9±1,7	<u>35,8±1,27</u> 40,3±1,48 +	<u>2,53±0,07</u> 2,53±0,10	<u>1,29±0,10</u> 1,31±0,12

Примітки: 1) чисельник (n=7) – дослідна, знаменник (n=7) – контрольна група; 2) Рівні вірогідності різниці між показниками дослідної та контрольної груп: + – <0,05; ++ – <0,01; +++ – <0,001; решта – >0,05; 3) Значення Р: * – <0,05; ** – <0,01; *** – <0,001; решта – >0,05, порівняно з клінічно здоровими тваринами

Така динаміка свідчить про підвищену активність остеобластів і збільшення їх кількості в період активного формування кісткової мозолі. Водночас у собак контрольної групи активність КЛФ максимально підвищувалася лише на 3-ю добу (47,9±2,0 од/л), що в 1,9 рази більше порівняно з її доопераційним рівнем. У подальшому вона поступово знижувалася. При цьому спостерігалася вірогідна різниця (p<0,001) між дослідною і контрольною групою на 3-ю та 7-у добу.

ТРКФ генерує активні кисневі з'єднання, які руйнують матричні компоненти кісткової тканини та виділяється в кров разом з продуктами деградації кісткового матриксу, що відображає ступінь резорбції кісткової тканини. Як до операції, так і на 3-ю добу після остеосинтезу відбувалося зниження (p<0,001) активності ТРКФ – в 1,3 рази (22,1±0,87) в дослідній, та в 1,4 рази (20,1±1,14) в контрольній групі, порівняно з клінічно здоровими тваринами, що свідчить про пригніченість функції остеокластів у фазу гострого запального процесу. На 7 добу відмічалася збільшення активності ТРКФ в 1,5 рази (33,0±1,39 нмоль/(с·л)) в дослідній та в 1,5 рази (29,8±1,32 нмоль/(с·л)) в контрольній групі порівняно з 3-ю добою, що свідчить про збільшення активності остеокластів в зв'язку з резорбцією кісткових уламків в зоні перелому. У подальшому активність ферменту знижувалася до 14 доби в обох групах з вірогідною різницею між ними (p<0,05), при цьому в дослідній групі така динаміка спостерігалася до 30 доби. У контрольній починаючи з 30 доби відбувалось підвищення активності ТРКФ в 1,3 рази (30,0±1,68 нмоль/(с·л)), порівняно з 14 добою. На 60 добу в обох групах вірогідно збільшувалася активність ферменту до 35,8±1,27 нмоль/(с·л) в дослідній і до 40,3±1,48 нмоль/(с·л) в контрольній групі, з вірогідною різницею між групами (p<0,05). Тобто процес резорбції за використання біокомпозиту менш виражений у часі та ступені, що свідчить про більш динамічний перебіг репаративного остеогенезу. У період 60 доби кістковий регенерат закономірно піддається ремоделюванню, яке за рівнем ТРКФ менш виражене.

Активність ЛФ підвищувалась до операції $53,9 \pm 3,0$ од/л, що в 1,3 рази більше ($p < 0,05$) порівняно з показниками клінічно здорових собак. Пік її активності припадає на 3-ю добу – в дослідній групі вона збільшилася в 1,1 ($60,2 \pm 2,6$ од/л), а в контрольній в 1,4 рази ($78,1 \pm 4,1$ од/л). У подальшому активність ЛФ поступово знизилася приблизно до рівня клінічно здорових собак в дослідній групі на 14, а в контрольній на 30 добу, що свідчить про менш виражену реакцію організму дослідних собак на травму.

До позитивних реактантів гострої фази запально-репаративного процесу відноситься фібриноген. Через 12–24 год після перелому стегнової кістки його рівень збільшився вдвічі. Однак пік його концентрації в обох групах спостерігався на 3 добу після остеосинтезу. У подальшому концентрація фібриногену знижувалась, при цьому в дослідній групі дещо швидше, ніж у контрольній. Таким чином, при заміщенні дефекту препаратом коллапан інтенсивність запальної реакції зменшується починаючи з 14 доби.

Коллапан у зоні кісткового дефекту виконує функцію направляючого каркасу для репаративної регенерації та оптимізує репаративний остеогенез, сприяє помірному перебігу запальної реакції, про що свідчить динаміка Fg та неспецифічного маркера запальної реакції – ЛФ. При цьому активність КЛФ характеризується двома піками на 3 та 14 добу, при значно вищій її активності в контрольній групі, що свідчить про оптимізований перебіг репаративного остеогенезу при застосуванні біокомпозиту. Натомість наявність кісткового дефекту в зоні перелому сприяє більш інтенсивному перебігу запальної реакції та значному збільшенню активності остеобластів, що в подальшому проявляється надмірною періостальною реакцією травмованої кістки та тривалим терміном загоєння перелому.

За результатами проведеного дослідження спостерігались зміни вмісту Ca, P та Mg на різних стадіях репаративного остеогенезу, але вони мали, як правило, невірогідний характер та коливались у межах фізіологічних норм. Тобто, визначення їх рівня у сироватці крові є недостатньо об'єктивним для оцінки перебігу репаративного остеогенезу у собак, що узгоджується з даними [20].

Висновки. 1. Біокомпозит коллапан у зоні кісткового дефекту оптимізує репаративний остеогенез, сприяючи помірному перебігу запальної реакції. Натомість наявність кісткового дефекту в зоні перелому сприяє інтенсивному перебігу запальної реакції із значним збільшенням активності остеобластів, що проявляється надмірною періостальною реакцією та тривалим терміном загоєння перелому.

2. Найбільш інформативним маркером репаративного остеогенезу в собак є кістковий ізофермент лужної фосфатази та тартрат-резистентна кислота фосфатаза. Остання за умов застосування біокомпозиту має два піки на 7 та 60 добу, що свідчить про резорбцію кісткових уламків та подальше ремоделювання кісткової мозолі на 60-у добу. У контрольній групі тенденція до збільшення даного показника спостерігається на 7-у та 30-у добу з підвищенням на 60-у ($p < 0,001$), що свідчить про більш тривалий перебіг стадій репаративного остеогенезу.

3. Вміст кальцію, фосфору та магнію в сироватці крові собак, не зважаючи на кісткову травму є досить стабільним, а тому не може бути достатньо об'єктивним критерієм для оцінки перебігу репаративного остеогенезу в собак.

Перспектива подальших досліджень включає визначення клініко-патогенетичної ефективності інших біокомпозитів за репаративного остеогенезу у тварин різних видів.

Список літератури

1. Петренко О.Ф. Особливості переломів кісток кінцівок у домашніх тварин / О.Ф. Петренко // Ветеринарна медицина України. – 2002. – №5. – С. 16 – 17.
2. Пустовіт Р.В. Моніторинг хірургічної патології серед дрібних домашніх тварин ДЛВМ у Київському районі м. Одеси за 2003–2005 роки / Р.В. Пустовіт, Ю.М. Данилейко, М.В. Рубленко // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. – Біла Церква. – 2006. – Вип. 36. – С. 132–137.
3. P.J. Haaland Appendicular fracture repair in dogs using the locking compression plate system: 47 cases / P.J. Haaland L. Sjöström; M. Devor; A. Haug // Vet. Comp. Orthop Traumatol. – 2009. Vol. 4. – P. 309–315.
4. Петренко О.Ф. Рациональні методи остеосинтезу та стимуляція репаративного остеогенезу у тварин: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. вет. наук : спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” / О. Ф. Петренко – Біла Церква, 2002. – 34 с.
5. Сахно Н.В. Оценка способов фиксации отломков трубчатых костей при косых переломах // Актуальные проблемы диагностики, терапии и профилактики болезней домашних животных – Мат-лы международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «Воронежский государственный аграрный университет им. К.Д. Глинки», 21–22 сентября 2006. – Воронеж, 2006. – С. 255–258.
6. Стимуляція репаративного остеогенезу у тварин вітамінами та мікроелементами / О. Ф. Петренко, В. П. Сухонос, В. Б. Борисевич [та ін.] // Методичні рекомендації, затвердж. науково-методичною комісією Державного департаменту ветмедицини МАП України. – 20.12.2006 р. – Київ, 2007. – 28 с.
7. Київська Г. В. Вплив низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання на репаративні процеси при переломах кісток у собак : автореф. дис. на здобуття. наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” / Г. В. Київська – Київ, 2007. – 20 с.
8. Рубленко М.В. Застосування транексамової кислоти і ацелізіну за остеосинтезу переломів трубчастих кісток у собак / М.В. Рубленко, О.В. Єрошенко, В.М. Власенко // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – №22. – С. 496–505.
9. M. Paskalev Changes in some serum bone markers after Experimental fracture and intramedullary Osteosynthesis in dogs / M. Paskalev, s. Krastev, j. Filipov // Trakia journal of sciences. – 2005. Vol. 3. – P. 46-50.
10. C. Sousa Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs / C. Sousa , H. Abreu, C. Viegas // Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. – 2011. Vol 63. – P.1007-1011.

11. Theyse, L. The efficacy of the bone markers osteocalcin and the carboxyterminal cross-linked telopeptide of type-I collagen in evaluating osteogenesis in a canine crural lengthening model / Theyse, L.; Mol, J.A.; Voorhout, G. et al // Vet. J. – 2005. Vol.171. – P.525-531.
12. Смурна О.В. Застосування екстракортикального остеосинтезу та гідроксилпатиту "керган" при переломах клубової кістки у собак: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” О.В. Смурна – Біла Церква, 2009. – 20 с.
13. Дорошук В.О. Стимуляція репаративної регенерації кісткової тканини при переломах у собак: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” В.О. Дорошук – Біла Церква, 2004. – 19 с.
14. Белов А.Д. Видовые особенности патогенеза костной травмы, рациональные способы лечения и стимуляции остеогенеза у животных (Радиобиологические, рентгено-морфологические, био- и гистохимические исследования) : автореф. дис. на соиск. науч. степени д-ра вет. наук : спец. 16.00.05 „Ветеринарная хирургия” / А.Д. Белов – М., 1973. – 38 с.
15. Тимофеев С.В. Репаративная регенерация при переломах позвоночника у мелких домашних животных / С.В. Тимофеев, К.Л. Кирсанов, С.Ю. Концевая [та ін.] // Ветеринария. – 2006. – № 8. – С. 53–55.
16. Рубленко С.В. Застосування місцевих анестетиків у комплексному знеболюванні за абдомінальних оперативних втручань у собак / С.В. Рубленко, А.В. Мельніков, А.В. Березовський // Ветеринарна біотехнологія. – Ніжин, 2013. – Вип 22. – с. 505–511.
17. Вагнер В.К. Методы и результаты исследования изоферментов (кишечной и печеночной фракций) сывороточной щелочной фосфатазы при острых хирургических заболеваниях органов брюшной полости / В.К. Вагнер, В.М. Путилин, Г.Г. Харабуга // Вопр. мед. химии. – 1981. –27, № 6. – С. 752–754.
18. Белицер В.А. Определение содержание фибриногена в плазме крови / В. А. Белицер, Т.В. Варецкая, Ю.П. Бутулин // Лаб. дело. – 1983. – №4. – С. 38–42.
19. Бокарев А.В. К методике определения активности щелочной фосфатазы сыворотки крови собак/ Бокарев А.В., Стекольников А.А.// Ветеринарная патология. – 2007.– № 1 (20). – С. 65 – 74.
20. Пустовіт Р.В. Гемостаз та його корекція при переломах трубчастих кісток у собак : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук: спец. 16.00.05 „Ветеринарна хірургія” / Р.В. Пустовіт. – Біла Церква, 2008. – 22 с.

BIOMARKERS OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN DOGS AFTER OSTEOSYNTHESIS AND USING BIOKOMPOSYTS

Rublenko M.V., Semenyak S.A.

Bila Tserkva National Agrarian University, Bila Tserkva

The aim - to define the information content of specific and non-specific markers of reparative osteogenesis after osteosynthesis in dogs using biokomposyt Collapan for comminuted fractures of the femur.

Materials and methods. Dogs with splinter femoral fractures were divided into control (n=7) and the experimental group (n=7). In the experimental group after osteosynthesis defect replaced with granules of Collapan L.

Results. The dynamics of alkaline phosphatase and its bone isoenzyme, tartrate - resistant acid phosphatase, as well as the content of Ca, P and Mg in serum and plasma fibrinogen at different stages of reparative osteogenesis was investigated. Maximum activity of alkaline phosphatase was observed on the third day after osteosynthesis is less pronounced when using Collapan. Thus the activity of the bone isoenzyme of alkaline phosphatase was increased in two peaks on the 3rd and 14th day. Tartrate - resistant acid phosphatase has two peaks on the 7th and 60th day after use of biokomposyt. Fibrinogen content in plasma reached a maximum on the third day after osteosynthesis and subsequently declined more rapidly using Collapan. The concentration of Ca, P and Mg varied not significant.

Conclusions. 1. Collapan optimize reparative osteogenesis by promoting a moderate course of the inflammatory response in the area of the bone defect. A bone defect promotes intensive course of inflammatory response with significant increase of the activity of osteoblasts in the fracture zone. Further it manifested by excessive periosteal reaction of the injured bone and more longer fracture time healing.

2. The alkaline phosphatase and tartrate - resistant acid phosphatase is the most informative marker of bone formation in dogs. The TRAF has two max peaks at 7 and 60 days, indicating about resorption of bone fragments and subsequent callus remodeling at 60 days. After Collapan application however, in the control group, an increasing trend in this indicator is observed at 7 and 30 days with a significant increase in 60 ($p<0,001$), suggested more longer course of reparative osteogenesis.

3. Calcium, phosphorus and magnesium in the blood serum of dogs in spite of skeletal injury is fairly stable, and therefore can not be sufficiently objective criterion for evaluation of the course of reparative osteogenesis in dogs.

Keywords: dog, biomarkers, reparative osteogenesis, biokompozyty.