

УДК: 616.7-089:615.464:549.52/.76-074:543-092.9

DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2019.04.045>

## ДИНАМІКА ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ ЩУРІВ ПІСЛЯ ІМПЛАНТАЦІЇ МАТЕРІАЛУ БІОСКЛА І СКЛОКЕРАМІКИ

**Шимон В.М., Алфелдій С.П., Шимон М.В., Стойка В.В.**

*ДВНЗ "Ужгородський національний університет", Ужгород*

### Реферат

**Мета.** Вивчити можливості відновлення структури та щільності губчастої та кортикальної кістки при пластиці розробленим нами біосклом.

**Матеріал і методи.** Експеримент проведено на білих щурах де було вивчено деталі ряду динаміку маркерів після їх імплантації на основі скла та склокераміки. Дослідні щури було розподілено на 2 групи. В першій групі імплантували матеріал на основі склокераміки AC-5, в другій - на основі скла FAR-5. Токсичність імплантатів визначали на основі дослідження динаміки вмісту в сироватці крові загального білка, сечовини та активності ферменту аланінової амінотрансферази (АлАТ). Стан відновлення структури та щільності губчастої та кортикальної кістки досліджували за допомогою рівня лужної фосфатази.

**Результати й обговорення.** В результаті дослідження встановлено відсутність впливу імплантатів на основі склокераміки AC-5 на функціональний стан печінки і нирок експериментальних тварин, проте виявлено присутність запально-регенеративних змін кістковій тканині за місцем введення імплантату, які проявляються лише на 7 добу спостереження, що є закономірним для нормального перебігу регенерації після імплантації. Динаміка активності лужної фосфатази в сироватці крові щурів відповідала етапам регенерації кісткової тканини та приживаності імплантатів. У щурів другої групи вміст загального білка, на відміну від тварин першої групи, був значно вищим порівняно з інтактними щурами на всі терміни спостереження, що свідчить про присутність у тварин інтоксикації. Вміст глікопротеїнів був збільшений, що вказує на присутність запалення в організмі тварин наприкінці дослідження. На відміну від щурів першої групи активність лужної фосфатази була значуще підвищеною порівняно з показником інтактних щурів. Показник збільшувався з терміном спостереження, а на 90-ту добу повернувся до референтних значень.

**Висновок.** На підставі вивчення маркерів кісткового метаболізму (активності лужної фосфатази та рівня хондроїтинсульфатів у сироватці крові) виявлено триваліший процес перебудови кісткової тканини в разі застосування імплантаційного матеріалу FAR-5, де підвищені порівняно з інтактними тваринами величини досліджуваних показників спостерігали ще на 30-ту добу експерименту.

**Ключові слова:** кістка, лабораторні щури, біоскло

### Abstract

DYNAMICS OF LABORATORY INDICATORS OF RATS AFTER IMPLANTATION OF BIOGLASS MATERIAL AND GLASS CERAMICS

SHYMON V., ALFELDII S., SHYMON M., STOYKA V.  
State Educational Institution "Uzhgorod National University", Uzhgorod

**Aim.** To explore the recovery of the structure and density of the spongy and cortical bone after filling the defect with the bioglass developed by the authors.

**Material and Methods.** The experiment was performed on white rats where the dynamics of blood biochemical markers were studied after implantation of glass-based and glass-ceramic materials. The study rats were divided into 2 groups. In the first group a material on the basis of glass ceramics AC-5 was implanted; in the second group - a material on the basis of glass FAR-5. Implant toxicity was determined based on the study of the dynamics of serum protein content, urea and alanine aminotransferase (ALT) enzyme activity. The state of restoration of the structure and density of the spongy and cortical bone was examined using alkaline phosphatase level.

**Results and Discussion.** The study found no impact of implants based on glass ceramics AC-5 on the functional state of the liver and kidneys of experimental animals, but revealed the presence of inflammatory-regenerative changes in bone tissue at the implant site manifested only on day 7 of observation, which is normal regeneration after implantation. The dynamics of alkaline phosphatase activity in the serum of rats corresponded to the stages of bone regeneration and implant survival. In the rats of the second group, the content of total protein, unlike the animals of the first group, was significantly higher compared to the intact rats at all observation periods, indicating the presence of intoxication in animals. The glycoprotein content was increased, indicating the presence of inflammation in the animals at the end of the study. In contrast to the rats of the first group, the activity of alkaline phosphatase was significantly increased compared with that of the intact rats. The indicator increased with the observation period and returned to the reference values by the 90<sup>th</sup> day.

**Conclusion.** Based on the study of the markers of bone metabolism (alkaline phosphatase activity and serum level of chondroitin sulfate), a longer process of bone remodeling in case of implantation of the FAR-5 implant material was revealed, which increased compared to the

test parameters of the intact animals.

**Keywords:** bone, laboratory rats, bioglass

## Вступ

Стрімке XXI століття потребує від людства вирішення ряду важливих питань, які спрямовані на підвищення економічного та соціального зростання, які в першу чергу пов'язані з ефективним розвитком науки і техніки.

Одним з найбільш перспективних напрямків в галузі створення принципово нових типів тугоплавких неметалічних і силікатних матеріалів, що інтенсивно розвиваються в теперішній час є медицина. Використання керамічних та склоподібних матеріалів істотно розширює можливості ефективного лікування більшості захворювань та травм кісткової тканини, зокрема в травматології та ортопедії та інших медичних напрямках, що зв'язано з їхніми osteoconductive та osteointegrative властивостями. [2, 5, 6, 7]

На сьогодні розроблення біоматеріалів для відновлювальної медицини є невід'ємною частиною програми охорони здоров'я та покращення якості життя населення. Це пов'язано із загальним зростанням соціальних норм спрямованих на збереження здорової нації. Соціальні програми, які спрямовані на покращення медичного обслуговування населення мають орієнтир на широке застосування сучасних методів лікування зменшення строків лікування, зниження кількості незадовільних результатів.

У сучасній медичній практиці хірургічні втручання часто спрямовані на повну або часткову заміну пошкодженого органу штучним, таким чином даючи пацієнтам змогу вести повноцінне життя. Відомо, що раніше пошкоджений або видалений орган не було змоги замінити. Щодо кісткової тканини на сьогодні така можливість є, і це пов'язано з появою унікальних методів, як діагностики захворювань кісткової тканини, наприклад магнітно-ядерний резонанс, які дають змогу виявити захворювання на ранній стадії, а при проведенні хірургічного втручання зразу провести пластику ураженої частини кістки но-

вітніми матеріалами з кращими механічними та остеогенними властивостями. [3,9]

## Матеріал і методи

Експерименти виконано з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [4] та Закону України "Про захист тварин від жорстокого поводження" (ст. 26, 31) [8] і схвалено позитивним рішенням комітету з біоетики при ДУ "ПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН" (протокол № 184 від 10.09.2018).

Дослідження проведено на 64 білих лабораторних щурах-самцях (на початок експерименту вік 4 міс., маса тіла 200-300 г), яких утримували на стандартному раціоні харчування та споживання води в умовах експериментально-біологічної клініки ДУ "ПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН". Дослідні щури було розподілено на 2 групи. У першій групі імплантували матеріал на основі склокераміки AC-5, в другій - на основі скла FAR-5. Додатково, як групу порівняння для біохімічних досліджень, використано 5 інтактних щурів.

Хірургічні втручання виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Після вистриження шерсті на лівому коліні й оброблення ділянки антисептиком Бетадин® передньо-латеральним доступом відкривали ділянку дистального метафіза стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект, розміри якого відповідали розмірам імплантату, - діаметром 1 мм, глибиною 3 мм. Циліндричні зразки зі СКМ розміщували в ділянці дефекту з використанням press-fit техніки. Після місцевої обробки антибіотиком поширено зашивали м'язи та шкірну рану, ділянку хірургічного втручання обробляли антисептиком. Через 7, 14, 28 і 90 діб після операції по 16 тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. Метод евтаназії обумовлений необхідністю забору крові для біохімічного дослідження.

**Біохімічні дослідження.** У сироватці крові щурів для аналізу регенерації кісткової тканини визначали активність лужної фосфатази за кінетичним методом, хондроїтинсульфати - за методом Nemeth-Csoka у модифікації Л.І. Слущького. Токсичність імплантатів оцінювали на підставі вивчення динаміки вмісту в сироватці крові сечовини та активності ферменту аланінової амінотрансферази (АлАТ). АлАТ визначали за кінетичним методом, вміст сечовини - ферментативним [1, 10].

Статистичний аналіз отриманих показників здійснено за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel та Statsoft Statistica 6.0. Для визначення відмінностей між групами порівняння застосовано метод Манна-Уїтні. Значущою вважали різницю за умов  $p < 0,05$ . У біохімічних дослідженнях порівняння груп проводили за непараметричним критерієм Вілкоксона із розрахуванням медіани (Me) і процентилів (25-75 %).

### Результати й обговорення

Ускладнень у післяопераційному періоді не спостерігали. Із перших днів після імплантації СКМ тварини повністю навантажували кінцівку, характеризувалися нормальною руховою активністю, споживанням їжі та води.

### Перша група (матеріал АС-5)

У результаті досліджень встановлено, що вміст загального білка на 7-му добу після імплантації становив 79,10 г/л та перевищував

показник інтактних тварин на 10% ( $p < 0,05$ ), що пов'язано із загальним запальним процесом на ранні терміни після травми. На подальші терміни спостереження рівень загального білка не відрізнявся від показників інтактних щурів (табл. 1).

Величини вмісту сечовини та АлАТ в сироватці крові не відрізнялися від значень інтактних тварин (табл. 1). Відсутність вірогідної різниці між вказаними показниками в динаміці дослідження після імплантації свідчить про відсутність впливу імплантатів на основі скла та кераміки на функціональний стан печінки і нирок експериментальних тварин.

Зафіксовано підвищення вмісту хондроїтинсульфатів на 7 і 14-ту добу дослідження порівняно з показниками у інтактних щурів - на 32,6% і 26,1% відповідно ( $p < 0,05$ ; табл. 1).

Вміст глікопротеїнів суттєво перевищував показники інтактних тварин на 14,3% ( $p < 0,05$ ; табл. 1) лише на 7-му добу після імплантації.

На 30 та 90-ту добу спостереження вміст глікопротеїнів і хондроїтинсульфатів в крові щурів не відрізнявся від показників у інтактних тварин. Це свідчить про присутність запально-регенеративних змін кістковій тканині за місцем введення імплантату, які проявляються лише на 7 добу спостереження, що є закономірним для нормального перебігу регенерації після імплантації (табл. 1).

Оцінювали перебіг процесу кісткоутворення шляхом аналізу динаміки активності

Таблиця 1

Динаміка лабораторних маркерів крові щурів після імплантації матеріалу на основі склокераміки, дослідна група (Me, 25%-75%)

| Показники                | Інтактні щури<br>n=5      | Динаміка лабораторних маркерів |                             |                             |                           |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                          |                           | 7 доба                         | 14 доба                     | 30 доба                     | 90 доба                   |
| Загальний білок, г/л     | 72,20<br>65,50 – 71,40    | 79,10 *<br>74,90 – 83,30       | 68,75<br>66,10 – 73,10      | 73,15<br>72,93 – 73,38      | 67,20<br>65,80 – 80,40    |
| Сечовина, ммоль/л        | 4,20<br>3,80 – 4,40       | 4,90<br>4,48 – 5,65            | 3,90<br>3,58 – 4,25         | 4,25<br>3,98 – 4,53         | 4,87<br>4,38 – 5,14       |
| АлАТ, U/L                | 58,00<br>54,50 – 68,40    | 44,00<br>36,00 – 49,50         | 46,00<br>39,25 – 58,50      | 70,00<br>63,00 – 77,00      | 48,00<br>24,00 – 51,00    |
| Глікопротеїни, г/л       | 1,12<br>1,07 – 1,14       | 1,28 *<br>1,17 – 1,38          | 1,17<br>1,10 – 1,20         | 1,12<br>1,09 – 1,14         | 1,09<br>0,99 – 1,15       |
| Хондроїтин-сульфати, г/л | 0,230<br>0,216 – 0,245    | 0,305 *<br>0,288 – 0,331       | 0,290 *<br>0,280 – 0,304    | 0,221<br>0,212 – 0,229      | 0,260<br>0,220 – 0,290    |
| Лужна фосфатаза, U/L     | 328,00<br>318,00 – 332,00 | 412,00 *<br>349,00 – 475,30    | 953,00 *<br>807,00 – 1099,0 | 828,00 *<br>679,50 – 958,50 | 320,00<br>301,00 – 370,30 |

\* - вірогідно за Вілкоксоном порівняно з інтактною групою,  $p < 0,05$

Таблиця 2

Динаміка лабораторних маркерів крові щурів після імплантації матеріалу на основі скла, контрольна група (Me, 25%-75%)

| Показники                | Інтактні щури<br>n=5      | Динаміка лабораторних маркерів |                             |                              |                           |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                          |                           | 7 доба                         | 14 доба                     | 30 доба                      | 90 доба                   |
| Загальний білок, г/л     | 72,20<br>65,50 – 71,40    | 82,80 *<br>75,58 – 86,48       | 78,80 *<br>77,35 – 83,63    | 75,10 *<br>74,40 – 76,20     | 76,65 *<br>75,43 – 79,13  |
| Сечовина, ммоль/л        | 4,20<br>3,80 – 4,40       | 3,90<br>3,50 – 4,18            | 2,90 *<br>2,48 – 3,00       | 3,10<br>1,95 – 3,90          | 4,70<br>4,33 – 5,60       |
| АлАТ, U/L                | 58,00<br>54,50 – 68,40    | 65,00<br>61,25 – 76,25         | 56,00<br>45,50 – 73,00      | 61,00<br>57,75 – 66,50       | 54,50<br>46,50 – 60,75    |
| Глікопротеїни, г/л       | 1,12<br>1,07 – 1,14       | 1,15<br>1,10 – 1,25            | 1,14<br>1,07 – 1,20         | 1,02<br>1,01 – 1,07          | 1,33 *<br>1,20 – 1,55     |
| Хондроїтин-сульфати, г/л | 0,230<br>0,216 – 0,245    | 0,386 *<br>0,346 – 0,399       | 0,345 *<br>0,334 – 0,356    | 0,296 *<br>0,285 – 0,301     | 0,201<br>0,168 – 0,227    |
| Лужна фосфатаза, U/L     | 328,00<br>318,00 – 332,00 | 464,50 *<br>411,50 – 500,10    | 525,00 *<br>481,00 – 546,00 | 921,50 *<br>834,50 – 1032,00 | 324,50<br>312,00 – 417,75 |

\* - вірогідно за Вілкоксоном порівняно з інтактною групою,  $p < 0,05$

лужної фосфатази в сироватці крові щурів, яким у дірчастий дефект дистального метафіза стегнової кістки введено зразки матеріалу АС-5. Визначено, що на 7-му добу після імплантації активність ферменту становила 412 U/L і була більшою на 25,6% порівняно з показником інтактної групи, на 14-ту добу збільшилася в 2,3 рази порівняно з попереднім терміном спостереження, а на 90-ту - знизилася на 13,1% порівняно з 14-ю добою, що відповідало етапам регенерації кісткової тканини та приживаності імплантатів (табл. 1).

### Друга група (FAR-5)

У щурів цієї групи вміст загального білка, на відміну від тварин першої групи, був значуще підвищеним порівняно з інтактними щурами на всі терміни спостереження (табл. 2).

Вміст сечовини був знижений на 14-ту добу спостереження на 30,9% ( $p < 0,05$ , табл. 2).

Активність АлАТ не змінювалась на всіх термінах дослідження.

Вміст глікопротеїнів був збільшений на 90-ту добу на 18,8%, що вказує на присутність запалення в організмі тварин наприкінці дослідження. На відміну від цього у щурів першої групи на цей термін спостереження вміст глікопротеїнів не відрізнявся від показників інтактних тварин.

Динаміка зростання вмісту в крові хондроїтинсульфатів зберігалась з 7 до 30-ї доби спостереження, що вказує можливі на деструктивні зміни у кістковій тканині за міс-

цем імплантації. Максимальне підвищення зафіксовано на 7-му добу на 67,8% порівняно з показником інтактних щурів ( $p < 0,05$ ; табл. 2).

Активності лужної фосфатази в сироватці крові, як і у щурів, яким імплантували зразки АС-5, була значуще підвищеною порівняно з показником інтактних щурів з 7 по 30-ту добу спостереження. При цьому на 7-му добу різниця становила 1,4 рази, на 14-ту - 1,6 рази, на 30-ту - 2,8 рази, тобто показник збільшувався з терміном спостереження, а на 90-ту добу повернувся до референтних значень.

### Висновок

Виявлено триваліший процес перебудови кісткової тканини в разі застосування імплантатного матеріалу FAR-5, на що вказують зміни маркерів кісткового метаболізму (активності лужної фосфатази та рівня хондроїтинсульфатів у сироватці крові)

Встановлено пролонгацію перебігу процесів реактивної перебудови при застосуванні матеріалу FAR-5, на що вказує підвищення вмісту в сироватці крові глікопротеїнів на 18,8% порівняно з інтактними тваринами на 90-ту добу спостереження.

### Література

1. Morozenko D. V., Leontieva F. S. (2016). Methods of research of metabolic markers of connective tissue in modern clinical and experimental medicine. Young scientist. 2: 168-172. Ukrainian: (Морозенко Д. В., Леонтєва Ф. С. (2016). Методи дослідження маркерів метаболізму сполучної тканини у сучасній



- клінічній та експериментальній медицині. Молодий вчений. № 2. С. 168-172.)
2. Burianov, A. A., Chorny, V. S., Dedukh, N. V., Dubok, V. A., Protsenko, V. V., Omelchenko, T. N., Udei, A. (2019). Features of regenerative reactions when filling bone defects with bioglass in combination with autologous platelet-enriched plasma. *Trauma*, 20 (1), 56-61. Ukrainian (Бурьянов, А. А., Чорний, В. С., Дедух, Н. В., Дубок, В. А., Проценко, В. В., Омельченко, Т. Н., Удей, А. (2019). Особенности регенераторных реакций при заполнении дефектов костной ткани биостеклом в сочетании с аутологической плазмой, обогащенной тромбоцитами. *Травма*, 20(1), 56-61.)
  3. El Shazley, N., Hamdy, A., El-Eneen, H. A., El Backly, R. M., Saad, M. M., Essam, W., ... & Marei, M. K. (2016). Bioglass in alveolar bone regeneration in orthodontic patients: randomized controlled clinical trial. *JDR Clinical & Translational Research*, 1(3), 244-255.
  4. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes. Strasbourg. Ukrainian (Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей/Страсбург.) Retrieved from: [https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994\\_137](https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137)
  5. Kwon, S., Lee, S., Sivashanmugam, A., Kwon, J., Kim, S., Noh, M., & Hwang, N. (2018). Bioglass-Incorporated Methacrylated Gelatin Cryogel for Regeneration of Bone Defects. *Polymers*, 10(8), 914-917.
  6. Li, L., Hu, H., Zhu, Y., Zhu, M., & Liu, Z. (2019). 3D-printed ternary SiO<sub>2</sub>CaOP<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bioglass-ceramic scaffolds with tunable compositions and properties for bone regeneration. *Ceramics International*, 45(8), 10997-11005.
  7. Parkhomei, A. R., Pynchuk, N. D., Sych, E. E., Tomyla, T. V., Kolesnychenko, V. H. (2015). Obtaining and basic properties of sodium silicate glass. *Modern Problems of Physical Materials Science*, 24, 108-119. Russian (Пархомей, А. Р., Пинчук, Н. Д., Сыч, Е. Е., Томила, Т. В., Колесниченко, В. Г. (2015). Получение и основные свойства натрийборосиликатного стекла. *Современные проблемы физического материаловедения*, 24, 108-119.)
  8. The Law of Ukraine on the Protection of Animals from Cruelty (2006)/ Ukrainian (Закон України про захист тварин від жорстокого поводження (2006).) Retrieved from: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>
  9. Volkova, Y. M., Korovyna, D. H. (2015). Three-dimensional matrices of natural and synthetic origin for cellular biotechnology. *Biotechnology*, 31 (2), 8-26. Russian (Волкова, И. М., Коровина, Д. Г. (2015). Трёхмерные матрицы природного и синтетического происхождения для клеточной биотехнологии. *Биотехнология*, 31(2), 8-26.)
  10. Tymoshenko O.P., Voronina L.M., Kravchenko V. M. *Clinical biochemistry: a textbook*. - Kharkiv: Golden Pages. 2003. 239 p. Ukrainian: (Тимошенко О. П., Вороніна Л. М., Кравченко В. М. *Клінічна біохімія: навчальний посібник*. Харків: Золоті Сторінки. 2003. 239 с.)