

DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2021.51-62>

УДК: 615.849:616-089.843-006



Вплив γ-випромінювання та післяопераційного введення цисплатину на інкорпорацію кісткових алоімплантатів у щурів

Вирва О.Є.¹, ORCID: 0000-0003-0597-4472, e-mail: dr.olegvyrva@gmail.com

Головіна Я.О.¹, ORCID: 0000-0002-1605-9109, e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com

Ашукіна Н.О.¹, ORCID: 0000-0002-0478-7440, e-mail: nataliya.ashukina@gmail.com

Малик Р.В.², ORCID: 0000-0001-9070-4834, e-mail: dr.roman.malyk@gmail.com

Данищук З.М.¹, ORCID: 0000-0003-2968-3821, e-mail: zinada1962@gmail.com

¹Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

²Харківська медична академія післядипломної освіти

Міністерства охорони здоров'я України України, Харків, Україна

Effects of gamma radiation and post-operative cisplatin injection on the incorporation of bone allografts in rats

Vyrva O.Ye.¹, ORCID: 0000-0003-0597-4472, e-mail: dr.olegvyrva@gmail.com

Holovina Ya.O.¹, ORCID: 0000-0002-1605-9109, e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com

Ashukina N.O.¹, ORCID: 0000-0002-0478-7440, e-mail: nataliya.ashukina@gmail.com

Malyk R.V.², ORCID: 0000-0001-9070-4834, e-mail: dr.roman.malyk@gmail.com

Danyshchuk Z.M.¹, ORCID: 0000-0003-2968-3821, e-mail: zinada1962@gmail.com

¹Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology

National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education
of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Ключові слова:

ремоделювання кісткових алоімплантатів, стерилізація, γ-випромінювання, цисплатин, щури.

Для кореспонденції:

Головіна Яніна Олександрівна

Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України», відділ кісткової онкології;

вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com

© Вирва О.Є., Головіна Я.О.,
Ашукіна Н.О., Малик Р.В.,
Данищук З.М., 2021

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Реконструкція післярезекційних дефектів довгих кісток у разі їхнього ураження пухлинами є актуальною проблемою, що потребує постійного вивчення. Кісткові алоімплантати часто використовують для цієї мети. Проте, на жаль, під час виготовлення вони частково втрачають міцність та остеогенні властивості, а їхня виживаність в онкологічних пацієнтів становить 40% через 10 років. Тому становить інтерес пошук більш досконалих методів обробки кісткових алоімплантатів, а також вивчення їхньої перебудови й інкорпорації в онкологічних хворих, стан організму яких змінений внаслідок променевої або хіміотерапії.

Мета роботи – дослідити структуру кісткової тканини після імплантації в дистальний метафіз стегнової кістки щурів алогенного кісткового матеріалу, стерилізованого за допомогою γ-випромінювання або шляхом просочування антибіотиком, та післяопераційного внутрішньоочеревинного введення цисплатину.

Матеріали та методи. Експеримент виконано на 20 самцях білих щурів (вік на початок експерименту 5–6 міс., маса тіла – $365,8 \pm 6,4$ г). Усім щурам виконали дірчастий дефект у дистальному метафізі стегнової кістки та заповнили його алогенним кістковим матеріалом, стерилізованим за допомогою γ-випромінювання (Контроль-1 та Дослід-1) або насиченням антибіотика (Контроль-2 та Дослід-2). Щурам контрольних груп через 14 днів після операції внутрішньоочеревинно вводили 2,0–2,4 мл розчину 0,9 % NaCl, дослідних – 2,5 мг/кг цисплатину. Гістологічний аналіз із гістоморфометрією виконано через 30 днів після операції.

Результати та їх обговорення. Через 30 днів після операції найменша кількість кісткової тканини (11,79%) утворилася в дефектах щурів групи Дослід-1, яким встановлено стерилізований за допомогою радіаційного γ-випромінювання алоімплантат на фоні внутрішньоочеревинного введення цисплатину. Дещо кращий показник виявився в групі Дослід-2 (стерилізація антибіотиком + цисплатин) – 31,64%. У контрольних групах (внутрішньоочеревинне введення 0,9% натрію хлориду) відносний обсяг кісткової тканини становив 16,7% (Контроль-1, радіаційне γ-випромінювання) і 58,09% (Контроль-2, антибіотик). Вміст сполучної тканини був найбільшим у групі Дослід-1 – 31,55%, а найменшим – у групі Контроль-2 – 12,79%.

Висновки. Визначено, що за умов використання для пластики метафізарних дефектів стегнової кістки щурів кісткових алоімплантатів відбувається їхня перебудова з утворенням кісткової та сполучної тканини. Проте відносний вміст цих тканин залежить від способу стерилізації алоімплантату і використання цитостатика. Зокрема, найбільший вміст кісткової тканини (58,09%) виявлено у разі застосування стерилізованого антибіотиком алоімплантату без введення цитостатика, а наймен-

ший – у випадку заміщення дефекту алоімплантатом, стерилізованим за допомогою радіаційного γ -випромінювання, на фоні введення цитостатичного препарату.

Для цитування:

Вирва О.Є., Головіна Я.О., Ашукіна Н.О., Малик Р.В., Данишук З.М. Вплив γ -випромінювання та післяопераційного введення цисплатину на інкорпорацію кісткових алоімплантатів у щурів. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2021. Т. 29. № 3. С. 51–62. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2021.51-62>

Key words:

bone allograft remodeling; sterilization; gamma radiation; cisplatin; rats.

For correspondence:

Holovina Yanina Oleksandrivna
State Organization «Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine», bone tumor department;
80, Puskynska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com

© Vyrva O.Ye., Holovina Ya.O.,
Ashukina N.O., Malyk R.V.,
Danyshchuk Z.M., 2021

ABSTRACT

Background. The reconstruction of long bone defects that occur after resection of tumors is a problem that requires constant study. Bone allografts are often used in this scenario. Unfortunately, while they are prepared, allografts partially lose their strength and osteoinductive properties; their survivability in oncological patients is only 40% after 10 years. This is why the search for superior allograft treatment methods and the study of allograft remodeling and incorporation in oncological patients, whose state has been affected by radiation or chemotherapy, is an area of interest.

Purpose – study the structure of bone tissue in the distal metaphysis of a rat's femur after bone allograft implantation (sterilized using gamma radiation or antibiotic saturation) and post-operative intraperitoneal cisplatin injection.

Materials and Methods. Experiments were performed on 20 male white rats aged 5–6 months at the beginning of the experiment and weighed 365.8 ± 6.4 g. All rats underwent a surgery that created a defect in the distal metaphysis of the femur which was filled with a bone allograft treated with gamma radiation (Control-1 and Experimental-1 groups) or saturated with an antibiotic (Control-2 and Experimental-2 groups). 14 days after allograft implantation, animals from the control groups received an intraperitoneal injection of 2.0–2.4 ml of 0.9% NaCl, while animals from the experimental groups received 2.5mg/kg of cisplatin. Histological analysis and histomorphometry were completed 30 days after the surgery.

Results. 30 days after the operation, the smallest relative area of bone tissue (11.79%) was observed in rats from the Experimental-1 group, with gamma radiation treated allografts and post-operative intraperitoneal cisplatin injections. A somewhat higher value was found in the Experimental-2 group (antibiotic saturation + cisplatin) – 31.64%. In the control groups, (intraperitoneal injection 0.9% NaCl), the relative area of bone tissue was 16.7% (Control-1, gamma radiation treatment) and 58.09% (Control-2, antibiotic saturation). The relative area of fibrous tissue was the largest in the Experimental-1 group – 31.55% and the smallest in the Control-2 group – 12.79%.

Conclusions. Allograft remodeling occurs along with the formation of bone and fibrous tissue when allografts are used to fill defects in the distal femoral metaphysis of rats. However, the relative percentages of those tissues depend on the allograft sterilization method and the use of cytostatic agents. The largest relative percentage of bone tissue (58.09%) was obtained using an allograft saturated with antibiotics and without the administration of cisplatin. The smallest (11.79%), on the other hand, occurred in gamma radiation treated allografts with cisplatin injected intraperitoneally after the operation

For citation:

Vyrva OYe, Holovina YaO, Ashukina NO, Malyk RV, Danyshchuk ZM. Effects of gamma radiation and post-operative cisplatin injection on the incorporation of bone allografts in rats. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2021;29(3):51–62. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.3.2021.51-62>

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» «Розробити методики біореєкстрації дефектів довгих кісток та суглобів при хірургічному лікуванні хворих з кістковими пухлинами», номер державної реєстрації: 0118U003215, шифр теми: ЦФ.2018.4.НАМНУ, прикладна, термін виконання: 2018–2020 рр., керівник – головний лікар, завідувач відділу кісткової онкології, доктор медичних наук, професор Вирва О.Є.

Relationship with academic programs, plans and themes

The paper is part of the planned research project «To develop methodologies for bioreconstructing defects in long bones and joints during surgical treatment of patients with bone tumors» conducted by the Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine. State Registration Number: 0118U003215, topic code: ЦФ.2018.4.НАМНУ, applied, term: 2018–2020, headed by Chief Medical Officer, Head of Bone Tumor Department. Doctor of Medical Sciences, Professor Vyrva O.Ye..

ВСТУП

Реконструкцію післярезекційних дефектів довгих кісток у разі їхнього ураження пухлинами є актуальною проблемою, що потребує постійного вивчення. Протягом декількох десятиріч у світі триває пошук «ідеального» імплантаційного матеріалу для цієї мети. Основними вимогами до імплантатів є їхня біоінертність, можливість замінити дефекти кісток різного розміру та форми, біосумісність із прилеглими тканинами реципієнта, міцність [1, 2]. Сьогодні використовують безліч технік для реконструкції великих дефектів кісток і суглобів. Серед них основними є кісткова пластика з використанням ауто-, ало- та ксенотрансплантатів, дистракційний остеосинтез, заміщення дефектів біоматеріалами, модульне та індивідуальне ендопротезування [3–5].

Проте на сьогодні все більшої популярності набувають комбіновані методи заміщення великих сегментарних дефектів кісток і суглобів, до яких належать: дистракційний остеогенез у поєднанні з кістковою аутопластикою, алокомпонитне ендопротезування (allograft prosthesis composite – APC). Саме комбінація методик дозволяє звести до мінімуму недоліки кожної з них і використати необхідні їхні переваги [6, 7].

Реконструкцію алотрансплантатами дефектів кісток після видалення пухлин часто застосовують як досить ефективну методику хірургічного лікування хворих. Ця методика має певні переваги перед іншими (біологічне відновлення кісткової тканини, місць прикріплення м'язів до кістки), але відсоток ускладнень залишається високим, що обмежує можливості використання алотрансплантатів [8]. Найчастіше в онкологічних пацієнтів спостерігають розвиток інфекційних ускладнень (від 8,3 до 20 % [9–11]), переломи, утворення несправжніх суглобів (від 8 до 14%) і контрактур [12–14]. Рідше виникає розсмоктування алотрансплантату, що зумовлено погіршенням імунологічного стану хворих після поліхіміотерапії. За результатами різних досліджень, середній термін зрощення алотрансплантату та кістки реципієнта становить близько 8 міс. [15, 16].

Для заповнення великих за розмірами дефектів у кістковій онкоортопедії зазвичай використовують структурні та фрагментовані (грануляти, крихта) алоімплантати, які стерилізують за допомогою γ -випромінювання (15–35 кГр) [17], або низьких температур (fresh-frozen, температура до -75°C) [18]. Встановлено, що за умов використання fresh-frozen алотрансплантатів підвищується ризик інфекційних ускладнень [18], а оброблених за допомогою γ -випромінювання, особливо масивних, – ризик їхніх переломів. Оскільки радіація впливає на структурні властивості алотрансплантатів, їх не рекомендується використовувати у випадках APC у вигляді масивних трансплантатів.

Удосконалення способів обробки кісткових алотрансплантатів, а також вивчення їхньої взаємодії з цитостатичними препаратами, є перспективним напрямком дослідження.

Мета роботи – дослідити структуру кісткової тканини після імплантації в дистальний метафіз стегнової кістки шурів алогенного кісткового матеріалу, стерилізованого за допомогою γ -випромінювання або шляхом просочування антибіотиком, та післяопераційного внутрішньоочеревинного введення цисплатину.

INTRODUCTION

The reconstruction of long bone defects that occur after resection of tumors is a problem that requires constant study. For several decades, scientists all over the world are looking for the perfect implant material for this purpose. The main requirements for the bone implant include bioinertness, the ability to replace defects of various sizes and shapes, compatibility with adjacent recipient tissue, and strength [1, 2]. Today, many different techniques are used to reconstruct large bone and joint defects. The main ones include filling the defects with auto-, allo-, and xenografts or biomaterials, distraction osteogenesis, and modular and individual endoprosthesis [3–5].

Even so, combined methods of reconstructing large segmental bone and joint defects, such as distraction osteogenesis using bone autografts and allograft prosthesis composite (APC), are currently gaining in popularity. This combination of different methodologies makes it possible to minimize the disadvantages of each one and effectively utilize their advantages [6, 7].

Allograft reconstruction of bone defects that occur after tumor resection is a common and mostly successful method for surgically treating patients. This method has clear advantages over the rest (biological recovery of the bone tissue and muscle attachment zones). However, the complications rate remains high, which limits the possibility of using allografts in this scenario [8]. The most common complications observed in oncological patients include infections (from 8.3% to 20% [9, 10, 11]), fractures, pseudoarthrosis (from 8% to 14%), and contractures [12–14]. More rarely, allograft resorption occurs, which is caused by a decline in the patient's immunological status after polychemotherapy. As a result of several studies, the average length of time required for union between the allograft and recipient's bone was determined to be approximately 8 months [15, 16].

In order to fill large bone defects, bone oncologists usually use structural and particulate (granular, bone chip) allografts that are sterilized using gamma radiation (15–35 kGy) [17], or low temperatures (fresh-frozen, temperatures below -75°C) [18]. It was determined that the use of fresh-frozen allografts increases the risk of infection [18], while sterilizing with gamma radiation increases the risk of allograft fracture. Since radiation affects the structure of the allograft, using large ones is not recommended in APC.

The refinement of treatment methods for bone allografts and study of their interaction with cytostatic drugs is a potential area for further research.

Objective – study the structure of bone tissue in the distal metaphysis of a rat's femur after bone allograft implantation (sterilized using gamma radiation or antibiotic saturation) and post-operative intraperitoneal cisplatin injection.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

MATERIALS AND METHODS

Тварини

План дослідження схвалено на засіданні комітету з біоетики при Державній установі «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України» (протокол № 204 від 15.06.2020) відповідно до Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26, 31), Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), та Директиви 2010/63/EU [20, 21].

Експеримент виконано на 20 самцях білих щурів популяції експериментально-біологічної клініки Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України». Вік тварин на початок експерименту 5–6 міс., маса тіла – $(365,8 \pm 6,4)$ г. Тварин утримували в клітках по 5 особин, за температури повітря 22–24°C, із 12-годинним світловим періодом, вільним доступом до їжі та води.

Дизайн експерименту

Усім щурам виконали дірчастий дефект у дистальному метафізі стегнової кістки та випадковим чином розподілили до однієї з груп залежно від використаного для заповнення дефекту матеріалу та введення лікарського засобу:

– Контроль-1 (n=5) та Дослід-1 (n=5) – алокісткові імпланти (діаметр 2 мм, висота 3 мм), стерилізовані за допомогою γ -випромінювання (γ -rays);

– Контроль-2 (n=5) та Дослід-2 (n=5) – алокісткові імпланти (діаметр 2 мм, висота 3 мм), просочені розчином антибіотика «Цефтріаксон».

У групах «Контроль» через 14 днів після імплантації алокісткового матеріалу внутрішньоочеревинно вводили 2,0–2,4 мл розчину 0,9% натрію хлориду (ТОВ «Новофарм-Біосинтез», Україна), у групах «Дослід» – цисплатин у дозі 2,5 мг/кг одноразово (ЕБЕВЕ Фарма Гес.м.б.Х, Нфг, КГ, Австрія) [22].

Евтаназію щурів здійснювали через 30 днів після операції шляхом введення летальної дози анестетику (тіопентал натрію, 90 мг/кг внутрішньом'язово).

Виготовлення алокісткових імплантів

Губчасті кісткові алоімпланти діаметром 2 мм і висотою 3 мм виготовлені з метафізів стегнових і великомілкових кісток 5 щурів-донорів за описаною технологією [23]. Стерилізацію алоімплантів проводили радіаційним γ -випромінюванням у дозі від 15 до 25 кГр (обробку алоімплантів виконували у Харківському фізико-технічному інституті, науково-дослідному комплексі «Прискорювач» за допомогою прискорювача ЛУ-10, методом дозиметрії з використанням детекторів Harwell Reprex 4034 (ISO/ASTM 51276)) або шляхом занурювання на 24 год за температури +4°C у розчин антибіотика «Цефтріаксон» (ПАО «Київмедпрепарат» корпорації «АРТЕРІУМ ЛТД», Україна), розчинник – 0,9% натрію хлорид (ТОВ «Новофарм-Біосинтез», Україна), концентрація розчину 1г/10 мл.

Хірургічні втручання

Операції виконано в умовах асептики й антисептики під загальним знеболюванням (кетамін, 50 мг/кг живої маси, внутрішньом'язово). Шерсть на лівому коліні

Animals

The plan for the study was approved by the bioethics committee at the Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology (Protocol No. 204 from 15.06.2020) in accordance with the Ukrainian Law «On the Protection of Animals from Brutal Treatment», the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and Directive 2010/63/EU [20, 21].

Experiments were performed on 20 male white rats from the population of the experimental biological clinic of the Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology. The animals were aged 5–6 months at the beginning of the experiment and weighed 365.8 ± 6.4 g. There were 5 rats in each cage, with surrounding temperatures of 22–24°C and a 12-hour light period, and access to food and water.

Study design

All rats underwent a surgery that created a defect in the distal metaphysis of the femur and were randomly divided into groups depending on the material used to fill the defect and whether cisplatin was used:

– Control-1 (n=5) and Experimental-1 (n=5) – allografts (diameter 2 mm, height 3 mm) sterilized with gamma radiation;

– Control-2 (n=5) and Experimental-2 (n=5) – allografts (diameter 2 mm, height 3 mm) saturated with Ceftriaxone.

14 days after allograft implantation, animals from the control groups received an intraperitoneal injection of 2.0–2.4 ml of 0.9% sodium chloride («Novofarm-Biosintez» LLC, Ukraine), while animals from the experimental groups received 2.5 mg/kg of cisplatin (EBEWE Pharma GmbH Nfg. KG, Austria) [22].

The animals were euthanized by administering a lethal dose of anesthetic (sodium thiopental, 90 mg/kg intramuscularly) 30 days after the surgery.

Preparation of bone allografts

Cancellous bone allografts (diameter 2 mm, height 3 mm) were prepared from the femoral and tibial metaphyses of 5 donor rats using previously defined methods [23]. Allografts were sterilized using gamma radiation (15–25 kGy) or submerged for 24 hours in a 4°C Ceftriaxone solution («Kyivmedpreparat» PJSC in «ARTERIUM LTD», Ukraine) with 0.9% sodium chloride as the solvent. 1g of Ceftriaxone was dissolved per 10 ml of solvent.

Surgery

The operations were completed in aseptic and antiseptic conditions under general anesthesia (ketamine, 50mg/kg intramuscularly). After the fur was shaved off the

голили, операційне поле обробляли антисептиком «Бетадин», після чого відкривали ділянку дистального метафіза стегнової кістки та за допомогою стоматологічного бора моделювали дірчастий дефект діаметром 2 мм, глибиною 3 мм. Промивали рану розчином декасану, висушували та з використанням press-fit техніки в дефекті кістки розміщували алоімплантат, зашивали м'які тканини (рис. 1). Місцево рану обробляли антибіотиком «Цефтріаксон» (порошок, ПАО «Київмедпрепарат» корпорації «АРТЕРІУМ ЛТД», Україна) та накладали шви на шкіру.

left knee and femur, the area was treated using a Betadine solution, the distal metaphysis of the femur was accessed through a cut in the skin, and transcortical defects (diameter 2 mm, depth 3 mm) were created using a dental burr. Then, the wound was washed using a decasan solution, dried, and the allografts were placed in the defect using a press-fit technique (fig. 1). Later, the soft tissue was sutured, locally treated with Ceftriaxone, and the skin sutured.

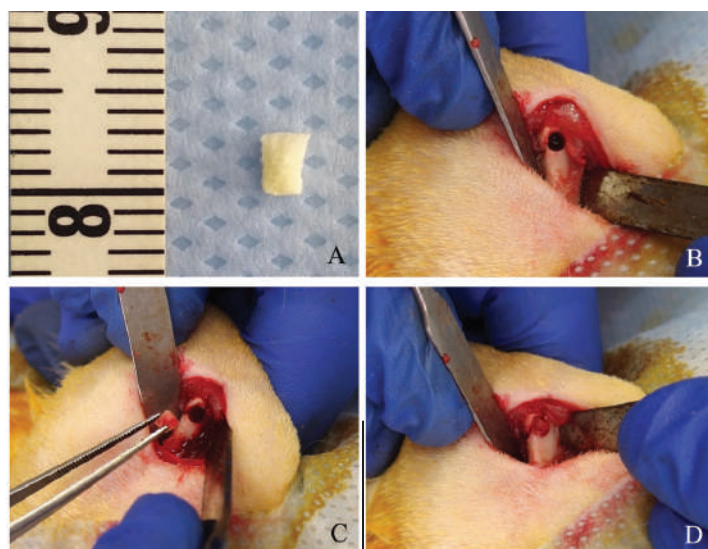


Рис. 1. Зовнішній вигляд імплантату (А) та етапи хірургічного втручання (В–Д)
Fig. 1. The allograft (A) and different stages of the surgery (B–D)

Гістологія

Для гістологічного аналізу в щурів виділяли прооперовані стегнові кістки, очищували від м'яких тканин, фіксували протягом 4 діб у 10 % розчині нейтрального формаліну та декальцинували в 10% розчині мурашиної кислоти. Після цього відрізали дистальні метафізи з ділянкою імплантації, зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації, просочували в парафін із ксилолом та заливали в парафін. Виготовлені фронтальні гістологічні зрізи 5–6 мкм товщиною забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван-Гізоном й аналізували під світловим мікроскопом BX63 (Olympus, Японія). Цифрові знімки отримували за допомогою камери DP73 (Olympus).

Гістоморфометрія

У ділянці імплантації з використанням програмного забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013) вимірювали площі новоутворених тканин – кісткової та сполучної (на 2 центральних зрізах у кожної тварини), потім розраховували їх відносний вміст (bone tissue – B%, fibrous tissue – F%) від загальної площі дефекту.

Статистичний аналіз

Результати вимірювань подано як медіана (Me) та проценти (25% і 75%). Аналіз впливу оброблення алоімплантату (стерилізація за допомогою антибіотика чи іонізуючого γ -випромінювання) на відносні площі тканин, утворених у ділянці дефекту виконано з використанням Mann–Whitney U-test. Статистичний аналіз проведено з використанням програмного забезпечення IBM Statistics SPSS 23. Відмінності вважали статистично значущими у разі $p < 0,05$.

Histology

Femurs that were operated on were taken out, cleaned of soft tissues, and stored in 10% neutral formaldehyde. After 4 days, the bones were placed in 10% formic acid to decalcify and a distal metaphysis with the implantation area was cut out of each bone. The distal metaphyses of the femurs were dehydrated in isopropyl alcohols of increasing concentration and a mixture of paraffin and xylene (1:1), and embedded into paraffin. Frontal histological sections 5–6 μm in width were stained using hematoxylin and eosin (H&E) and Van Gieson's stain, and analyzed under a BX63 light microscope (Olympus, Japan). Digital images were obtained using a DP 73 camera (Olympus).

Histomorphometry

Using the «Cell Sens Dimension 1.8.1» software (Olympus, 2013), the areas of newly formed tissues (bone and fibrous) were measured in two central sections for each animal. After measurement, the percentage of bone tissue (B%) and fibrous tissue (F%) relative to the total area of the defect was calculated.

Statistical analysis

The results of the measurements are presented as medians (Me) and percentiles (25% and 75%). The Mann–Whitney U-test was used to analyze the effect of the allograft sterilization method (gamma radiations or Ceftriaxone saturation) on the relative areas of the newly-formed tissue in the defect. Statistical analysis was conducted using the IBM Statistics SPSS 23 software. The critical level of significance was accepted to be 0.05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

RESULTS AND DISCUSSION

Під час гістологічного дослідження в дефектах стегнових кісток щурів груп Контроль-1, Дослід-1 і Дослід-2 виявлено фрагменти алотрансплантату, сполучну та новоутворену кісткову тканини (рис. 2).

During histological study of the femoral defects of rats from the Control-1, Experimental-1, and Experimental-2 groups, fragments of the allograft, fibrous and newly-formed bone tissues were discovered (fig. 2).

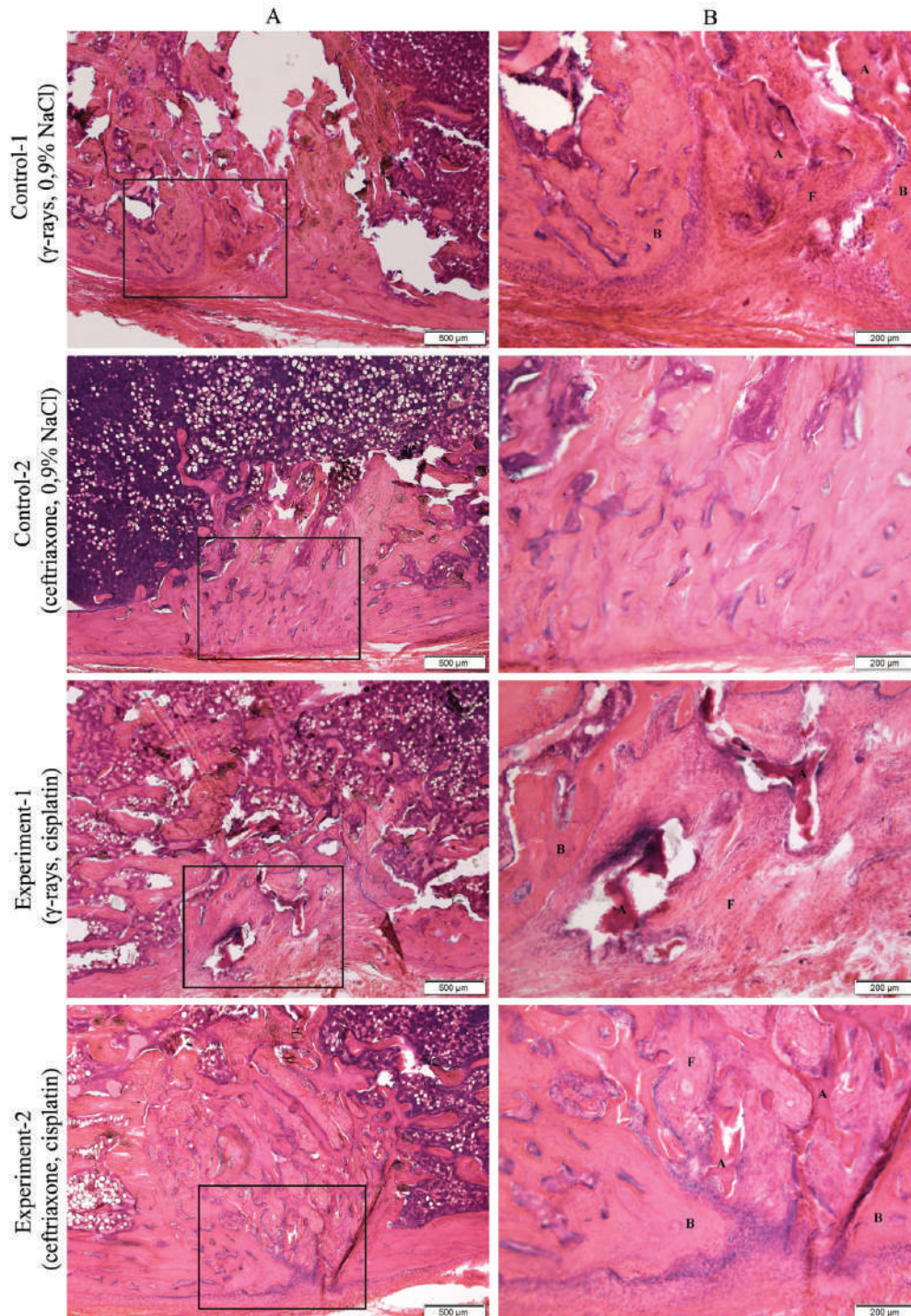


Рис. 2. Показана перебудова алоімплантату з утворенням щільної сполучної та новоутвореної кісткової тканин у всіх групах. Сполучну тканину в ділянці дефекту кортексу виявлено у щурів груп Контроль-1, Дослід-1 і Дослід-2, а явища лізису навколо фрагментів алоімплантату – у групі Дослід-1. У групі Контроль-2 показана перебудова алоімплантату з утворенням губчастої кісткової тканини пластинчастої структури, сформований кортекс і періост. Гематоксилін та еозин. А – allograft, F – fibrous tissue, B – newly formed bone, γ-rays – γ-випромінювання. Рисунки B є фрагментами рисунків A

Fig. 2. The remodeling of allografts with the formation of dense fibrous tissue and bone tissue is shown in all groups, while fibrous tissue only formed in the area of the cortical defect in Control-1, Experimental-1, and Experimental-2 groups.

Lysis formation only occurred around allograft fragments in the Experimental-1 group. In the Control-2 group, cancellous bone tissue of the lamellar structure and periosteum were formed. H&E.

A – allograft, F – fibrous tissue, B – newly formed bone, γ-rays – gamma radiation.

Images from section B are fragments of images from section A

Сполучна тканина була щільною, містила фіброцити зі світлою цитоплазмою та гіперхромними ядрами, густина яких була високою. Новоутворені кісткові трабекули розташовувалися по периферії дефекту, на межі з материнською кісткою, а у групах Контроль-1 і Дослід-2 вони також нашаровувалися на фрагменти алоімплантату. У новоутворених кісткових трабекулах визначали остеоцити, розташовані в лакунах, із гіперхромними ядрами та незначною за обсягом цитоплазмою. На зовнішній поверхні трабекул розташовувалися функціонально активні остеобласти, що свідчить про перебіг репаративного остеогенезу в таких ділянках. За результатами гістоморфометрії встановлено, що з використанням алоімплантатів, оброблених радіаційним γ -випромінюванням, В% була меншою за F%: у групі Контроль-1 – в 1,66 разу ($p=0,004$), Дослід-1 – у 2,8 разу ($p<0,001$). У групі Дослід-2, навпаки, показник В% перевищував F% в 1,9 разу ($p<0,001$) (рис. 3).

The fibrous tissue was dense and contained large numbers of fibrocytes with light-colored cytoplasm and hyperchromic nuclei. Newly-formed bone trabeculae were located on the perimeter of the defect, specifically on the border of the host bone. In the Control-1 and Experimental-2 groups, the trabeculae also formed right on the surface of the allograft. Osteocytes with hyperchromic nuclei and cytoplasm of relatively small size were found in the lacunae of the trabeculae. Functionally active osteoblasts were located on the surface of the trabeculae, which is evidence for reparative osteogenesis occurring in those areas.

As a result of the histomorphometry, it was determined that when allografts were sterilized using gamma radiation, B% was lower than F%: by 1.66 times ($p=0.004$) in the Control-1 group, by 2.8 times ($p<0.001$) in the Experimental-1 group. On the contrary, in the Experimental-2 group, B% was higher than F% by 1.9 times ($p<0.001$) (fig.3).

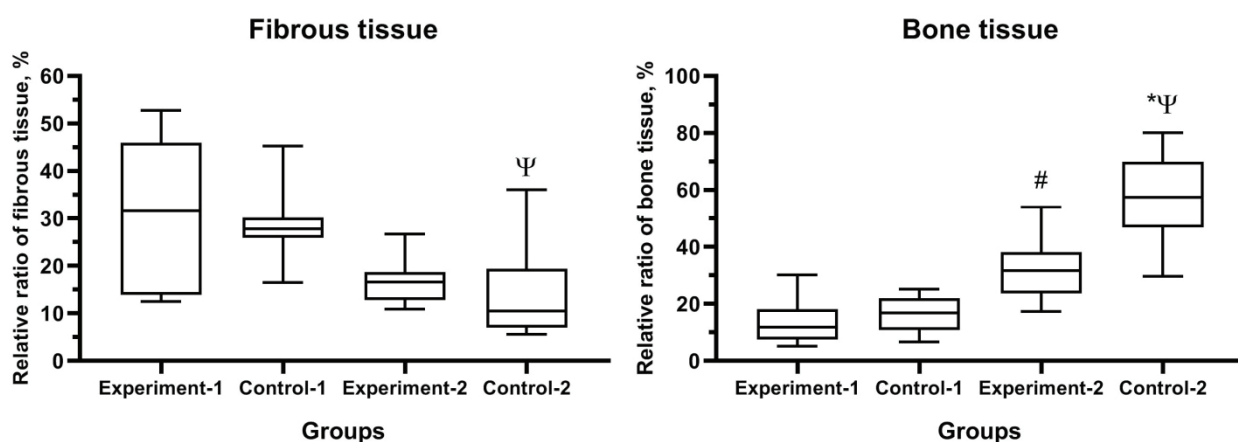


Рис. 3. Відносна площа утворених у дефекті тканин. Дані подані як медіана та проценти (25% і 75%)
Fig. 3. The relative percentages of tissues formed in the defect. The data is presented as median and percentiles (25% and 75%)

Примітка: За результатами Mann–Whitney U-test:

* – суттєві відмінності між контрольною та дослідною групою;

– між групами Дослід-1 та Дослід-2;

Ψ – між групами Контроль-1 і Контроль-2.

Notes: Results of the Mann–Whitney U-test:

* – a significant difference between the experimental and control group;

– a significant difference between Experimental-1 and Experimental-2 groups;

Ψ – a significant difference between Control-1 and Control-2 groups.

Алотрансплантат у групах Контроль-1, Дослід-1 і Дослід-2 був з ознаками перебування. У його розширені канали проростали кровеносні судини, молодішені клітини, утворювалися осередки пухкої сполучної тканини. Навколо окремих фрагментів алотрансплантату у групі Дослід-1 спостерігали осередки лізису. Відновлення кортексу не встановлено – у зоні дефекту на цьому рівні розташовувалася щільна сполучна тканина (див. рис. 2).

Контроль-2 (алотрансплантат стерилізовано шляхом просочування антибіотиком, внутрішньоочеревинне введення 0,9% NaCl) відрізнявся від інших груп тварин за станом дефекту. Зокрема, виявлено майже повну перебудову алотрансплантату, який замістила губчаста кісткова тканина пластинчастої структури та червоний і жовтий кістковий мозок. Новоутворені трабекули розташовувалися густо, перпендикулярно осі кістки та характеризувалися значною щільністю яскраво забарвлених остеоцитів, між ними здебільшого утворився червоний кістковий мозок (див. рис. 2).

The allografts in the Control-1, Experimental-1 and Experimental-2 groups showed evidence of remodeling. Blood capillaries and undifferentiated cells grew deep into the allograft, where loose fibrous tissue was also observed. Lysis was found around some of the allograft fragments in the Experimental-1 group. Recovery of the cortical layer of the distal femoral metaphysis was not observed – dense fibrous tissue was located in that area (fig. 2).

The structure of the defect differed in the Control-2 group (allograft sterilized through saturation with antibiotic, intraperitoneal injection of 0.9% NaCl) in comparison with the other groups. Specifically, the allograft was almost completely remodeled, with cancellous bone tissue of the lamellar structure and red and yellow bone marrow forming in its place. Newly-formed bone trabeculae formed close to one another and perpendicular to the bone axis. A large number of brightly-colored osteocytes were found inside the trabeculae (fig. 2). As opposed to the other experimental groups, newly-formed bone tissue was also located in the cortical defect and was firmly connected

На відміну від інших експериментальних груп новоутворена кісткова тканина розташовувалася також у дефекті кортексу, щільно контактуючи з материнським. В% новоутвореної кістки перевищувала показник в Контролі-1 в 3,46 разу ($p<0,001$) (рис. 3). Подекуди між новоутвореними трабекулами спостерігали сполучну тканину з невисокою щільністю клітин, відносна площа якої була меншою у 2,1 разу порівняно з показником у Контролі-1 ($p<0,001$) і в 4,54 разу порівняно з В% ($p<0,001$). Відмічали осередки періостального та ендостального кісткоутворення. Періост над ділянкою дефекту був сформований.

Запальної реакції не виявлено в жодному випадку.

У материнській кістці в разі використання цитостатику відмічені явища деструкції – розшарування матриксу, утворення щілин, території без клітин, невеличкі ділянки лізису кісткового мозку і трабекул, набряк кісткового мозку.

Обговорення

Кісткові алоімпланти часто застосовують для реконструкції великих дефектів кісток після видалення пухлин, оскільки їх отримання усуває необхідність виконання додаткового болючого хірургічного втручання та проблеми із донорською ділянкою порівняно з аутологічним матеріалом. Проте, на жаль, під час виготовлення кісткові алоімпланти частково втрачають міцність та остеоіндуктивні властивості, а їхня виживаність в онкологічних пацієнтів становить 40% через 10 років [11, 24]. Тому становить інтерес пошук більш досконалих методів обробки кісткових алоімплантів, а також вивчення їхньої перебудови й інкорпорації в онкологічних хворих, стан організму яких змінений внаслідок променевої або хіміотерапії.

У проведеному дослідженні вивчена перебудова алогенного кісткового трансплантату залежно від способу його стерилізації (γ -випромінювання або насичення антибіотиком), а також від використання цисплатину в післяопераційному періоді. Алотрансплантати розміщували в дірчастих дефектах, виконаних у дистальному метафізі стегнової кістки щурів. Коли минуло 14 днів після імплантації, тваринам внутрішньоочеревинно одноразово вводили 2,0–2,4 мл розчину 0,9% натрію хлориду (групи Контроль-1 та Контроль-2) або 2,5 мг/кг цисплатину (групи Дослід-1 та Дослід-2).

Через 30 діб після операції виявлено перебудову алотрансплантів з утворенням сполучної та кісткової тканин, проте їхній вміст відрізнявся в досліджуваних групах. Зокрема, найгірший результат з огляду на утворення кісткової тканини (11,79%) отримано в групі Дослід-1, де в дефекті розміщували стерилізований за допомогою γ -випромінювання алоімплантат на фоні внутрішньоочеревинного введення цисплатину. Це пояснюється негативним впливом відразу двох чинників. З одного боку, відомо, що стерилізація за допомогою γ -випромінювання призводить до зниження механічних характеристик та періоду виживаності кісткових алотрансплантів, що зумовлено руйнуванням колагену в кістковому матриксі [17, 19, 25]. З іншого боку, виявлено, що післяопераційне введення цисплатину суттєво зменшує резорбцію алоімплантату й утворення кістки [26], значно пригнічує кісткоутворення в разі дистракційного остеогенезу [27, 28]. Показано, що цисплатин інгібує проліферацію та стимулює апоптоз мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку, які є одним із джерел для регенерації кістки [29].

to the host cortex. В% exceeded its counterpart in the Control-1 group by 3.46 times ($p<0.001$) (fig. 3). In some locations, fibrous tissue with a low cell density was observed between the newly-formed bone trabeculae. F% was 4.54 times smaller than the В% ($p<0,001$) and 2.1 times smaller than its counterpart in the Control-1 group ($p<0,001$). Areas of periosteal and endosteal bone formation were found. A periosteum was formed over the area of the defect

Inflammation was not observed in any of the samples.

Destructive changes were found in the host bone when cisplatin was used: damaged matrices, formation of fissures, areas without cells, small areas of lysis of bone marrow and trabeculae, and swelling of the bone marrow.

Discussion

Bone allografts are often used to reconstruct large bone defects that occur after tumor resection because the method using which allografts are obtained does not require additional painful surgery and makes it possible to avoid issues with the donor site, as opposed to autografts. Unfortunately, while they are prepared, allografts partially lose their strength and osteoinductive properties; their survivability in oncological patients is only 40% after 10 years [11, 24]. This is why the search for superior allograft treatment methods and the study of allograft remodeling and incorporation in oncological patients, whose state has been affected by radiation or chemotherapy, is an area of interest.

This study evaluated the effect of different sterilization methods (gamma radiation or antibiotic saturation) and post-operational injections of cisplatin on the remodeling of allografts. Allografts were placed in the transcortical defects of distal femoral metaphyses in rats; 14 days after the operation, the animals received an intraperitoneal injection of 2.0 – 2.4 ml of 0.9% NaCl (Control-1 and Control-2 groups) or 2.5mg/kg of cisplatin (Experimental-1 and Experimental-2 groups).

30 days after the operation, remodeled allografts, parts of which were replaced with bone and fibrous tissue, whose areas varied between groups, were observed in the defects. The worst result, from the perspective of bone tissue formation, (11.79%) was reached in the Experimental-1 group, when allografts were sterilized using gamma radiation and cisplatin was injected intraperitoneally after the operation. This finding can be explained by the influence of two negative factors. On one hand, it is known that sterilizing using gamma radiation leads to a decrease in biomechanical properties and lifespan of bone allografts, which is caused by the destruction of collagen in the bone matrix [17, 19, 25]. On the other hand, it was found that post-operative injection of cisplatin significantly decreases the resorption ability of the allograft and bone formation [26], and significantly reduces bone formation during distraction osteogenesis [27, 28]. It was demonstrated that cisplatin inhibits the proliferation and stimulates the apoptosis of mesenchymal stem cells of the bone marrow, which are one of the sources of bone regeneration [29]. Consequently, the removal of one of those factors made it possible to obtain an increased relative percentage of bone tissue: in the Experimental-2 group (antibiotic saturation + cisplatin) – 31.64%.

Відповідно, усунення одного з цих чинників (а саме γ -випромінювання) дає можливість отримати дещо кращий показник відносного вмісту новоутвореної кісткової тканини: у групі Дослід-2 (стерилізація антибіотиком + цисплатин) – 31,64 %. Проте цей показник був значуще меншим порівняно з групою Контроль-1 (58,09 %), де були відсутні обидва негативних чинники (внутрішньоочеревинне введення 0,9 % натрію хлориду + антибіотик). Це був очікувано найкращий результат.

Вміст сполучної тканини виявився найбільшим у групі Дослід-1 – 31,55%. Це може бути зумовлено гострою запальною реакцією, яку викликають оброблені γ -випромінюванням алоімпланти після введення та яка може призвести до їхнього лізису й утворення значної кількості сполучної тканини [30]. Найменший вміст сполучної тканини спостерігали у групі Контроль-2 – 12,79%.

Порівнюючи результати світових досліджень з отриманими в даному дослідженні, можна зробити висновок, що поєднання γ -випромінювання для стерилізації кісткових алотрансплантатів із застосуванням цитостатичного хіміопрепарату (цисплатин) пригнічує регенерацію кістки. Доведено також негативний вплив цитостатиків на процес інкорпорації алотрансплантату (Дослід-1).

Nonetheless, that figure is significantly smaller than the value in the Control-1 group (58.09%), where both of the negative factors were absent. This was, as expected, the best result.

The relative percentage of fibrous tissue was highest in the Experimental-1 group –31.55%. This may be caused by an acute inflammation that occurred after the implantation of gamma radiation treated allografts that may have led to allograft lysis and the formation of large amounts of fibrous tissue [30]. The smallest relative percentage of fibrous tissue was in the Control-2 group – 12.79%.

Comparing the results of past studies with the ones obtained in this work, it can be concluded that combining gamma radiation treated allografts with the post-operative injection of cytostatic agents (cisplatin) leads to reduced bone regeneration. Also proven was the negative impact of cytostatic agents on the incorporation of the allograft (Experimental-1 group).

ВИСНОВКИ

У результаті морфологічного дослідження визначено, що за умов використання для пластики метафізарних дефектів стегнової кістки щурів кісткових алоімплантатів відбувається їх перебудова з утворенням кісткової та сполучної тканини. Проте відносний вміст цих тканин залежить від способу стерилізації алоімплантату і використання цитостатика. Зокрема, найбільший вміст кісткової тканини (58,09%) виявлено у разі застосування стерилізованого антибіотиком алоімплантату без уведення цитостатика, а найменший – у випадку заміщення дефекту алоімплантатом, стерилізованим за допомогою радіаційного γ -випромінювання, на фоні введення цитостатичного препарату.

CONCLUSIONS

As a result of the conducted study, it was determined that when allografts are used to fill defects in the distal femoral metaphysis of rats, allograft remodeling occurs along with the formation of bone and fibrous tissue. However, the relative percentages of those tissues depend on the allograft sterilization method and the use of cytostatic agents. The largest relative percentage of bone tissue (58.09%) was obtained using an allograft saturated with antibiotics and without the administration of cisplatin. The smallest (11.79%), on the other hand, occurred in gamma radiation treated allografts with cisplatin injected intraperitoneally after the operation.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sohn H.S., Oh J.K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials Research*. 2019. Vol. 23. 9 p. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0157-y>
2. Baldwin P., Li D.J., Auston D.A., Mir H.S., Yoon R.S., Koval K.J. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2019. Vol. 33, № 4. P. 203–213. DOI: <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
3. Perez J.R., Jose J., Mohile N.V., Boden A.L., Greif D.N. et al. Limb salvage reconstruction: Radiologic features of common reconstructive techniques and their complications. *Journal of Orthopaedics*. 2020. Vol. 21. P. 183–191. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.03.043>
4. Lesensky J., Prince D.E. Distraction osteogenesis reconstruction of large segmental bone defects after primary tumor resection: pitfalls and benefits. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopedie traumatologie*. 2017. Vol. 27. № 6. P. 715–727. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00590-017-1998-5>
5. Gautam D., Arora N., Gupta S., George J., Malhotra R. Megaprosthesis Versus allograft prosthesis composite for the management of massive skeletal defects: a meta-analysis of comparative studies. *Current reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2021. Vol. 14(3). P. 255–270. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12178-021-09707-6>
6. Reif T., Schoch B., Spiguel A., Elhassan B., Wright T. et al. A retrospective review of revision proximal humeral allograft-prosthetic composite procedures: an analysis of proximal humeral bone stock restoration. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 2020. Vol. 29(7). P. 1353–1358. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jse.2019.10.029>
7. Вырва О.Е., Головина Я.А., Малик Р.В. Аллокомпозитное эндопротезирование при хирургическом лечении пациентов со злока-

REFERENCES

1. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomaterials Research*. 2019;23:9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0157-y>
2. 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. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2019;33(4):203–13. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
3. Perez JR, Jose J, Mohile NV, Boden AL, Greif DN et al. Limb salvage reconstruction: Radiologic features of common reconstructive techniques and their complications. *Journal of Orthopaedics*. 2020;21:183–91. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.03.043>
4. Lesensky J, Prince DE. Distraction osteogenesis reconstruction of large segmental bone defects after primary tumor resection: pitfalls and benefits. *European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopedie traumatologie*. 2017;27(6):715–27. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00590-017-1998-5>
5. Gautam D, Arora N, Gupta S, George J, Malhotra R. Megaprosthesis Versus allograft prosthesis composite for the management of massive skeletal defects: a meta-analysis of comparative studies. *Current reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2021;14(3):255–70. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12178-021-09707-6>
6. Reif T, Schoch B, Spiguel A, Elhassan B, Wright T et al. A retrospective review of revision proximal humeral allograft-prosthetic composite procedures: an analysis of proximal humeral bone stock restoration. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. 2020;29(7):1353–8. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jse.2019.10.029>
7. Vyryva OE, Golovina YaA, Malyk RV. Allocomposite arthroplasty in the surgical treatment of patients with malignant tumors of the long bones.

- чественными опухолями длинных костей. *Ортопедия, травматология, протезирование*. 2015. № 2. С. 120–125. DOI: <https://doi.org/10.15674/0030-598720152120-125>
8. Gharedaghi M., Peivandi M.T., Mazloomi M., Shoorin H.R., Hasani M. et al. Evaluation of clinical results and complications of structural allograft reconstruction after bone tumor surgery. *Arch Bone Joint Surgery*. 2016. Vol. 4(3). P. 236–242. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27517069/>
9. Misaghi A., Goldin A., Awad M., Kulidjian A.A. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J*. 2018. Vol. 4. 12 p. DOI: <https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028>
10. MacDonald D.J., McGuire M.H. Complications with large fragment allografts. Complications of Limb Salvage: Prevention. *Management and Outcom*. 1991. P. 25–27.
11. Aponte-Tinao L.A., Ayerza M.A., Albergo J.I., Farfalli G.L. Do massive allograft reconstructions for tumors of the femur and tibia survive 10 or more years after implantation? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2020. Vol. 478(3). P. 517–524. DOI: <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000806>
12. Hornicek F.J., Gebhardt M.C., Tomford W.W., Sorger J.I., Zavatta M. et al. Factors affecting nonunion of the allograft-host junction. *Clinical Orthopaedics and Related Researc*. 2001. № 382. P. 87–98. DOI: <https://doi.org/10.1097/00003086-200101000-00014>
13. Li J., Chen G., Lu Y., Zhu H., Ji C., Wang Z. Factors influencing osseous union following surgical treatment of bone tumors with use of the Capanna Technique. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*. 2019. Vol. 101(22). P. 2036–2043. DOI: <https://doi.org/10.2106/JBJS.19.00380>
14. Struckmann V., Schmidmaier G., Ferbert T., Kneser U., Kremer T. Reconstruction of extended bone defects using massive allografts combined with surgical angiogenesis: a case report. *JBJS case connector*. 2017. Vol. 7(1). e10 p. DOI: <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.16.00098>
15. Ogink P.T., Teunissen F.R., Massier J.R., Raskin K.A., Schwab J.H. et al. Allograft reconstruction of the humerus: Complications and revision surgery. *Journal of Surgical Oncology*. 2019. Vol. 119(3). P. 329–335. DOI: <https://doi.org/10.1002/jso.25309>
16. Вирва О.Є., Головіна Я.О., Малик Р.В., Головіна О.О. Системний огляд і метааналіз результатів модульного й алокомпонентного ендопротезування за умов кістково-суглобових дефектів після резекції пухлини. *Ортопедія, травматологія і протезування*. 2020. № 2. С. 5–15. DOI: <https://doi.org/10.15674/0030-5987202025-15>
17. Nguyen H., Morgan D.A., Forwood M.R. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell and tissue banking*. 2007. Vol. 8(2). P. 93–105. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10561-006-9020-1>
18. Man W.Y., Monni T., Jenkins R., Roberts P. Post-operative infection with fresh frozen allograft: reported outcomes of a hospital-based bone bank over 14 years. *Cell and tissue banking*. 2016. Vol. 17(2). P. 269–275. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9547-8>
19. Islam A., Chapin K., Moore E., Ford J., Rimnac C., Akkus O. Gamma radiation sterilization reduces the high-cycle fatigue life of allograft bone. *Clinical Orthopaedics and Related Researc*. 2016. Vol. 474(3). P. 827–835. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4589-y>
20. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад. Верховна Рада України. URL: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
21. Про захист тварин від жорстокого поводження: Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. Верховна Рада України. URL: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>
22. Пятаев Н.А., Минаева О.В., Зыряева Н.Н., Кокорев А.В., Гуревич К.Г., Заборовский А.В., Щукин С.А. Эффективность ДНК-конъюгированных форм доксорубина и цисплатина при холангиоцеллюлярной карциноме у крыс. *Фундаментальные исследования*. 2014. № 10–15. С. 959–963.
23. Спосіб виготовлення імплантатного дегідратованого кісткового біоматеріалу алогенного походження: пат. 119699 Україна: МПК А61К 35/32 (2015.01); А61F 2/28 (2006.01); А61P 19/00 (2006.01). № а201709455; заявл. 27.09.2017; опубл. 25.09.2019, Бюл. № 14.
24. Gundle K.R. CORR Insights®: Do massive allograft reconstructions for tumors of the femur and tibia survive 10 or more years after implantation? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2020. Vol. 478(3). P. 525–526. DOI: <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000856>
25. Pendleton M.M., Emerzian S.R., Liu J., Tang S.Y., O'Connell G.D. et al. Effects of ex vivo ionizing radiation on collagen structure and whole-bone mechanical properties of mouse vertebrae. *Bone*. 2019. Vol. 128. 115043 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115043>
26. Young D.R., Virolainen P., Inoue N., Frassica F.J., Chao E.Y. The short-term effects of cisplatin chemotherapy on bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997. Vol. 12(11). P. 1874–1882. DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.11.1874>
27. Stine K.C., Wahl E.C., Liu L., Skinner R.A., Vanderschelden J. et al. Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014. Vol. 32(3). P. 464–470. DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.22527>
- Orthopedics, traumatology, prosthetics*. 2015;2:120–5. (In Russian). DOI: <https://doi.org/10.15674/0030-598720152120-125>
8. Gharedaghi M., Peivandi M.T., Mazloomi M., Shoorin H.R., Hasani M. et al. Evaluation of clinical results and complications of structural allograft reconstruction after bone tumor surgery. *Arch Bone Joint Surgery*. 2016;4(3):236–42. (In English). URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27517069/>
9. Misaghi A., Goldin A., Awad M., Kulidjian A.A. Osteosarcoma: a comprehensive review. *SICOT-J*. 2018;4:12. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1051/sicotj/2017028>
10. MacDonald DJ, McGuire MH. Complications with large fragment allografts. Complications of Limb Salvage: Prevention. *Management and Outcom*. 1991;25–7. (In English).
11. Aponte-Tinao LA, Ayerza MA, Albergo JI, Farfalli GL. Do massive allograft reconstructions for tumors of the femur and tibia survive 10 or more years after implantation? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2020;478(3):517–24. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000806>
12. Hornicek FJ, Gebhardt MC, Tomford WW, Sorger JI, Zavatta M et al. Factors affecting nonunion of the allograft-host junction. *Clinical Orthopaedics and Related Researc*. 2001;382:87–98. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/00003086-200101000-00014>
13. Li J, Chen G, Lu Y, Zhu H, Ji C, Wang Z. Factors influencing osseous union following surgical treatment of bone tumors with use of the Capanna Technique. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*. 2019;101(22):2036–43. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2106/JBJS.19.00380>
14. Struckmann V, Schmidmaier G, Ferbert T, Kneser U, Kremer T. Reconstruction of extended bone defects using massive allografts combined with surgical angiogenesis: a case report. *JBJS case connector*. 2017;7(1):e10. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.16.00098>
15. Ogink PT, Teunissen FR, Massier JR, Raskin KA, Schwab JH et al. Allograft reconstruction of the humerus: Complications and revision surgery. *Journal of Surgical Oncology*. 2019;119(3):329–35. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/jso.25309>
16. Vyrya OE, Golovina Ya. O., Malik RV, Golovina OO System review and meta-analysis of the results of modular and allocomposite endoprosthesis under the conditions of bone and joint defects after tumor resection. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*. 2020;2:5–15. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.15674/0030-5987202025-15>
17. Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell and tissue banking*. 2007;8(2):93–105. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10561-006-9020-1>
18. Man WY, Monni T, Jenkins R, Roberts P. Post-operative infection with fresh frozen allograft: reported outcomes of a hospital-based bone bank over 14 years. *Cell and tissue banking*. 2016;17(2):269–75. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9547-8>
19. Islam A, Chapin K, Moore E, Ford J, Rimnac C, Akkus O. Gamma radiation sterilization reduces the high-cycle fatigue life of allograft bone. *Clinical Orthopaedics and Related Researc*. 2016;474(3):827–35. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11999-015-4589-y>
20. European Convention for the protection of vertebrate animals used for research and other scientific purposes. Strasbourg, 18 March 1986: official translation. Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
21. On protection of animals from cruel treatment: Law of Ukraine № 3447-IV of February 21, 2006. The Verkhovna Rada of Ukraine. (In Ukrainian). URL: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>
22. Pyataev NA, Minaeva OV, Zyrnyaeva NN, Kokorev AV, Gurevich KG, Zaborovsky AV, Shchukin SA. Efficacy of DNA-conjugated forms of doxorubicin and cisplatin in cholangiocellular carcinoma in rats. *Basic research*. 2014;10–15:959–63. (In Russian).
23. A method of manufacturing an implantation dehydrated bone biomaterial of allogeneic origin: US Pat. 119699 Ukraine: IPC A61K 35/32 (2015.01); A61F 2/28 (2006.01); A61P 19/00 (2006.01); declared 27.09.2017; publ. 25/09/2019, Bull. № 14. (In Ukrainian).
24. Gundle KR. CORR Insights®: Do massive allograft reconstructions for tumors of the femur and tibia survive 10 or more years after implantation? *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2020;478(3):525–6. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000000856>
25. Pendleton MM, Emerzian SR, Liu J, Tang SY, O'Connell GD et al. Effects of ex vivo ionizing radiation on collagen structure and whole-bone mechanical properties of mouse vertebrae. *Bone*. 2019;128:115043. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.115043>
26. Young DR, Virolainen P, Inoue N, Frassica FJ, Chao E. YThe short-term effects of cisplatin chemotherapy on bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1997;12(11):1874–82. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.11.1874>
27. Stine KC, Wahl EC, Liu L, Skinner RA, Vanderschelden J et al. Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2014;32(3):464–70. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/jor.22527>

28. Li Z., Meyers C.A., Chang L., Lee S., Tomlinson R. et al. Fracture repair requires TrkA signaling by skeletal sensory nerves. *The Journal of clinical investigation*. 2019. Vol. 129(12). P. 5137–5150. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI128428>
29. Ke B., Shi L., Xu Z., Wu G., Gong Y., Zhu L. et al. Flavored Guilu Erxian decoction inhibits the injury of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by cisplatin. *Cellular and Molecular Biology*. 2018. Vol. 64(6). P. 58–64.
30. Russell N., Oliver R.A., Walsh W.R. The effect of sterilization methods on the osteoconductivity of allograft bone in a critical-sized bilateral tibial defect model in rabbits. *Biomaterial*. 2013. Vol. 34(33). P. 8185–8194. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.022>
28. Li Z, Meyers CA, Chang L, Lee S, Tomlinson R et al. Fracture repair requires TrkA signaling by skeletal sensory nerves. *The Journal of clinical investigation*. 2019;129(12):5137–50. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI128428>
29. Ke B, Shi L, Xu Z, Wu G, Gong Y, Zhu L et al. Flavored Guilu Erxian decoction inhibits the injury of human bone marrow mesenchymal stem cells induced by cisplatin. *Cellular and Molecular Biology*. 2018;64(6):58–64. (In English).
30. Russell N, Oliver RA, Walsh WR. The effect of sterilization methods on the osteoconductivity of allograft bone in a critical-sized bilateral tibial defect model in rabbits. *Biomaterial*. 2013;34(33):8185–94. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.022>

Перспективи подальших досліджень

Продовження вивчення репаративного остеогенезу за умов кісткової алопластики сегментарних дефектів довгих кісток, розробка та удосконалення методик кісткової алопластики.

Prospects for further research

Continuation the study of reparative osteogenesis of bone alloplasty of long bones segmental defects, development and improvement of bone alloplasty methods.

Конфлікт інтересів

Кожен автор засвідчує відсутність фінансової підтримки або комерційного зв'язку з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, що мало б спричинити конфлікт інтересів відносно поданої статті.

Conflict of interest

Each author certifies the absence of funding or commercial associations with pharmaceutical companies, manufacturers of medical devices, or other organisations that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article.

Інформація про фінансування

Фінансування видатками Державного бюджету України.

Funding information

TFinancing by expenditures of the State Budget of Ukraine.

Подяка

Автори вдячні Оксані Майбороді, яка надала технічну підтримку в підготовці алотрансплантатів; Михайлу Івашенку, який редагував рукопис англійською.

Acknowledgments

The authors are grateful to Oksana Maiboroda, who provided technical support in the preparation of the allografts; Mykhaylo Ivashchenko, who proofread the manuscript.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Вирва Олег Євгенович – доктор медичних наук, професор, головний лікар, завідувач відділу кісткової онкології Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: dr.olegvyrva@gmail.com
моб.: +38 (050) 323-04-82

Vyrva Oleg Yevgenovych – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Medical Officer, Head of Bone Tumor Department, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; 80, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: dr.olegvyrva@gmail.com
tel.: +38 (050) 323-04-82

Внесок автора: розроблення дизайну дослідження та критичне корегування остаточного варіанту статті.

Author's contribution: designed the study and made critical revisions to the article.

Головіна Яніна Олександрівна – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник відділу кісткової онкології Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com
моб.: +38 (050) 402-72-43

Holovina Yanina Oleksandrivna – Candidate of Medical Sciences, senior research officer of bone tumor department Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; 80, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: dr.yanina.golovina@gmail.com
tel.: +38 (050) 402-72-43.

Внесок автора: розроблення дизайну дослідження, планування та виконання експериментів на тваринах.

Author's contribution: designed the study; planned and carried out the experiments.

Ашукіна Наталія Олександрівна – кандидат біологічних наук, завідувачка лабораторії морфології сполучної тканини Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;
e-mail: nataliya.ashukina@gmail.com
моб.: +38 (067) 508-38-79

Ashukina Nataliya Oleksandrivna – Candidate of Biological Sciences, Head of The Laboratory of Connective Tissue Morphology, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; 80, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;
e-mail: nataliya.ashukina@gmail.com
tel.: +38 (067) 508-38-79

Внесок автора: виконання гістологічного аналізу та інтерпретація отриманих результатів; написання першого варіанту рукопису.

Author's contribution: performed the histological analysis and interpreted the data; wrote the first draft of manuscript.

Малик Роман Васильович – кандидат медичних наук, асистент кафедри травматології та ортопедії Харківської медичної академії післядипломної освіти Міністерства охорони здоров'я України; вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: dr.roman.malyk@gmail.com
моб.: +38 (050) 515-05-50

Внесок автора: планування та виконання експериментів на тваринах.

Данишук Зінаїда Миколаївна – науковий співробітник лабораторії морфології сполучної тканини Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І. Ситенка Національної академії медичних наук України»; вул. Пушкінська, буд. 80, м. Харків, Україна, 61024;

e-mail: zinada1962@gmail.com
моб.: +38 (099) 935-42-57

Внесок автора: виконання гістоморфометрії та інтерпретація отриманих результатів.

Malyk Roman Vasylyovych – Candidate of Medical Sciences, Assistant of Orthopaedics, Traumatology Department, Kharkov Medical Academy of Postgraduate Education of the Ministry of Health of Ukraine; 80, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;

e-mail: dr.roman.malyk@gmail.com
tel.: ++38 (050) 515-05-50

Author's contribution: carried out the experiments.

Danyshchuk Zinaida Mykolayvna – Researcher of The Laboratory of Connective Tissue Morphology, Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine; 80, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024;

e-mail: zinada1962@gmail.com
tel.: +38 (099) 935-42-57

Author's contribution: performed the histomorphometry and interpreted the data.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
21.09.2021

Отримано після рецензування
Received after review
28.09.2021

Прийнято до друку
Accepted for printing
29.09.2021

Опубліковано
Published
29.09.2021