

Original researches

Influence of humic substances on physiological osteogenesis and the blood system of rabbits while using PLA implants

Received: 26 September 2020
Revised: 04 November 2020
Accepted: 25 November 2020

Dnipro State Agrarian and Economic University, S. Efreimov St. 25, 49600, Dnipro, Ukraine

Tel.: +38-050-642-80-81
E-mail: rubalka.mihail@gmail.com

Cite this article: Rybalka, M. A., Stepchenko, L. M., Galuzina, L. I., & Krutous, D. I. (2020). Influence of humic substances on physiological osteogenesis and the blood system of rabbits while using PLA implants. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(4), 269–275. doi: 10.32819/2020.84040

M. A. Rybalka, L. M. Stepchenko, L. I. Galuzina, D. I. Krutous
Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Abstract. PLA-based implants are characterized by high biocompatibility with body tissues, and are also distinguished by their biodegradable and osseointegrative properties. The regulation of bone tissue growth and development is inextricably linked with the blood system, which is a source of plastic substances and hormones of calcium homeostasis. When PLA implants were inserted into the parietal bone of rabbits, changes occurred in their bodies that were typical for the period after orthopedic and traumatological operations. Metabolism dysregulation of macro- and microelements and disturbances of erythropoiesis, which can occur in the postoperative period, have a negative effect on the bone tissue growth in the young rabbits' body. It has been proven that humic substances were able to influence the activity of osteoblasts and regulate mineral metabolism. For the experiment, 32 rabbits were divided into four groups, 8 rabbits in each group; sixteen rabbits underwent surgery using PLA implants, which were placed bilaterally in the parietal bone. Eight of the 16 operated rabbits were given Humilid together with water, the rest of them received pure water. Eight of 16 rabbits, intact before surgery, received Humilid together with water, the non-surgical control group did not receive Humilid. The influence of humic substances on physiological osteogenesis and hematological parameters during the use of PLA implants was determined. On the 14th day of the experiment, the rabbits of the surgical group receiving Humilid did not show a decrease in erythrocytes, hemoglobin, and an increase in leukocytes, in contrast to the rabbits of the surgical control group. An increase in the number of osteons and osteoblasts layers was recorded in the femur of the young rabbits that were receiving Humilid, and in the sternum – the number of osteons and layers of osteoblasts. There was also an increase in the number of erythrocytes and hemoglobin in the non-surgical group rabbits that were receiving Humilid to compare the rabbits of the non-surgical control group. In rabbits that received Humilid, there was an intensification of bone tissue growth against the background of physiological and reparative osteogenesis.

Keywords: humic substances; feed additive; biopolymers; bone tissue; hematological parameters; adaptogen; rabbit; Humilid

Вплив гумінових речовин на фізіологічний остеогенез та кровотворну систему кроленят на тлі застосування PLA імплантатів

М. А. Рибалка, Л. М. Степченко, Л. І. Галузіна, Д. І. Крутоус
Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Аноація. Імплантати на основі PLA характеризуються високою біосумісністю із тканинами організму, вирізняються своїми біодеградаційними та остеointегративними властивостями. Регуляція росту та розвитку кісткової тканини нерозривно пов'язана із системою крові – джерелом пластичних речовин і гормонів кальцієвого гомеостазу. У разі вживлення PLA імплантатів у тім'яну кістку кроленят в їх організмі відбуваються зміни, характерні для періоду після ортопедо-травматологічних операцій. Дисрегуляція обміну макро- мікроелементів і порушення еритроцитопоезу, що можуть виникати у післяопераційний період, завдають негативного впливу на ріст кісткової тканини в організмі кроленят. Доведено, що гумінові речовини здатні впливати на активність остеобластів і регулювати мінеральний обмін. Для досліджу 32 кроленят розподілено на чотири групи по 8 у кожній; 16 кролятам здійснювали операцію щодо застосування PLA імплантатів, які розміщували у тім'яній кістці білатерально. Вісьмом із 16 прооперованих давали гумілід разом із водою, решта отримували чисту воду. Вісім із 16 кроленят, інтактних до операції, отримували гумілід разом із водою, група безопераційного контролю гумілід не отримувала. Визначено вплив гумінових речовин на фізіологічний остеогенез і гематологічні показники на тлі застосування PLA імплантатів. На 14-ту добу досліджу у кроленят безопераційної групи, які отримували гумілід, не відмічено зниження еритроцитів, гемоглобіну та збільшення лейкоцитів, на відміну від кроленят операційної контрольної групи. У стегновій кістці кроленят, що отримували гумілід, зафіксовано збільшення кількості шарів остеонів та остеобластів, а в грудній кістці – кількості остеонів і шарів остеобластів. У кроленят безопераційної групи, які отримували гумілід, спостерігається збільшення кількості еритроцитів та рівня гемоглобіну, у кроленят безопераційної контрольної групи, які отримували гумілід, наявна корекція гематологічних показників. У тварин, які отримували гумілід, відмічено інтенсифікацію росту кісткової тканини на тлі фізіологічного та репаративного остеогенезу.

Ключові слова: гумінові речовини; кормова добавка; кролі; біополімери; кісткова тканина; гематологічні показники; адаптоген; кормова добавка; гумілід

Вступ

Зв'язок гематологічних показників із репаративним остеогенезом зумовлює необхідність сумісного дослідження гематологічних показників і гістологічних параметрів кісткової тканини.

Імпланти, створені на основі PLA, безпечні для організму людей та тварин (Da Silva et al., 2018; Esposito Corcione et al., 2017). Одна з переваг PLA імплантів – їх здатність до біодеградації (Prakasam et al., 2017). Окрему увагу цей матеріал привертає своєю можливістю використовуватись у 3D-принтингу, що дозволяє створювати імпланти різної структури та розмірів (Gregor et al., 2017).

У післяопераційний період після вживлення імплантів у кісткову тканину в організмі кролів розвивається еволюційно вироблений каскад захисно-приспосовувальних реакцій. Зокрема, відбувається реалізація запальних та імунних процесів, які нерозривно пов'язані з репаративним остеогенезом (Kozlovsky et al., 2007).

Окреме питання в біоінженерії кісткової тканини пов'язане з корекцією запального процесу (Kozlovsky et al., 2007; O'Keefe & Mao, 2011). Важливість корекції запального процесу на тлі відновлення кісткової тканини зумовлюється складною взаємодією клітин, що індукують запальні процеси, з клітинами, які забезпечують репарацію кісткової тканини (Loi et al., 2016).

Враховуючи вплив запальних процесів на регенерацію кісткової тканини, науковці розвивають нові терапевтичні методи лікування переломів, остеопору та методи поліпшення остеоінтеграції імплантів. Вплив на репараційний остеогенез можливий у двох основних напрямках: анаболічному та антирезорбтивному (Hedström et al., 2002; Brunner et al., 2009). Зокрема, використання 1–34-го фрагмента ПТГ зумовлює збільшення маси кісткової тканини, а використання біфосфонатів викликає зменшення її резорбції (Apostu et al., 2017).

Корекція стану імунної системи – ще один актуальний напрям поліпшення остеоінтеграції імплантів. Зокрема, запроваджується виготовлення імплантів із синтетичними пептидами (FTY720), які є агоністами сфінгозин-1-фосфату (Das et al., 2013).

Відомо що гумінові речовини володіють протизапальними та антиоксидантними властивостями, а також здатні впливати на ріст та розвиток органів імунопоезу (Stepchenko et al., 2008; Jansen van Rensburg & Naude, 2009; Kushch et al., 2012; Chien et al., 2015; Dyomshina et al., 2017; Rusliandi et al., 2020). Окрему увагу привертає здатність гумінових речовин збільшувати активність остеобластів та вміст кальцію у кістковій тканині (Jung, et al., 2002; Çalıřır et al., 2015; Rybalka, et al., 2020). Можливість гумінових речовин проявляти протизапальні властивості у сукупності із здатністю збільшувати активність остеобластів зумовлює їх комплексну дію на кісткову тканину у разі застосування PLA імплантів. Один із представників цих добавок – гумілід, котрий вирізняється своєю низькою токсичністю та біобезпечністю. Відомо, що гумілід володіє системним впливом на кісткову тканину за фізіологічного остеогенезу, а також системним впливом на кісткову тканину у місці вживлення імплантата на тлі репаративного остеогенезу (Rybalka, & Stepchenko, 2020; Rybalka et al., 2020). Однак питання щодо можливості впливу гуміліду на кісткову тканину поза місцем вживлення імплантів ще не з'ясоване.

Тож мета нашої роботи – визначити вплив гумінових речовин на фізіологічний остеогенез та гематологічні показники крові на тлі застосування PLA імплантів.

Матеріал і методи досліджень

Експеримент виконували на кролятах породи фландр на базі приватного домашнього господарства. Маніпуляції з твари-

нами здійснювали відповідно до документів, що регламентують організацію робіт і дотримання принципів Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (м. Страсбург, 1985 р.). Операційні втручання проводили на базі приватної ветеринарної лікарні. Під час операційного втручання керувались рекомендаціями PolLASA (Polish Laboratory Animal Science Association). Методика проаналізована та схвалена локальним етичним комітетом Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Для проведення досліду 32 кроляток 80-добового віку породи фландр розподілено на чотири групи. До першої входили інтактні тварини, вона була безопераційною контрольною (табл. 1). До другої групи відбирали кроляток, яким давали гумілід (безопераційна група). Кроляток третьої групи належали до операційної контрольної групи, на них була здійснена операція. Тварини четвертої групи після операції протягом досліду отримували гумілід. Кроляткам другої та четвертої групи давали гумілід із водою у дозі 5 мг діючої речовини на 1 кг маси тіла протягом 30 днів. Тварини усіх груп отримували чисту воду в однакових кількостях.

Перед проведенням досліду кроляток утримували у підготовчому періоді, який тривав 15 днів. Всі дослідні групи кроляток перебували в однакових умовах годівлі та утримання під час досліду.

Для застосування PLA імплантів кроляткам операційних груп проведено хірургічну операцію щодо створення білатерального дефекту тім'яної кістки (Rybalka, & Stepchenko, 2020). Відбір крові у кроляток проводили на першу, третю, 14- та 30-ту добу дослідження. Кров відбирали зранку натщесерце з v. Saphena lateralis.

Підрахунок кількості еритроцитів та лейкоцитів був здійснений в камері Горяєва. Вміст гемоглобіну визначали гемоглобінціанідним методом з ацетонціангідринном. Швидкість осідання еритроцитів визначали методом Панченкова, гематокрит – центрифужним методом. Підрахунок лейкоформули здійснено в мазках, забарвлених фарбами Лейкодіф 200 (LDF 200).

Для виготовлення гістопрепаратів відбирали діафізарну частину стегнової кістки та окремі сегменти грудної кістки. Відібраний матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах зростаючої міцності та декальцинували. Після цього виготовляли гістологічні зрізи. Забарвлювали гістозрізи гематоксиліном та еозином. Для кількісного аналізу мікроструктурних компонентів проводили підрахунок кількості остеонів та шарів остеобластів у грудній кістці, а також кількість шарів остевів та остеобластів у стегновій.

Отримані результати обробляли статистично за допомогою пакета прикладних програм Statistica (версія 12, StatSoft, USA). Для визначення сумісного та незалежного впливу біологічно активної кормової добавки та операції на гематологічні показники крові та кісткову тканину кроляток використовували двухфакторний дисперсійний аналіз. Апостеріорні порівняння груп виконували за допомогою поправки Бонферроні. Відмінності вважали достовірними за $P < 0,05$. У таблицях дані наведені у вигляді середніх значень та їх стандартних похибок ($\bar{x} \pm SD$).

Таблиця 1 – Схема досліду

Впливові фактори	1	2	3	4
Гумілід	–	+	–	+
Операція	–	–	+	+

Примітка: 1 – безопераційна контрольна група, 2 – безопераційна група, що отримували гумілід, 3 – операційна контрольна група, 4 – операційна група, яка отримувала гумілід.

Результати

Наприкінці досліду в стегновій кістці кроленят відмічається вплив фактора гуміліду на кількість шарів остеонів ($P < 0,01$) за результатами гістологічного дослідження. При цьому у стегновій кістці кроленят другої групи за результатами апостеріорних порівнянь відмічено збільшення кількості шарів остеонів на 10,8% ($P < 0,01$) та у кроленят третьої групи, що отримувала гумілід, – на 6,9% ($P < 0,05$) порівняно з відповідними показниками кроленят першої групи (рис. 1).

У стегновій кістці кроленят на кількість шарів остеобластів впливав фактор гуміліду ($P < 0,001$). Відмічено збільшення кількості шарів остеобластів у стегновій кістці тварин другої групи на 20,6% ($P < 0,001$) та на 14,7% ($P < 0,01$) в особин четвертої групи порівняно з першою групою (рис. 2).

У грудній кістці кроленят відмічено вплив гуміліду ($P < 0,001$) на кількість остеонів. На 18% ($P < 0,001$) більшою була кількість остеонів у грудній кістці тварин другої групи та на 12% ($P < 0,01$) у кроленят четвертої групи порівняно з першою (рис. 3).

За нашими даними, існує вплив гуміліду на кількість остеобластів у грудній кістці кроленят ($P < 0,001$). У грудній кістці тварин другої та четвертої групи більша кількість шарів остеобластів на 21,2% ($P < 0,001$) та 18,8% ($P < 0,05$) відповідно, порівняно з першою групою (рис. 4).

Отже, відмічається збільшення кількості шарів остеонів та остеобластів у стегновій кістці, а також збільшення кількості остеонів та шарів остеобластів у грудній кістці кроленят, що отримували гумілід як в операційній, так і в безопераційній групі. Збільшення даних гістологічних параметрів говорить про інтенсифікацію росту кісткової тканини, як трубчастих, так

і губчастих кісток у тварин, які отримували гумілід.

Із третьої доби досліду на кількість еритроцитів (операція, $P < 0,001$), рівень гемоглобіну (операція, $P < 0,001$) та гематокриту (операція, $P < 0,001$) впливав фактор операційного втручання. Рівень цих показників у кроленят операційних груп достовірно нижчий, порівняно з інтактними кроленятами, за результатами апостеріорних порівнянь (табл. 2).

Відмічено вплив операції на рівень ШОЕ (операція, $P < 0,001$), кількість лейкоцитів (операція, $P < 0,001$), кількість сегментоядерних нейтрофілів (операція, $P < 0,001$), а також динаміку щодо збільшення цих показників у кроленят третьої та четвертої груп порівняно з тваринами першої та другої.

Отже, на третю добу досліду у кроленят, яким здійснювали оперативне втручання, зареєстровано збільшення рівня ШОЕ, лейкоцитів, сегментоядерних нейтрофілів та зниження рівня еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту.

На 14-ту добу дослідження відмічено вплив фактора операції та фактора гуміліду на рівень еритроцитів (операція, $P < 0,001$, гумілід $P < 0,001$). За результатами апостеріорних порівнянь зафіксовано збільшення кількості еритроцитів у кроленят другої групи на 15,84% ($P < 0,01$) порівняно з першою. У тварин третьої групи кількість еритроцитів була нижчою на 13,29% ($P < 0,05$) порівняно з першою.

На рівень гемоглобіну (операція, $P < 0,001$, гумілід $P < 0,001$) впливав фактор операції та гуміліду на 14-ту добу досліду. У кроленят другої групи рівень гемоглобіну був вищим на 12,88% ($P < 0,01$), а у третьої – нижчим на 10,61% ($P < 0,05$) порівняно із тваринами першої групи. Рівень гемоглобіну був вищим в особин четвертої групи на 10,17% ($P < 0,05$) порівняно із кроленятами першої.

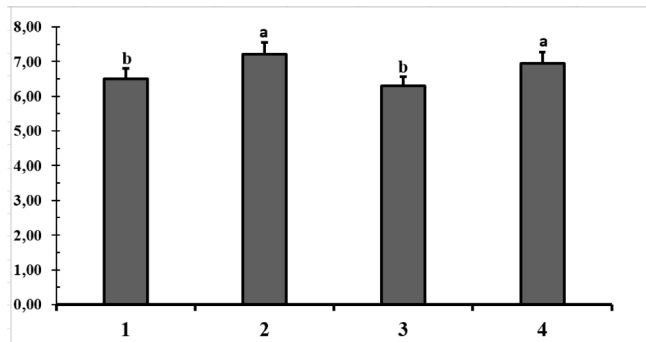


Рис. 1. Кількість шарів остеонів у стегновій кістці кроленят за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи на тлі імплантації PLA імплантатів ($x \pm SD$, $n = 8$)

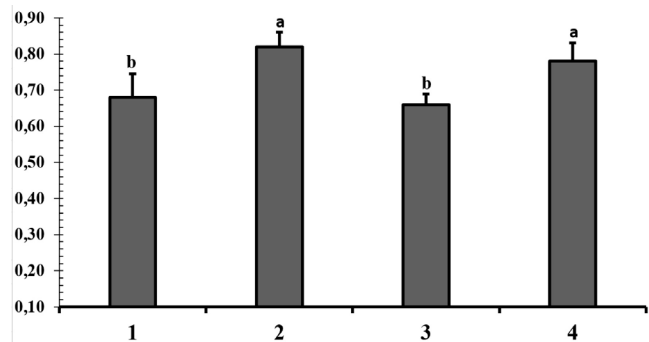


Рис. 2. Кількість шарів остеобластів у стегновій кістці кроленят за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи на тлі імплантації PLA імплантатів ($x \pm SD$, $n = 8$)

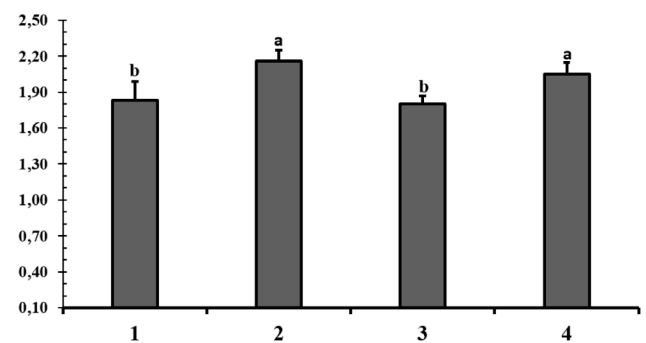


Рис. 3. Кількість шарів остеонів у грудній кістці кроленят за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи на тлі імплантації PLA імплантатів ($x \pm SD$, $n = 8$)

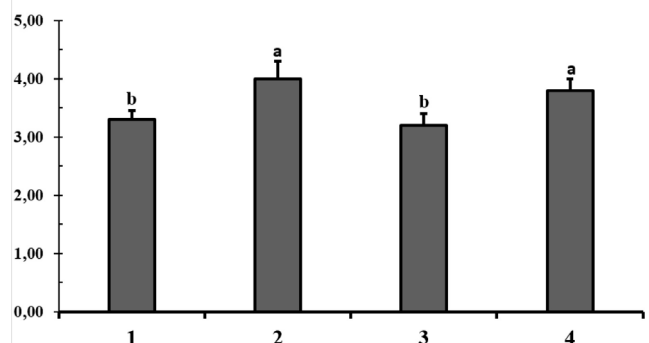


Рис. 4. Кількість шарів остеобластів у грудній кістці кроленят за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи на тлі імплантації PLA імплантатів ($x \pm SD$, $n = 8$)

Таблиця 2 – Вплив препарату «Гумілід» на гематологічні показники кролів на тлі застосування PLA імплантата ($x \pm SD$, $n = 8$, тривалість досліджу 30 діб)

Доба проведення досліджу	Параметри	1	2	3	4
До	Еритроцити, $10^{12}/л$	$5,81 \pm 0,42^a$	$5,74 \pm 0,36^a$	$5,86 \pm 0,30^a$	$5,90 \pm 0,71^a$
	Гемоглобін, г/л	$137,0 \pm 8,0^a$	$138,0 \pm 5,0^a$	$135,0 \pm 6,0^a$	$139,0 \pm 5,0^a$
	Гематокрит, %	$39,2 \pm 1,6^a$	$40,9 \pm 1,2^a$	$41,5 \pm 2,4^a$	$38,5 \pm 2,9^a$
	ШОЕ, мм/год.	$2,49 \pm 0,45^a$	$2,94 \pm 0,51^a$	$2,57 \pm 0,38^a$	$2,69 \pm 0,25^a$
	Лейкоцити, $10^9/л$	$7,95 \pm 0,29^a$	$7,82 \pm 0,48^a$	$7,93 \pm 0,53^a$	$8,15 \pm 0,45^a$
	Базофіли, $10^9/л$	$1,0 \pm 0,9^a$	$1,0 \pm 0,7^a$	$1,3 \pm 0,22^a$	$1,5 \pm 0,14^a$
	Еозинофіли, %	$2,0 \pm 0,6^a$	$1,5 \pm 0,6^a$	$1,2 \pm 0,2^a$	$1,0 \pm 0,4^a$
	Паличкоядерні, %	$3,4 \pm 0,25^a$	$2,95 \pm 0,24^a$	$5,0 \pm 0,45^a$	$4,0 \pm 0,33^a$
	Сегментоядерні, %	$34,3 \pm 3,4^a$	$37,0 \pm 2,98^a$	$33,3 \pm 2,57^a$	$37,4 \pm 2,91^a$
	Лімфоцити, %	$57,0 \pm 3,55^a$	$55,1 \pm 4,7^a$	$57,5 \pm 2,13^a$	$53,5 \pm 4,55^a$
Моноцити, %	$2,3 \pm 0,47^a$	$2,5 \pm 0,29^a$	$3,0 \pm 0,15^a$	$2,6 \pm 0,25^a$	
3	Еритроцити, $10^{12}/л$	$5,69 \pm 0,23^a$	$6,0 \pm 0,25^a$	$4,82 \pm 0,73^b$	$4,94 \pm 0,31^b$
	Гемоглобін, г/л	$135,0 \pm 12^a$	$141,0 \pm 21,0^a$	$107,0 \pm 4,0^b$	$109,0 \pm 7,0^b$
	Гематокрит, %	$38,5 \pm 3,1^a$	$42,4 \pm 4,1^a$	$30,4 \pm 3,3^b$	$32,4 \pm 2,2^b$
	ШОЕ, мм/год.	$3,49 \pm 0,55^b$	$3,75 \pm 0,93^b$	$15,95 \pm 2,12^a$	$17,85 \pm 1,22^a$
	Лейкоцити, $10^9/л$	$7,39 \pm 0,59^b$	$7,11 \pm 0,50^b$	$9,40 \pm 1,40^a$	$9,80 \pm 1,93^a$
	Базофіли, $10^9/л$	$1,6 \pm 0,35^a$	$1,5 \pm 0,21^a$	$1,0 \pm 0,40^a$	$1,9 \pm 0,52^a$
	Еозинофіли, %	$1,67 \pm 0,32^a$	$1,40 \pm 0,42^a$	$1,60 \pm 0,39^a$	$2,20 \pm 0,38^a$
	Паличкоядерні, %	$4,6 \pm 0,6^a$	$3,3 \pm 1,4^a$	$3,15 \pm 1,9^a$	$3,55 \pm 0,6^a$
	Сегментоядерні, %	$34,95 \pm 3,12^a$	$33,63 \pm 2,41^a$	$48,20 \pm 3,5^b$	$47,4 \pm 2,10^b$
	Лімфоцити, %	$57,0 \pm 3,8^a$	$58,2 \pm 2,5^a$	$43,65 \pm 3,16^a$	$42,15 \pm 4,10^a$
Моноцити, %	$1,8 \pm 0,60^a$	$2,0 \pm 0,35^a$	$2,4 \pm 0,27^a$	$2,8 \pm 0,41^a$	
14	Еритроцити, $10^{12}/л$	$5,87 \pm 0,25^b$	$6,80 \pm 0,33^a$	$5,09 \pm 0,70^c$	$5,69 \pm 0,43^{bc}$
	Гемоглобін, г/л	$132,0 \pm 6,0^b$	$149,0 \pm 7,0^a$	$118,0 \pm 11,0^c$	$130,0 \pm 8,0^b$
	Гематокрит, %	$39,1 \pm 3,1^a$	$42,4 \pm 5,1^a$	$35,4 \pm 3,91^a$	$37,1 \pm 3,41^a$
	ШОЕ, мм/год.	$2,31 \pm 0,72^a$	$2,75 \pm 0,95^a$	$6,14 \pm 1,39^b$	$5,15 \pm 1,00^b$
	Лейкоцити, $10^9/л$	$6,45 \pm 0,61^b$	$6,11 \pm 0,50^b$	$7,81 \pm 1,22^a$	$6,87 \pm 0,34^{ab}$
	Базофіли, $10^9/л$	$1,49 \pm 3,1$	$1,55 \pm 0,3$	$1,21 \pm 0,40$	$1,64 \pm 0,52$
	Еозинофіли, %	$1,43 \pm 0,25^a$	$1,40 \pm 0,42^a$	$1,50 \pm 0,30^a$	$2,10 \pm 0,33^a$
	Паличкоядерні, %	$4,37 \pm 0,7^a$	$3,02 \pm 0,6^a$	$10,30 \pm 1,6^a$	$6,36 \pm 0,9^a$
	Сегментоядерні, %	$34,5 \pm 1,1^b$	$34,9 \pm 3,9^{ab}$	$39,3 \pm 2,4^a$	$38,6 \pm 2,1^a$
	Лімфоцити, %	$55,81 \pm 3,8^a$	$57,0 \pm 8,5^a$	$45,6 \pm 5,16^a$	$48,5 \pm 4,10^a$
Моноцити, %	$2,4 \pm 0,60^a$	$2,13 \pm 0,35^a$	$2,1 \pm 0,27^a$	$2,8 \pm 0,41^a$	
30	Еритроцити, $10^{12}/л$	$5,75 \pm 0,53^b$	$6,95 \pm 0,98^a$	$5,61 \pm 0,50^b$	$5,84 \pm 0,45^b$
	Гемоглобін, г/л	$136,0 \pm 8,0^b$	$155,0 \pm 7,0^a$	$131,0 \pm 6,0^b$	$140,0 \pm 9,0^b$
	Гематокрит, %	$38,7 \pm 3,4^a$	$40,7 \pm 5,2^a$	$33,5 \pm 3,1^a$	$35,9 \pm 2,7^a$
	ШОЕ, мм/год.	$2,81 \pm 0,52^a$	$2,71 \pm 0,34^a$	$2,45 \pm 0,61^a$	$2,64 \pm 0,45^a$
	Лейкоцити, $10^9/л$	$7,45 \pm 0,61^a$	$7,87 \pm 0,90^a$	$8,0 \pm 0,76^a$	$7,2 \pm 0,32^a$
	Базофіли, $10^9/л$	$1,80 \pm 0,65^a$	$1,57 \pm 0,31^a$	$0,80 \pm 0,41^a$	$1,20 \pm 0,11^a$
	Еозинофіли, %	$1,4 \pm 0,2^a$	$1,0 \pm 0,15^a$	$1,0 \pm 0,2^a$	$1,5 \pm 0,3^a$
	Паличкоядерні, %	$3,3 \pm 0,7^a$	$3,7 \pm 0,4^a$	$4,3 \pm 0,6^a$	$5,04 \pm 0,9^a$
	Сегментоядерні, %	$34,74 \pm 4,2^a$	$35,2 \pm 2,1^a$	$38,7 \pm 3,9^a$	$37,5 \pm 3,3^a$
	Лімфоцити, %	$56,2 \pm 5,1^a$	$56,3 \pm 4,8^a$	$53,4 \pm 4,1^a$	$52,8 \pm 3,6^a$
Моноцити, %	$2,6 \pm 0,61^a$	$2,2 \pm 0,25^a$	$1,8 \pm 0,43^a$	$2,0 \pm 0,15^a$	

Примітки: різні літери позначають значення, які достовірно відрізняються між собою у межах одного рядка за результатами двофакторного дисперсійного аналізу з урахуванням поправки Бонферроні. Відмінності вважали достовірними за $P < 0,05$. Назви груп – див. таблицю 1.

За нашим дослідженням на 14-ту добу досліду на рівень ШОЕ (операція, $P < 0,001$) впливав фактор операції. Відмічалась загальна динаміка щодо збільшення рівня ШОЕ у кролеят третьої ($P < 0,001$) та четвертої групи ($P < 0,001$) порівняно із тваринами першої групи.

За дослідженням кількості лейкоцитів (операція, $P < 0,001$, гумілід $P < 0,05$) на 14-ту добу відмічено вплив факторів операції та гуміліду. Кількість лейкоцитів у кролеят третьої групи була вищою порівняно із кролеятами першої на 29,09% ($P < 0,01$).

На 14-ту добу дослідження відмічено вплив фактора операції на кількість сегментоядерних нейтрофілів ($P < 0,001$); збільшення їх кількості у кролеят третьої ($P < 0,01$) та четвертої груп ($P < 0,05$) порівняно з першою групою.

Також на 14-ту добу досліду відмічається збільшення кількості еритроцитів та рівня гемоглобіну у кролеят другої групи порівняно з першою. У тварин четвертої групи, на відміну від кролеят третьої, не зареєстровано достовірного зниження кількості еритроцитів та рівня гемоглобіну, а також достовірного підвищення кількості лейкоцитів порівняно з кролеятами третьої групи. Відмічено збільшення рівня гемоглобіну у кролеят четвертої групи порівняно з третьою.

На 30-ту добу досліду на кількість еритроцитів (операція, $P < 0,05$, гумілід, $P < 0,01$) впливав фактор операції та фактор наявності гуміліду. Кількість еритроцитів у кролеят безопераційної групи яка отримувала гумілід (другої групи), була вищою порівняно із тваринами безопераційної контрольної групи (першої групи) на 20,87% ($P < 0,01$).

На рівень гемоглобіну (операція, $P < 0,05$, гумілід, $P < 0,01$) впливав фактор операції та фактор наявності гуміліду на 30-ту добу дослідження. Рівень гемоглобіну був на 14% ($P < 0,01$) вищим у кролеят другої групи порівняно з першою.

Тож на 30-ту добу досліду відмічається збільшення кількості еритроцитів та гемоглобіну у кролеят другої групи порівняно з першою.

Обговорення

За результатами двофакторного дисперсійного аналізу на гістологічні параметри кісткової тканини достовірного впливу фактора операції не відмічено, що говорить про жорсткість констант фізіологічного остеогенезу. Вплив гуміліду на ріст кісткової тканини був меншим у кролеят у післяопераційний період, що, можливо, пояснюється дією гормону кортизолу, який зазвичай превалює у перші дні після операційного втручання. У кролеят безопераційної групи, що отримувала гумілід, відмічено збільшення кількості шарів остеонів та остеобластів у стегнової та збільшення кількості остеонів та шарів остеобластів у грудній кістці, що узгоджується з даними наших минулих досліджень (Rybalka, et al., 2020). Вищенаведені зміни говорять про системний вплив гумінових речовин на ріст кісткової тканини в нормі та на тлі репаративного остеогенезу.

У наших минулих працях зазначено системний вплив гуміліду на кісткову тканину за фізіологічного остеогенезу (Rybalka et al., 2020). Також доведено поліпшення остеointегративних властивостей PLA імплантатів на тлі репаративного остеогенезу, що також пояснюється системною дією гумінових речовин (Rybalka & Stepchenko, 2020). На тлі репаративного остеогенезу збільшується постачання кальцію до пошкодженої ділянки кісткової тканини на шкоду його надходження до інших кісток, що спричинює зменшення їх міцності (Haffner-Luntzer et al., 2016). У літературних джерелах відмічено здатність гумінових речовин впливати на перерозподіл макро- та мікроелементів у кістковій тканині, а також впливати на її ріст за фізіологічного та репаративного остеогенезу (Schepetkin et al., 2002; Çalışır et al., 2015; Rybalka & Stepchenko, 2020).

Для фізіологічного розвитку кісткової тканин їй необхідне забезпечення пластичними речовинами, а також надходження

гормонів кальційфосфорного обміну, що відбувається за допомогою кровоносної системи. За репаративного остеогенезу важливе місце має постачання макро- та мікроелементів до кісткової тканини, що також здійснюється за рахунок кровоносної системи. Недостатнє забезпечення організму кальцієм та вітаміном D, на тлі репаративного остеогенезу, зумовлює його мобілізацію з кісткової тканини, що збільшує ризики переломів (Haffner-Luntzer et al., 2016). Тож за для повної картини вивчення фізіологічного та репаративного остеогенезу дослідження кровоносної системи вкрай важливе.

Після вживлення імплантатів у кісткову тканину кролеят розвивається каскад захисно-приспосувальних реакцій як у кістковій тканині, так і в кровоносній системі, що викликає зміни гематологічних параметрів. Зокрема, в перші дні після операційного періоду збільшується кількість лейкоцитів, ШОЕ, знижується кількість еритроцитів, гемоглобіну та гематокриту. Корекція вищенаведених гематологічних параметрів дуже важлива для подальшого росту та розвитку організму кролеят.

Післяопераційний період у кролеят, на яких здійснено оперативне втручання, супроводжувався зниженням кількості еритроцитів, що пояснюється як захисно-приспосувальна реакція організму на кісткову травму. Кількість еритроцитів у кролеят операційної групи, що отримували гумілід, уже на 14-ту добу досліду достовірно не відрізнялась від контрольної безопераційної групи. Закономірним наслідком зниження кількості еритроцитів стало зниження гематокриту, що спостерігалось у тварин операційних груп до 14-ї добу досліду. Ми відмітили тенденцію до збільшення кількості еритроцитів у безопераційній групі кролеят, які отримували гумілід, починаючи з 14-ї доби випоювання біологічно активної добавки. На 30-ту добу досліду кількість еритроцитів у кролеят, що отримували гумілід, продовжувала збільшуватись. Така динаміка показників говорить про здатність гумінових речовин здійснювати коригувальний вплив на кількість еритроцитів та рівень гематокриту як в умовах нормального фізіологічного стану, так і на тлі операційного втручання.

У літературних джерелах наявна велика кількість повідомлень щодо здатності гумінових речовин впливати на еритроцитопоез (Terratol, 2002; Islam et al., 2005; Yefimov, 2017). Вплив гумінових речовин на кількість еритроцитів може бути зумовлений пришвидшенням їх оновлення у червоному кістковому мозку (Skorik, 2009). Іншим можливим механізмом впливу гумінових речовин на еритроцитопоез бачиться зменшення еритродієрезу за рахунок зниження у крові вільних радикалів. Механізм зниження вільних радикалів зумовлений наявністю у структурі гумінових речовин фенольних груп (Aeschbacher et al., 2012).

У кролеят операційних груп наявна загальна динаміка щодо зниження рівня гемоглобіну, яка відповідала зниженню кількості еритроцитів. На 14-ту добу досліду у тварин операційної групи, що отримувала гумілід, рівень гемоглобіну достовірно не відрізнявся порівняно з кролеятами безопераційної контрольної групи. Динаміка щодо підтримання сталого рівня гемоглобіну не відмічалась у операційній контрольній групі. У кролеят безопераційної групи, які отримували гумілід, рівень гемоглобіну достовірно не відрізнявся порівняно з особинами безопераційної контрольної групи як на 14-ту, так і на 30-ту добу досліду.

Вищенаведені дані говорять про здатність гумінових речовин впливати на синтез гемоглобіну як в умовах імплантації PLA імплантатів, так і в умовах нормального фізіологічного стану. Вплив гумінових кислот на синтез гемоглобіну пояснюється їх хелатувальними властивостями, за рахунок яких відбувається збільшення надходження пулу заліза у кров із кишечника. Збільшення синтезу гемоглобіну на тлі застосування гумінових речовин неодноразово доведена на великій кількості видів тварин (Trckova et al., 2005; Stepchenko, L. M., 2008; Ipek et al., 2008).

Треба наголосити про зменшення впливу фактора операції

на кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну протягом досліджу, що пояснюється відновленням гомеостазу після оперативного втручання, з одного боку, та дією гумінових речовин – з іншого.

Збільшення кількості лейкоцитів у кроленят операційних груп було наявне на третю добу досліджу. Але починаючи з 14-ї доби у тварин операційної групи, що отримували гумілід, не відмічалось достовірного збільшення кількості лейкоцитів. У цей час кількість лейкоцитів у кроленят безопераційної контрольної групи залишалась доволі високою. Підтримання лейкоцитів на сталому рівні у тварин операційної групи, що отримували гумілід, пояснюється протизапальними властивостями гумінових речовин. Протизапальний потенціал гумінових речовин може бути зумовлений інгібуванням прозапальних цитокінів, відповідальних за ініціювання запальних реакцій, а також пригніченням активації системи комплементу (Chien et al., 2015; Jansen van Rensburg & Naude, 2009). Rusliandi et al., 2020 відмічають наявність дозозалежного протизапального ефекту гумінових кислот під час дослідів на щурах.

Рівень ШОЕ у кроленят операційних груп був достовірно вищим порівняно з інтактними до операції тваринами на третю та 14-ту добу досліджу. Зростання ШОЕ типове для перебігу післяопераційного періоду.

Здатність гумінових речовин впливати на остеобласти, на запальні процеси, коригувати кількість еритроцитів та рівень гематокриту – можливі механізми комплексного впливу гумінових речовин на ріст кісткової тканини на тлі репаративного остеогенезу.

Висновки

1. Відмічено здатність гуміліду забезпечувати збільшення кількості еритроцитів та синтезу гемоглобіну як в умовах нормального фізіологічного стану, так і на тлі імплантації PLA імплантатів.

2. З 14-ї доби досліджу у кроленят операційної групи, які отримували гумілід, не відмічалось збільшення лейкоцитів, на відміну від особин операційної контрольної групи, що говорить про наявність певного протизапального впливу гумінових кислот на організм кроленят.

3. У кроленят операційної групи, що отримували гумілід, зареєстровано збільшення кількості шарів остеонів та остеобластів у стегновій кістці, а також кількості остеонів та шарів остеобластів у грудній кістці.

Автори вдячні доктору ветеринарних наук професору П. М. Гавриліну за допомогу в оцінюванні морфологічних показників.

References

Aeschbacher, M., Graf, C., Schwarzenbach, R. P., & Sander, M. (2012). Antioxidant properties of humic substances. *Environmental Science & Technology*, 46(9), 4916–4925.

Apostu, D., Lucaci, O., Lucaci, G. D. O., Crisan, B., Crisan, L., Baciu, M., Onisor, F., Baciu, G., Câmpian, R., & Bran, S. (2017). Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. *Drug Metabolism Reviews*, 49(1), 92–104.

Brunner, F., Schmid, A., Kissling, R., Held, U., & Bachmann, L. M. (2009). Biphosphonates for the therapy of complex regional pain syndrome I - Systematic review. *European Journal of Pain*, 13(1), 17–21.

Çalışır, M., Akpınar, A., Poyraz, Ö., Göze, F., & Çınar, Z. (2015). The histopathological and morphometric investigation of the effects of systemically administered humic acid on alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 51(4), 499–507.

Chien, S.-J., Chen, T.-C., Kuo, H.-C., Chen, C.-N., & Chang, S.-F. (2015). Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(1).

Da Silva, D., Kaduri, M., Poley, M., Adir, O., Krinsky, N., Shainsky-Roitman, J., & Schroeder, A. (2018). Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. *Chemical Engineering Journal*, 340, 9–14.

Das, A., Tanner, S., Barker, D. A., Green, D., & Botchwey, E. A. (2013). Delivery of S1P receptor-targeted drugs via biodegradable polymer scaffolds enhances bone regeneration in a critical size cranial defect. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(4), 1210–1218.

Dyomshina, O. O., Ushakova, G. O., & Stepchenko, L. M. (2017). The effect of biologically active feed additives of humilid substances on the antioxidant system in liver mitochondria of gerbils. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), 185–190.

Esposito Corcione, C., Gervaso, F., Scalera, F., Montagna, F., Sannino, A., & Maffezzoli, A. (2016). The feasibility of printing polylactic acid-nanohydroxyapatite composites using a low-cost fused deposition modeling 3D printer. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(13).

Gregor, A., Filová, E., Novák, M., Kronek, J., Chlup, H., Buzgo, M., Blahnová, V., Lukášová, V., Bartoš, M., Nečas, A., & Hošek, J. (2017). Designing of PLA scaffolds for bone tissue replacement fabricated by ordinary commercial 3D printer. *Journal of Biological Engineering*, 11(1).

Haffner-Luntzer, M., Heilmann, A., Heidler, V., Liedert, A., Schinke, T., Amling, M., Yorgan, T. A., Scheidt, A., & Ignatius, A. (2016). Hypochlorhydria-induced calcium malabsorption does not affect fracture healing but increases post-traumatic bone loss in the intact skeleton. *Journal of Orthopaedic Research*, 34(11), 1914–1921.

Hedström, M., Åström, K., Sjöberg, H., Dalén, N., Sjöberg, K., & Brosjö, E. (2002). Positive effects of anabolic steroids, vitamin D and calcium on muscle mass, bone mineral density and clinical function after a hip fracture. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 84-B(4), 497–503.

Islam, K. M. S., Schumacher, A., & Gropp, M. J. (2005). Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 126–134.

Ipek, H., Avci, M., Iriadam, M., Kaplan, O., & Denek, N. (2008). Effects of humic acid on some hematological parameters, total antioxidant capacity and laying performance in Japanese quails. *Archiv für Geflügelkunde*, 72, 56–60.

Kushch, M. M., Fesenko, I. A., Byrka, O. V., Nosovska, G. P., & Stepchenko, L. M. (2012). Vplyv humilida na morfometrychni pokaznyky orhaniv travlennia i imunitetu huseniat [The effect of humilide on the morphometric parameters of the digestive and immunity organs of goslings]. *Poultry Breeding*, 68, 267–273 (in Ukrainian).

Kozlovsky, A., Tal, H., Laufer, B.-Z., Leshem, R., Rohrer, M. D., Weinreb, M., & Artzi, Z. (2007). Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clinical Oral Implants Research*, 18(5), 601–610.

Jansen van Rensburg, C. E., & Naude, P. J. (2009). Potassium humate inhibits complement activation and the production of inflammatory cytokines in vitro. *Inflammation*, 32(4), 270–276.

Jung, C.-R., Schepetkin, I. A., Woo, S. B., Khlebnikov, A. I., & Kwon, B. S. (2002). Osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells by mumie extract. *Drug Development Research*, 57(3), 122–133.

Loi, F., Córdova, L. A., Pajarinen, J., Lin, T., Yao, Z., & Goodman, S. B. (2016). Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119–130.

- Rusliandi, R., Rousdy, D., & Mukarlina, D. The anti-inflammatory activity of humic acid from borneo peat soil in mice. *Majalah Obat Tradisional*, 25(1), 22–28.
- O’Keefe, R. J., & Mao, J. (2011). Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(6), 389–392.
- Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D., Largeteau, A., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Biodegradable materials and metallic implants – a review. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(4), 44.
- Rybalka, M. A., Stepchenko, L. M., Shuleshko, O. O., & Zhorina, L. V. (2020). The impact of humic acid additives on mineral metabolism of rabbits in the postnatal period of ontogenesis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(2), 289–293.
- Rybalka, M. A. & Stepchenko, L. M. (2020). Features of mineral metabolism in rabbits during correction with biologically active feed additives against the background of implantation of PLA implants. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 8(2), 171–178.
- Schepetkin, I., Khlebnikov, A., & Kwon, B. S. (2002). Medical drugs from humus matter: Focus on mumie. *Drug Development Research*, 57(3), 140–159.
- Skoryk, M. V. (2009). Funkcional’nyj stan erytrocytiv i vmist mikroelementiv u vnutrishnih organah kurejnesuchok za vplyvu rehovyn guminovoi’ pryrody. Extended abstract of candidate’s thesis. Lviv. National University of Veterinary Medicine and Biotechnology S. Z. Gzhytsky (in Ukrainian).
- Stepchenko, L. M., Losjeva, Je. O., & Skoryk, M. V. (2008). Funkcional’nyj stan organizmu produktyvnoi’ ptyci za dii’ gidrogumatu [Functional state of productive poultry for actions hidrohumat]. *News of Dnipropetrovk State Agrarian University*, 2, 99–103 (in Ukrainian).
- Trckova, M., Matlova, L., Hudcova, H., Faldyna, M., Zraly, Z., Dvorska, L. & Pavlik, I. (2005). Peat as a feed supplement for animal: A review. *Veterinarni Medicina Praha*, 50, 361–377.
- Yefimov, V. G. (2017). Kletochnyj sostav i limfocitarnyj profil’ krovi molodnjaka svinej pod vlijaniem gumata natrija, jantarnoj kisloty i mikrojelementov [The cellular composition and lymphocytic blood profile of young pigs under the influence of sodium humate, succinic acid and trace elements.]. *Uchenye Zapiski Uchrezhdenija Obrazovanija «Vitebskaja Gosudarstvennaja Akademija Veterinarnoj Medicyny»*, 53 (4), 103–106.