

Original researches

Features of mineral metabolism in rabbits during correction with biologically active feed additives against the background of implantation of PLA implants

M. A. Rybalka, L. M. Stepchenko

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Received: 06 May 2020
Revised: 28 May 2020
Accepted: 23 June 2020

Dnipro State Agrarian and Economic University, S. Eftremov Str. 25, 49600, Dnipro, Ukraine
Tel.: +38-050-642-80-81
E-mail: stepchenko2@gmail.com

Cite this article: 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. doi: 10.32819/2020.24

Abstract. Humic substances are able to influence mineral metabolism due to their properties to form chelate complexes. Directly, the state of bone tissue is closely related to general processes that ensure the exchange of minerals in the body as a whole. Polylactic acid (PLA) is a biopolymer which, due to its high biocompatibility and osseointegration properties, is increasingly used for the manufacture of implants. Among the methods of improving the osseointegration of implants, gaining popularity, the use of pharmacological drugs and dietary supplements that have a direct effect on bone tissue or act indirectly by affecting the body's systems and metabolism. For the experiment 32 rabbits were divided into groups of 8 rabbits each. In two model groups, 16 rabbits were implanted with PLA implants in the bilateral defect of the parietal bone, one of which was immersed in a 1% humilid solution and the other in a 0.9% NaCl solution before administration. From the operated rabbits, 8 received humilid during treatment, and 8 others were intact. 16 rabbits who did not undergo surgery were divided into two groups, one of which drank humilid and the other clean water. The aim of our work was to determine the mineral metabolism in rabbits during implantation of PLA implants. The ability of humic substances to influence the redistribution of calcium ionized and copper in the blood serum and femur in rabbits of the model group in comparison with intact animals was proved. There was also an increase in the content of iron and calcium ionized in the serum, and calcium, iron, copper and a decrease in the content of zinc in the femur of rabbits treated with humilide. It has been proved that the introduction of humilid into the diet caused an increase in newly formed bone tissue in PLA implants of rabbits of the model group. Therefore, an increase in macro- microelements in blood serum and their redistribution in the bone tissue of rabbits receiving humilides suggests the possibility of using humilid to correct mineral metabolism and improve the condition of bone tissue. Leveling reduction macro- microelements in the blood and bone tissue, together with an increase in newly formed bone tissue in PLA implants of a model group of rabbits receiving humilide indicate a systemic effect of humilid on the osseointegration of PLA implants.

Keywords: humic substances; biopolymers; osteointegration; macroelements; microelements; mineral metabolism; bone tissue; rabbit

Особливості мінерального обміну у кролів за умови корекції біологічно активними кормовими добавками на тлі імплантування PLA імплантатів

М. А. Рибалка, Л. М. Степченко

Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Анотація. Гумінові речовини здатні впливати на мінеральний обмін завдяки властивості утворювати хелатні комплекси. Безпосередньо, стан кісткової тканини тісно пов'язаний із загальними процесами, що забезпечують обмін мінеральних речовин в організмі в цілому. Poly(lactic acid) (PLA) – біополімер який за рахунок своєї високої біосумісності та остеointегративних властивостей усе частіше використовується для вироблення імплантатів. Серед методів покращення остеointеграції імплантатів набуває популярності застосування фармакологічних препаратів і біологічно активних добавок, що мають безпосередній вплив на кісткову тканину або діють опосередковано, впливаючи на системи організму та обмін речовин. Для проведення досліджу 32 кроленят розділено на групи по 8 тварин у кожній. У двох модельних групах шінадцятьом кроленят поміщені PLA імплантати до білатерального дефекту тім'яної кістки, один з яких перед введенням, занурювали у 1% розчин гуміліді, а інший у 0,9% розчин NaCl. Вісім прооперованих кроленят отримували гумілід з питною водою протягом лікування, а вісім інших інтактних – чисту воду. Мета роботи – визначити показники мінерального обміну у кроленят на тлі імплантації PLA імплантатів. Доведено збільшення вмісту Феруму та Кальцію іонізованого у сироватці крові, а також Кальцію, Феруму, Купруму у стегновій кістці кроленят, що отримували гумілід. Відмічена здатність гумінових речовин нормалізувати рівень іонізованого Кальцію та Купруму у сироватці крові а також Кальцію та Купруму у стегновій кістці кроленят модельної групи порівняно з інтактними тваринами. Доведено, що введення до раціону кроленят гуміліді зумовило більш активний процес формування кісткової тканини у PLA імплантатах, порівняно з тваринами контрольної групи. Тож збільшення макро- і мікроелементів у сироватці крові та їх перерозподіл у кістковій тканині кроленят, які отримували гуміліді вказує на можливість його використання для корекції мінерального обміну та покращення стану кісткової тканини. Перерозподіл, макро-мікроелементів у крові та кістковій тканині у сукупності

із збільшенням кількості кісткової тканини у PLA імплантатах кроленят модельної групи, що отримувала гумілід, вказує про системний вплив гумілиду на остеointegraцію PLA імплантатів.

Ключові слова: гумінові речовини; біополімери; остеointegraція; макроелементи; мікроелементи; мінеральний обмін; кісткова тканина; кроленята

Вступ

Репаративна регенерація сформованої кісткової тканини залежить від регуляції остеобластичного та остеокластичного диферонів. На відміну від фізіологічної регенерації для забезпечення нормального перебігу репаративного остеогенезу, окрім регуляції активності остеобластів та остеокластів, досить важливими постають їх кооперативні взаємовідносини із гемопетичним і фібробластичним диферонами (Bumejster & Pogorelov, 2008).

Проблема репаративного остеогенезу постає гостро на тлі поширення спектру отриманих травм не тільки тваринами, а й людиною, в тому числі при застосуванні вогнепальної зброї. В умовах сьогодення збільшується кількість оперативних методів лікування та видів матеріалів, що використовують для відновлення посттравматичних ушкоджень кісткової тканини. Тож актуальність використання імплантатів, які здатні замінити або виправляти дефекти кісткової тканини підвищується (Winkler et al., 2018).

Матеріали, які використовують для створення імплантатів за характером взаємодії з організмом поділяють на ті, що здатні до біодеградації (біосумісні) та ті, що не здатні до цього процесу (біоінертні). Окрему групу становлять біоактивні матеріали, які зумовлюють свою дію завдяки наявності в них лікарських речовин. Parida et al. (2012) поділяє біоматеріали для створення імплантатів на: синтетичні полімерні біоматеріали (поліамід, поліпропілен), керамічні біоматеріали (алюмінію нітрид, цирконію нітрид), металеві біоматеріали (Титан, Залізо), біодеградуєчі полімерні біоматеріали (PLA, polyhydroxyvalerate), композиційні біоматеріали (поєднання декількох біоматеріалів) (Parida, et al., 2012).

Особливу увагу привертють імплантати, що здатні до біодеградації, так як їх застосування виключає необхідність у реоперації на відміну від біоінертних імплантатів (Prakasam et al., 2017). У літературних джерелах наявна значна кількість досліджень щодо використання імплантатів, здатних до біодеградації на лабораторних тваринах (Shao et al., 2017). Відомості стосовно використання біодеградуєчих матеріалів на домашніх тваринах зустрічаються поодинокі. Матеріал, що здатний до біодеградації, володіє високою біосумісністю та остеointegratивними властивостями є PLA, що робить його одним із потенційних матеріалів вибору за для використанні у ветеринарній ортопедії (Dedukh et al., 2019).

Однією з важливих властивостей імплантатів являється їх можливість до остеointegraції. За сучасною класифікацією остеointegraція має 3 стадії: першочергова реакція тканини на імплантацію, періімплантаційний остеогенез, періімплантаційне ремоделювання кістки (Lee & Vance, 2019). Процеси, що відбуваються під час остеointegraції, характерні для репаративного остеогенезу.

Кісткова тканина має великий регенераційний потенціал, завдяки чому її пошкодження можуть бути відновлені. Однак регенерація кісткової тканини відбувається досить повільно, а дисрегуляція запальних процесів та інфекція можуть затримувати її відновлення (Loi et al., 2016; Ter Boo et al., 2018).

На остеointegraцію імплантатів впливає декілька груп факторів. По-перше, це фактори, що забезпечують його основні властивості, а саме хімічна структура, дизайн, механічна стійкість. По-друге, необхідно брати до уваги навантаження, яке буде здійснюватися на імплантат, що взаємопов'язано з його

топографічним розміщенням у організмі. Крім того важливим є використання ад'ювантних методів лікування, зокрема остеогенних біологічних покриттів та біофізичного стимулювання. Можна виділити окрему групу препаратів і біологічно активних добавок (кальцій, вітамін D, остеотропні мікроелементи), що мають системний вплив на остеointegraцію (Goutam et al., 2013).

Кількість фармакологічних препаратів що системно впливають на остеointegraцію імплантатів досить незначна (сім-вастатин, бісфосфонати) (Goutam et al., 2013). Але спектр біологічно активних добавок, що впливають на репаративний остеогенез, а тому мають системний вплив на остеointegraцію, більш широкий. Ефект біологічно активних добавок, що застосовують для інтенсифікації репаративного остеогенезу, в основному, спрямований на забезпечення організму кальцієм і вітаміном D, а також на забезпечення процесу синтезу колагену (остеотропні мікроелементи) (Clark et al., 2008; Plawewski & Chapman-Novakofski, 2010; Van der Velde et al., 2014).

Іншим шляхом покращення забезпечення організму макро- та мікроелементами постає використання біологічно активних речовин, які здатні взаємодіяти з макро- та мікроелементами у кишечнику, покращуючи їх засвоєння. Окрему увагу серед цієї групи речовин, заслуговують гумінові та фульвокислоти, як речовини, що володіють вираженими хелатними властивостями (Islam et al., 2005). За результатами досліджень на багатьох видах тварин продемонстровано, що вони впливають на всмоктування та розподіл макро- та мікроелементів (Skorik, 2008; Yefimov & Rakytianskiy, 2012; Stepchenko & Skorik, 2012; Trckova et al., 2018). Доведено, що гумінові речовини здатні впливати на активність остеобластів, а також мають імуностимулюючі, протизапальні, адаптогенні та антиоксидантні властивості (Stepchenko et al., 2008; Çalışır et al., 2015; Myhaylenko et al., 2016). Тож здатність гумінових речовин збільшувати активність остеобластів, здійснювати перерозподіл макро- та мікроелементів і проявляти імуностимулюючі та протизапальні властивості забезпечує їх комплексний системний вплив при репаративному остеогенезі.

Дані щодо локального впливу гумінових речовин на кісткову тканину в літературних джерелах представлені поодинокі та являються суперечливими. Durmus et al. (2017) при моделюванні перелому мишечків нижньої щелепи шурів не відмічає локального впливу гумінових кислот при їх разовому місцевому застосуванні. Однак, Schepetkin et al. (2002) описує покращення регенерації кісткової тканини на тлі застосування мумій.

Тож метою роботи було дослідити вплив гумілиду на показники мінерального обміну у кроленят на тлі імплантації PLA імплантатів.

Матеріал і методи досліджень

Маніпуляції з тваринами здійснювали відповідно до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (м. Страсбург, 1985 р.). Операційні втручання проводили згідно з рекомендаціями PolLASA (Polish Laboratory Animal Science Association) на базі приватної ветеринарної лікарні. Методика проаналізована та схвалена локальним етичним комітетом Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Експеримент проводили в умовах приватного домогосподарства на кроленятах 80-добового віку породи Нуplus. Для

Таблиця 1. Схема досліджу

Впливаючі фактори	К	Гд	КМ	М + Гд
Гумілід	-	+	-	+
Імпланти + 0,9% розчин NaCl	-	-	+	+
Імпланти + 1% розчин гуміліду	-	-	+	+

Примітка: К – контрольна група, Гд – тварини, що отримували гумілід, КМ – контрольна модельна група, М + Гд – модельна група тварин, що отримувала гумілід

проведення експерименту 32 кроленят поділили на 4 групи по 8 тварин у кожній за принципом аналогічних груп: I група – інтактні тварини (контрольна група); II – тварини, яким завдавали Гумілід; III – тварини, яким здійснювали модельну операцію (контрольна модельна група); IV – тварини, яким здійснювали модельну операцію та завдавали Гумілід (Табл. 1). Тваринам II та IV групи задавали Гумілід із водою індивідуально в кількості 5 мг діючої речовини на 1 кг маси тіла. Кролятам I та III групи давали чисту воду, відповідно до об'єму води в яку додавали гумілід тваринам II та IV групи індивідуально.

Перед проведенням досліджу кролятам перебували у підготовчому періоді тривалістю 15 діб. На початок досліджу вік кролятам склав 95 діб. Протягом проведення досліджу, усі групи кролятам перебували в однакових умовах годівлі та утримання.

Кролятам контрольної модельної групи та модельної групи, що отримувала гумілід проводили імплантацію PLA імплантів до тім'яної кістки. Для проведення досліджу нам надано 32 PLA імпланти 70% пористості та діаметром пор 500 μm проблемною науково-дослідною лабораторією технічного сервісу машин Дніпровського державного аграрно-економічного університету. Кожному кролятам обох модельних груп імплантовано по два PLA імпланти, один з яких перед введенням був занурений у 1% розчин гуміліду протягом 5 хвилин, інший у 0,9% фізіологічний розчин (рис. 1).

Для імплантації PLA імплантів проведена хірургічна операція для створення білатерального дефекту тім'яної кістки. Для премедикації використовували ксилазин внутрішньом'язово у дозі 5 мг/кг. Через 15 хвилин вводили Zoletil 50 у дозі 10 мг/кг за для загальної анестезії. У ділянці тім'яної кістки був зроблений серединний розріз із наступним відведенням шкіри та періосту латерально. Білатеральний дефект у тім'яній кістці зроблений за допомоги 8-мм трипан буру (рис. 2а). Після видалення кісток на їх місце введені імпланти (рис. 2б). Періост і підшкірно-жирову клітковину ушивали безперервним швом за допомогою 4/0 PGA, рану шкіри ушивали капроном 4/0 переривчастими вузловими швами. Післяопераційний шов обробляли Дезі-спрей аерозолем, 2 рази на добу протягом 5 діб.

Кров у кролятам усіх дослідних груп відбирали зранку натщесерце з в. *Saphena lateralis* у першу, 14-ту та 28-му добу

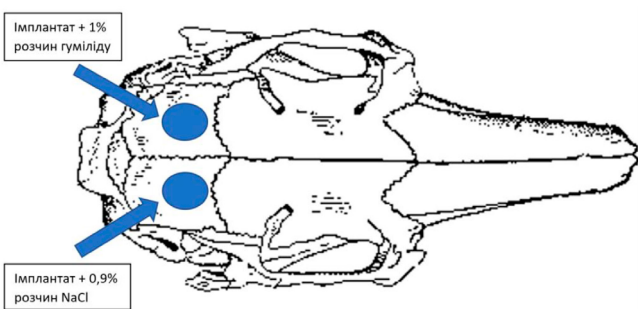


Рис. 1. Розміщення імплантів у тім'яній кістці

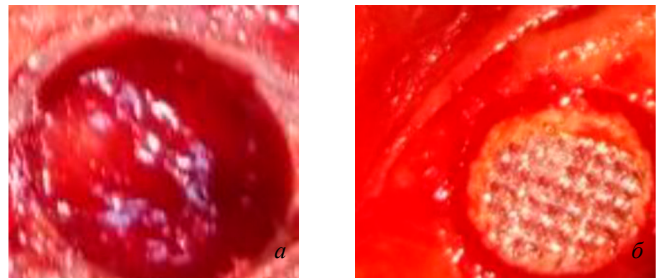


Рис. 2. Дефект утворений трепан буром у тім'яній кістці (а); імплантат розміщений у дефекті тім'яної кістки (б)

дослідження. У сироватці крові за допомогою автоматичного аналізатора Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics, Швейцарія) в умовах лабораторії Імунотест визначали вміст загального Кальцію методом Шварценбаха з комплексоном О-крезолфталеїну; неорганічного Фосфору прямим методом з фосфомолібдатом за J. A. Daly та G. Ertingshausen; Магнію колориметричним методомом з хлорфосфоназо III; Феруму Ферозин методом та активність лужної фосфатази методом з використанням нітрофеніл-4 фосфату в якості субстрату. Рівень іонізованого кальцію визначали методом іон-селективної потенціометрії на AVL 9180 (Dialogue Diagnostics, Швейцарія). Уміст Купруму та Цинку досліджували за допомоги атомно-абсорбційного спектрофотометра S 115 M1 (Selmi, Україна).

Через 28 днів після вживлення імплантів тварин виводили з експерименту в умовах тіопентало-натрієвого наркозу методом тотального кровопускання. Для дослідження показників мінерального обміну відбирали проби стегнової кістки, м'язової тканини (*m. longissimus dorsi*), печінки та нирок, які висушували у сушильній шафі до сталої вологи. Для подальшого дослідження мікроелементів відібрані проби спалювали в муфельній печі при температурі 450 $^{\circ}\text{C}$, отриману золу розчиняли у суміші 1% азотної кислоти та досліджували за допомоги атомно-абсорбційного спектрофотометра S 115 M1 (Selmi, Україна). Дослідження макроелементів проводили згідно загальноприйнятих методик. Концентрація всіх елементів у відібраному матеріалі наведена в розрахунку на 1 кг сухої речовини.

Для гістологічного дослідження імпланти видаляли з навколишніми тканинами материнської кістки. Зразки фіксували у 10% розчині формаліну, подальше дослідження здійснювали по загальноприйнятій методиці гістологічного дослідження кісткової тканини. Забарвлення отриманих гістозрізів здійснювали гематоксиліном та еозином.

Гістоморфометрію проводили для визначення площі новоствореної кісткової тканини із використанням квадратно-сітчастої окулярної вставки по загальноприйнятій методиці (Avtandilov, 1990).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica (версія 12, StatSoft, USA). Для аналізу даних умісту макро- та мікроелементів у сироватці крові кролятам, кістковій тканині, нирках, печінці та м'язовій тканині, а також під час морфометричного дослідження, проводили двофакторним дисперсійним аналізом. Для апостеріорних порівнянь використовували поправку Бонферроні. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$. У таблицях дані представлені у вигляді середніх значень та їх стандартних похибок ($\bar{x} \pm SD$).

Результати

На 14-ту добу досліджу, на рівень загального Кальцію (операція, $P < 0,001$; гумілід, $P < 0,05$) у крові кролятам впливав фактор операції та фактор гуміліду. Відмічена загальна динаміка зниження рівня загального Кальцію у прооперованих кролятам

Таблиця 2. Вміст макро- та мікроелементів, активність лужної фосфатази в сироватці крові кроленят за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи ($x \pm SD$, $n = 8$, тривалість досліду 28 днів)

Доба проведення досліду	Параметри	К	Гд	КМ	М+Гд
Перша доба	Загальний Кальцій, ммоль/л	3,20 ± 0,40 ^a	3,14 ± 0,31 ^a	3,36 ± 0,41 ^a	3,31 ± 0,24 ^a
	Іонізований Кальцій, ммоль/л	1,45 ± 0,28 ^a	1,25 ± 0,10 ^a	1,30 ± 0,09 ^a	1,23 ± 0,21 ^a
	Неорганічний Фосфор, ммоль/л	2,33 ± 0,34 ^a	2,51 ± 0,64 ^a	2,48 ± 0,10 ^a	2,45 ± 0,35 ^a
	Магній, ммоль/л	1,23 ± 0,20 ^a	1,38 ± 0,30 ^a	1,41 ± 0,12 ^a	1,58 ± 0,35 ^a
	Ферум, мкмоль/л	24,6 ± 3,40 ^a	25,7 ± 2,00 ^a	23,9 ± 2,5 ^a	23,2 ± 3,2 ^a
	Цинк, мкмоль/л	55,5 ± 6,80 ^a	53,5 ± 4,90 ^a	54,8 ± 5,1 ^a	56,9 ± 5,9 ^a
	Купрум, мкмоль/л	19,6 ± 5,40 ^a	19,0 ± 2,20 ^a	22,7 ± 1,5 ^a	20,4 ± 3,1 ^a
	Лужна фосфатаза, Од/л	152,0 ± 15,0 ^a	171,0 ± 16,0 ^a	149,0 ± 18,0 ^a	155,0 ± 24,0 ^a
14 доба	Загальний Кальцій, ммоль/л	3,49 ± 0,24 ^a	3,34 ± 0,41 ^{ab}	2,71 ± 0,11 ^c	2,9 ± 0,31 ^{bc}
	Іонізований Кальцій, ммоль/л	1,30 ± 0,15 ^b	1,51 ± 0,05 ^a	1,00 ± 0,04 ^c	1,19 ± 0,20 ^{bc}
	Неорганічний Фосфор, ммоль/л	2,23 ± 0,18 ^b	2,50 ± 0,35 ^{ab}	2,84 ± 0,40 ^a	2,95 ± 0,23 ^a
	Магній, ммоль/л	1,29 ± 0,32 ^a	1,35 ± 0,15 ^a	1,10 ± 0,24 ^a	1,21 ± 0,17 ^a
	Ферум, мкмоль/л	25,3 ± 2,0 ^b	32,0 ± 3,2 ^a	19,5 ± 2,5 ^c	21,2 ± 1,2 ^c
	Цинк, мкмоль/л	54,9 ± 4,7 ^a	47,9 ± 5,9 ^{ab}	40,8 ± 4,0 ^c	43,8 ± 3,4 ^{bc}
	Купрум, мкмоль/л	18,8 ± 2,3 ^{ab}	21,4 ± 1,4 ^a	15,5 ± 0,5 ^c	17,5 ± 1,3 ^{bc}
	Лужна фосфатаза, Од/л	157,0 ± 26,0 ^c	153,0 ± 15,0 ^c	251,0 ± 23,0 ^a	284,0 ± 26,0 ^b
28 доба	Загальний Кальцій, ммоль/л	3,30 ± 0,20 ^a	3,39 ± 0,45 ^a	3,19 ± 0,40 ^a	3,24 ± 0,54 ^a
	Іонізований Кальцій, ммоль/л	1,34 ± 0,11 ^a	1,58 ± 0,15 ^a	1,37 ± 0,20 ^a	1,39 ± 0,20 ^a
	Неорганічний Фосфор, ммоль/л	2,21 ± 0,32 ^a	2,45 ± 0,30 ^a	2,54 ± 0,37 ^a	2,66 ± 0,65 ^a
	Магній, ммоль/л	1,50 ± 0,41 ^a	1,55 ± 0,47 ^a	1,47 ± 0,10 ^a	1,43 ± 0,34 ^a
	Ферум, мкмоль/л	26,4 ± 2,4 ^{ab}	28,9 ± 1,7 ^a	24,7 ± 2,2 ^b	27,2 ± 1,6 ^{ab}
	Цинк, мкмоль/л	58,2 ± 7,0 ^a	55,32 ± 3,8 ^a	59,9 ± 6,4 ^a	57,2 ± 3,7 ^a
	Купрум, мкмоль/л	22,5 ± 2,8 ^a	25,1 ± 7,7 ^a	21,6 ± 2,8 ^a	24,4 ± 4,1 ^a
	Лужна фосфатаза, Од/л	140,0 ± 19,0 ^b	149,0 ± 14,0 ^b	221,0 ± 35,0 ^a	234,0 ± 33,0 ^a

Примітки: Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$. Назви груп див. табл. 1.

(табл. 2). На 28-му добу проведення досліду достовірних змін вмісту загального Кальцію у крові кроленят не відзначено.

На 14-ту добу досліду на рівень Кальцію іонізованого (операція, $P < 0,001$; гумілід, $P < 0,001$) впливав гумілід і факт операційного втручання. За результатами апостеріорних порівнянь відмічено, що на 14-ту добу дослідження вміст Кальцію іонізованого у кроленят контрольної модельної групи достовірно нижчий, порівняно з кроленятами контрольної групи, групи що отримувала гумілід і модельної групи що отримувала гумілід. Виявлено збільшення рівня Кальцію іонізованого у кроленят групи що отримувала гумілід на 16,2% ($P < 0,05$) порівняно із контролем. На 28-му добу досліду на рівень Кальцію іонізованого впливав гумілід ($P < 0,05$), проте достовірних змін при апостеріорних порівняннях не виявлено.

Відмічено вплив операції на вміст неорганічного Фосфору (операція, $P < 0,01$) у крові кроленят на 14-ту добу досліду. Виявлена тенденція до збільшення неорганічного Фосфору у крові кроленят модельних груп. Достовірних змін при дослідженні вмісту Магнію у крові кроленят не відзначали.

На вміст у крові кроленят Феруму (операція, $P < 0,001$; гумілід, $P < 0,001$; сумісний вплив факторів $P < 0,05$) впливав фактор наявності гуміліду, операції та їх сумісний вплив на 14-ту добу досліду. Вміст Феруму у крові кроленят групи що отримувала гумілід був вищий порівняно з контролем на 26,5% ($P < 0,01$). У модельній контрольній групі та модельній групі що отримувала гумілід рівень Феруму достовірно нижчий,

порівняно із контрольною групою та групою, що отримувала гумілід. На 28-му добу проведення досліду на вміст Феруму у крові впливав гумілід ($P < 0,01$) та наявність операції ($P < 0,05$).

За нашим дослідженням на вміст Цинку (операція, $P < 0,001$; сумісний вплив факторів $P < 0,01$) у крові кроленят впливав фактор операції та взаємодія факторів операції та гуміліду на 14-ту добу дослідження. Відмічалась загальна динаміка щодо зниження вмісту Цинку у кроленят модельних груп порівняно з кроленятами контрольної групи на 14 добу дослідження. На 28-му добу дослідження достовірних змін вмісту Цинку у крові кроленят не відмічено.

При дослідженні вмісту Купруму (операція, $P < 0,001$; сумісний вплив факторів $P < 0,01$) відзначено вплив фактору операції та взаємодії факторів операції та гуміліду. Вміст Купруму в сироватці крові кроленят контрольної модельної групи був достовірно нижчий порівняно із контрольною групою та групою що отримувала гумілід на 14-ту добу дослідження. Достовірних змін вмісту Купруму у крові кроленят на 28-му добу дослідження не відмічено.

З'ясовано вплив лише операції (операція, $P < 0,001$; сумісний вплив факторів $P < 0,05$) і сумісно операцію та гумілід на активність лужної фосфатази у крові кроленят. За результатами апостеріорних порівнянь активність лужної фосфатази достовірно вища у кроленят модельних груп на 14-ту добу дослідження. На 28-му добу дослідження відмічається вплив фактору операції ($P < 0,001$) на активність лужної фосфатази

Таблиця 3. Вміст мінеральних речовин в кістковій тканині, печінці, нирках та м'язовій тканині, за впливу біологічно активної кормової добавки гумінової природи ($x \pm SD$, $n = 8$, тривалість досліджу 28 діб)

Орган	Параметр	К	Гд	КМ	М+Гд
Стегнова кістка	Кальцій, г/кг	273,0 ± 14,0 ^b	318,0 ± 23,0 ^a	229 ± 21 ^c	263,0 ± 19,0 ^b
	Фосфор, г/кг	55,3 ± 7,5 ^a	51,0 ± 6,3,0 ^a	45,8 ± 12 ^a	49,7 ± 5,9 ^a
	Ферум, мг/кг	11,4 ± 0,5 ^b	12,9 ± 0,7 ^a	10,3 ± 1,6 ^b	10,9 ± 0,9 ^b
	Цинк, мг/кг	152,0 ± 19,0 ^a	135,0 ± 11,0 ^{ab}	124 ± 22 ^b	131,0 ± 13,0 ^{ab}
	Купрум, мг/кг	1,10 ± 0,14 ^b	1,35 ± 0,05 ^a	0,79 ± 0,10 ^c	1,05 ± 0,12 ^b
Найдовший м'яз спини	Ферум, мг/кг	5,50 ± 0,40 ^{bc}	6,10 ± 0,27 ^a	5,19 ± 0,10 ^c	5,82 ± 0,30 ^{ab}
	Цинк, мг/кг	11,33 ± 1,68 ^a	10,9 ± 1,6 ^a	9,3 ± 1,6 ^a	9,9 ± 1,8 ^a
	Купрум, мг/кг	0,53 ± 0,05 ^a	0,41 ± 0,27 ^a	0,39 ± 0,13 ^a	0,45 ± 0,2 ^a
Печінка	Ферум, мг/кг	190,0 ± 18,0 ^a	214,0 ± 47,0 ^a	178 ± 21 ^a	187,0 ± 30,0 ^a
	Цинк, мг/кг	30,9 ± 1,2 ^a	32,4 ± 2,3 ^a	27,4 ± 7,7 ^a	31,2 ± 8,2 ^a
	Купрум, мг/кг	38,4 ± 3,1 ^a	33,3 ± 10,0 ^a	35,4 ± 2,6 ^a	34,4 ± 4,1 ^a
Нирки	Ферум, мг/кг	35,1 ± 2,5 ^a	34,2 ± 2,4 ^a	34,7 ± 2,5 ^a	33,2 ± 2,3 ^a
	Цинк, мг/кг	23,1 ± 1,2 ^a	21,4 ± 0,4 ^a	23,8 ± 2,9 ^a	22,2 ± 2,4 ^a
	Купрум, мг/кг	3,52 ± 0,24 ^a	3,70 ± 0,31 ^a	3,62 ± 0,50 ^a	3,41 ± 0,02 ^a

Примітки: різні літери позначають значення, які достовірно відрізняються один від одного у межах одного рядка за результатами двухфакторного дисперсійного аналізу з урахуванням поправки Бонферроні. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$. Назви груп дивись табл. 1.

у сироватці крові кроленят. Відмічено збільшення активності лужної фосфатази у крові кроленят модельних груп на 28-му добу проведення досліджу.

Тож добавка гумінової природи приводить до збільшення рівня Феруму та іонізованого Кальцію у сироватці крові кроленят групи, що отримували гумілід. У кроленят модельної групи що отримувала гумілід відмічено нормалізацію рівня Кальцію іонізованого та Купруму.

Після забою кроленят на 28-му добу проведення досліджу на рівень Кальцію (гумілід, $P < 0,001$; операція, $P < 0,001$) у стегновій кістці впливала, як операція, так і гумілід. За результатами апостеріорних порівнянь, рівень кальцію у стегновій кістці, достовірно вищий у тварин групи що отримувала гумілід, порівняно з даними інших груп (табл. 3). У контрольній модельній групі рівень Кальцію достовірно нижчий на 16,1% ($P < 0,001$), порівняно з контролем.

Незалежний вплив двох факторів виявлений при дослідженні вмісту Феруму (гумілід, $P < 0,01$; операція, $P < 0,001$). У кроленят групи що отримувала гумілід вміст Феруму у стегновій кістці вищий, порівняно з іншими групами.

На вміст Цинку (операція, $P < 0,01$; сумісний вплив факторів, $P < 0,05$) у стегновій кістці впливав фактор операції та сумісний вплив факторів.

За нашими даними на вміст Купруму (гумілід, $P < 0,001$; операція, $P < 0,001$), впливав як фактор наявності операції, так і фактор наявності гуміліду. Вміст Купруму достовірно нижчий у стегновій кістці тварин контрольної групи порівняно з даними інших груп. Зауважимо, що вміст Купруму у кроленят групи що отримувала гумілід був вищим на 22,7% ($P < 0,001$), порівняно із контролем. У кроленят контрольної модельної групи вміст Купруму на 28,2% ($P < 0,001$) нижче, порівняно з контролем.

На концентрацію Феруму (гумілід, $P < 0,01$; операція, $P < 0,001$)

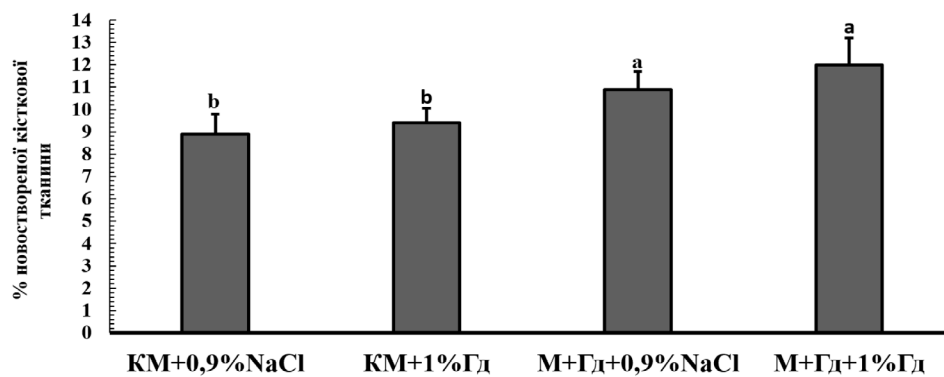


Рис. 3. Кількість новоутвореної кісткової тканини у PLA імплантатах на тлі локального та системного впливу гуміліду

Примітки: різні літери позначають значення, які достовірно відрізняються один від одного у межах одного рядка за результатами двухфакторного дисперсійного аналізу з урахуванням поправки Бонферроні. Відмінності вважали достовірними при $P < 0,05$. Назви груп: КМ+0,9%NaCl – імплантати модельної контрольної групи занурені у 0,9%NaCl; КМ+1%Гд – імплантати модельної контрольної групи, оброблені 1% розчином гуміліду; М+Гд+0,9%NaCl – імплантати модельної групи, що отримувала гумілід та занурені у 0,9%NaCl; М+Гд+1%Гд – імплантати модельної контрольної групи, що отримувала гумілід та оброблені 1% розчином гуміліду.

у м'язовій тканині впливала наявність гумілідів та операції. За результатами апостеріорних порівнянь у м'язовій тканині відмічено збільшення рівня Феруму на 10,9% ($P < 0,01$) у кроленят групи, що отримувала гумілід по відношенню до контрольної групи. Рівень Феруму у тварин модельної групи, що отримувала гумілід на 12,1% ($P < 0,001$) вищий порівняно з даними контрольної модельної групи.

Тож на тлі застосування гумінових речовин відмічається збільшення рівня Кальцію, Феруму, Купруму у стегновій кістці. Відмічена здатність гумінових речовин корегувати рівень Кальцію та Купруму у кроленят модельної групи що отримували гумілід. Добавка гумінового походження збільшує рівень Феруму у м'язовій тканині груп кроленят, що отримували гумілід.

За результатами гістологічного дослідження у двох модельних групах на крайових ділянках материнської кістки був тонкий прошарок грануляційної тканини, відмічена наявність капілярів. Ріст кісткової тканини спостерігався переважно на кінцях імплантатів від крайової частини материнської кістки. Частина поверхні імплантатів була покрита фіброзною тканиною, багатою капілярами. Прояви запальної реакції виявляли поодинокі, вони були незначними на тлі репаративних процесів та незалежали від наявності локальної дії гумілідів.

За результатами морфометричного дослідження встановлений системний вплив гумінових речовин на утворення кісткової тканини у PLA імплантатах (системний вплив гумінових речовин на утворення кісткової тканини, $P < 0,001$). Відмічено достовірне збільшення кількості кісткової тканини у PLA імплантатах оброблених гумілідом модельної групи кроленят що отримувала гумілід, порівняно із PLA імплантатами кроленят контрольної модельної групи не оброблених гумілідом на 34,8% ($P < 0,001$) та оброблених гумілідом на 27,6% ($P < 0,001$) (рис. 3). Тобто можна підкреслити, що у PLA-імплантатах кроленят модельної групи, що отримували гумілід, відмічена загальна динаміка щодо збільшення кількості кісткової тканини у порівнянні із контрольною модельною групою.

Обговорення

Гумінові речовини здатні впливати на збільшення абсорбції Кальцію зокрема за рахунок своїх хелатних властивостей, що зумовлені наявністю у них карбоксильних та гідроксильних функціональних груп (Trskova et al., 2018). Забезпечення достатнього рівня Кальцію важливе для нормального перебігу репаративного остеогенезу, так як певна його частина використовується у процесі мінералізації кісткової тканини (Claes et al., 2012). Так для забезпечення достатнього пулу Кальцію у крові після переломів, збільшується резорбція кісткової тканини, що в свою чергу, підвищує ймовірні ризики повторних переломів (Haffner-Luntzer et al., 2016). Зниження рівня загального Кальцію у сироватці крові кроленят модельних груп може бути наслідком, мінералізації ушкодженої кісткової тканини. У модельній групі тварин, що отримували гумілід, рівень Кальцію іонізованого достовірно не відрізнявся від контрольної групи, що, на нашу думку, свідчить про здатність гумілідів нормалізувати рівень іонізованого Кальцію в умовах репаративного остеогенезу. Нами відмічена здатність гумінових речовин упливати на збільшення рівня іонізованого Кальцію у кроленят, що отримували гумілід та не підлягали оперативному втручанню на 14-ту добу досліду. Тенденція до зменшення вмісту загального кальцію та збільшення вмісту неорганічного фосфору у крові на тлі репаративного остеогенезу – наслідок анаболічної дії гормонів і нівелюється після закінчення формування кісткової мозолі (Komnenou et al., 2005).

Вплив гумінових речовин на абсорбцію Феруму відбувається у результаті хелатування його позаклітинних іонів у шлунково-кишковому тракті (Ipek et al., 2008). Ферум – це кофактор гідроксилази, що каталізує гідроксилування проліну і лізину, а також приймає участь у синтезі вітаміну D, що відводить йому

важливу роль у репаративному остеогенезі (Toxqui & Vaquero, 2015). Збільшення вмісту Феруму у сироватці крові кроленят групи, що отримували гумілід, на нашу думку, пояснюється зменшенням конкурентних взаємовідносин мікроелементів при їх абсорбції зокрема при проходженні через DMT-1 транспортер. Зниження вмісту Феруму у сироватці крові кроленят модельних груп може бути наслідком процесу інтенсифікації метаболізму та пов'язане з комплексною реакцією організму на оперативне втручання.

Покращення абсорбції Цинку та Купруму на тлі застосування гумінових речовин – це наслідок зменшення антагонізму при їх всмоктуванні у шлунково-кишковому тракті, що забезпечує збільшення рівня Купруму та зниження рівня Цинку у сироватці крові (Yefimov & Rakytianskyi, 2012). Фізіологічна роль Купруму та Цинку тісно пов'язана з супероксиддисмутазою до складу якої вони входять (Klotz et al., 2003). Ми відмітили достовірне зниження Цинку та Купруму у кроленят контрольної модельної групи, порівняно з контролем на 14-ту добу дослідження, що ймовірно пов'язане із збільшенням їх участі у забезпеченні антиоксидантних систем організму, що узгоджується з даними інших дослідників (Wang et al., 2007). У кроленят модельної групи, що отримували гумілід достовірне зниження Купруму не відзначено, що можливо являється наслідком покращення його абсорбції у шлунково-кишковому каналі.

Підвищення активності лужної фосфатази супроводжує репаративний остеогенез та вказує на збільшення активності остеобластів, що відмічено у нашому дослідженні в післяопераційний період (Nazht et al., 2019).

Вміст Кальцію у стегновій кістці достовірно вищий у тварин групи, що отримували гумілід, порівняно з даними інших груп, що може бути пов'язано із поліпшенням абсорбції цього макроелементу у шлунково-кишковому каналі. Також відмічена здатність гумілідів підтримувати сталий рівень Кальцію у стегновій кістці кроленят після проведення модельної операції. На нашу думку це пов'язано з достатнім забезпеченням рівня Кальцію у крові, що нівелює резорбцію кісткової тканини, яка виникає при репаративному остеогенезі на тлі недостатності Кальцію.

Збільшення вмісту Феруму у стегновій кістці у кроленят групи, що отримувала гумілід, може бути також наслідком збільшення його потреби для синтезу колагену.

Збільшення рівня Купруму можливо є наслідком збільшення потреби кісткової тканини у колагені, так як Купрум це кофактор гідроксилази, що приймає участь у його синтезі. Достовірне зниження Купруму та Цинку у кістковій тканині кроленят контрольної модельної групи можливо є наслідком зниження їх загального рівня у крові.

Гумінові речовини здатні корегувати рівень Феруму у м'язовій тканині, що загалом погоджується з даними інших дослідників (Mista et al., 2012). Збільшення рівня Феруму у м'язовій тканині відмічалось, як у кроленят, що отримували гумілід без оперативного втручання, так і у кроленят модельної групи.

Ми відмітили інтенсивніший ріст кісткової тканини у PLA імплантатах модельної групи, що отримувала гумілід порівняно із PLA імплантатами контрольної модельної групи. Нами не визначено збільшення утворення кісткової тканини у імплантатах оброблених гумілідом як у кроленят модельної групи, що отримувала гумілід, так і у тварин у контрольному варіанті. Ця тенденція вказує на збільшення остеоінтеграції імплантатів за рахунок системного впливу гумілідів та про відсутність його локального впливу, що збігається з даними інших дослідників (Durmus et al., 2017).

Висновки

При додаванні гумілідів до раціону кроленят у їх сироватці крові відмічено достовірне збільшення Феруму та Кальцію іонізованого. У кроленят модельної групи, що отримували гумілід

рівень Кальцію іонізованого та Купруму у сироватці крові достовірно не знижувався на відміну від кроленят контрольної модельної групи. Дані зміни можна пояснити хелатуючими властивостями гуматів та, як наслідок, покращенням абсорбції макро- та мікроелементів у шлунково-кишковому каналі.

У кроленят модельної групи які отримували гумілід, рівень Кальцію та Купруму у стегновій кістці не знижувався на відміну від кроленят контрольної модельної групи, що пояснюються кращим забезпеченням кісткової тканини макро- та мікроелементами.

Відмічено збільшення утворення кісткової тканини у PLA імплантатах кроленят які отримували гумілід і відсутність достовірної різниці утворення кісткової тканини при місцевому застосуванні гуміліду. Тобто спостерігається наявність системної та відсутність локальної дії гуміліду на остеointegraцію PLA імплантатів.

Подяки

Автори вдячні аспіранту кафедри експлуатації машинно-тракторного парку Крутоусу Д. І. за розробку та виготовлення PLA імплантатів.

References

Avtandilov, G. G. (1990). *Meditsinskaya morfometriya* [Medical morphometry]. Meditsina, Moscow (in Russian).

Bumejster, V. I., & Pogorelov, M. V. (2008). Suchasnyj pogljad na reparativnyj osteogenez [A modern view of reparative osteogenesis]. *World of Medicine and Biology*, 4, 104–110.

Clark, E. M., Ness, A. R., & Tobias, J. H. (2008). Vigorous physical activity increases fracture risk in children irrespective of bone mass: a prospective study of the independent risk factors for fractures in healthy children. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(7), 1012–1022.

Claes, L., Recknagel, S., & Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(3), 133–143.

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.

Dedukh, N. V., Makarov, V. B., & Pavlov, A. D. (2019). Polylactide-based biomaterial and its use as bone implants (analytical literature review). *Pain, Joints, Spine*, 9(1), 28–35.

Durmus, K., Bora, A., Dogan, M., Özer, H., Tuncer, E., & Altuntas, E. (2017). Can local administration of humic acid shorten recovery time of mandibular fractures? Experimental study. *Entupdates*, 7(2), 57–61.

Goutam, M., Chandu, G. S., Mishra, S. K., Singh, M., & Tomar, B. S. (2013). Factors affecting osseointegration: a literature review. *Journal of Orofacial Research*, 3, 197–201.

Haffner-Luntzer, M., Liedert, A., & Ignatius, A. (2016). Mechanobiology of bone remodeling and fracture healing in the aged organism. *Innovative Surgical Sciences*, 1(2), 57–63.

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.

Islam, K. M. S., Schumacher, A., & Gropp, M. J. (2005). Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(3), 126–134.

Kommenou, A., Karayannopoulou, M., Polizopoulou, Z. S., Constantinidis, T. C., & Dessiris, A. (2005). Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 34(1), 35–38.

Klotz, L.-O., Kröncke, K.-D., Buchczyk, D. P., & Sies, H. (2003). Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1448–1451.

Lee, J. W. Y., & Bance, M. L. (2019). Physiology of osseointegration. *Otolaryngologic clinics of North America*, 52(2), 231–242.

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

Mišta, D., Rząsa, A., Szymańko, T., Zawadzki, W., Styczyńska, M., Pintał, A., & Króliczewska, B. (2012). The effect of humic-fatty acid preparation on production parameters and meat quality of growing rabbits. *Annals of Animal Science*, 12(1), 117–126.

Mуhaylenko, E. O., Dyomshyna, O. O., Ushakova, G. O., Griban, V. G., & Stepchenko, L. M. (2016). Vplyv kormovoi' dobavky «Gumilid» na pokaznyky protei'novogo i aminokyslotnogo obminiv u kurchat-brojleriv krosu «Kobb 500» [Influence of feed additive “Humilid” on protein and amino acid metabolism indicators in broiler chickens of cobb 500 cross]. *The Animal Biology*, 18(4), 66–71 (in Ukrainian).

Nazht, H. H., Omar, R. A., Dahhan, M. R. A., Khaleefa, R. K., Kareem, S. M., Manual, Z. M., & Theiab, Z. H. (2019). Estimation of alkaline phosphatase enzymes level in the femoral transverse fractures healing in rabbits. Conference: The 10th International Scientific Conference Under the Title «Geophysical, Social, Human and Natural Challenges in Changing Environment».

Parida, P., Behera, A., & Mishra, S. C. (2012). Classification of Biomaterials used in Medicine. *International Journal of Advances in Applied Sciences*, 3, 31–35.

Plawecki, K., & Chapman-Novakofski, K. (2010). Bone health nutrition issues in aging. *Nutrients*, 2(11), 1086–1105.

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.

Schepetkin, I., Khlebnikov, A., & Kwon, B. S. (2002). Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Dev Res*, 57, 140–159.

Shao, H., Ke, X., Liu, A., Sun, M., He, Y., Yang, X., Fu, J., Liu, Y., Zhang, L., Yang, G., Xu, S., & Gou, Z. (2017). Bone regeneration in 3D printing bioactive ceramic scaffolds with improved tissue/material interface pore architecture in thin-wall bone defect. *Biofabrication*, 9(2), 1–23.

Skorik, M. V. (2008). Vzajemozv'jazok funkcional'nogo stanu erytrocytiv i vmistu mikroelementiv u pechinci kurejnesuchok za vplyvu guminovyh kormovyh dobavok riznogo pohodzhennja [The interrelation between the functional condition of erythrocytes and the trace element contents in the liver of laying hens in response to huminous feed additives of different origins]. *Scientific Bulletin of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnology S. Z. Gzhytsky*, 10, 190–197 (in Ukrainian).

Stepchenko, L. M., & Skorik, M. V. (2012). Vplyv gidrogumatu na vmist mineral'nih elementiv u tkaninah i organah kurchat-brojleriv [Influence of hydrohumat on the content of mineral elements in the tissues and organs of broiler chickens]. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 13(3), 93–96 (in Ukrainian).

Stepchenko, L. M., Loseva, Y. O., & Skorik, M. V. (2008). Funkcional'nyj stan organizmu produktyvnoi' ptyci za dii' gidrogumatu [Functional state of productive poultry for actions hydrohumat]. *News of Dnipropetrovsk State Agrarian University*, 2, 99–103 (in Ukrainian).

Ter Boo, G. J., Schmid, T., Zderic, I., Nehrass, D., Camenisch, K., Richards, R. G., Grijpma, D. W., Moriarty, T. F., & Eglin, D. (2018). Local application of a gentamicin-loaded thermoresponsive hydrogel allows for fracture healing upon clearance of a high *Staphylococcus aureus* load in a rabbit model. *Eur Cell Mater*, 35, 151–64.

- Toxqui, L., & Vaquero, M. (2015). Chronic iron deficiency as an emerging risk factor for osteoporosis: a hypothesis. *Nutrients*, 7(4), 2324–2344.
- Trckova, M., Lorencova, A., Babak, V., Neca, J., & Ciganek, M. (2018). The effect of leonardite and lignite on the health of weaned piglets. *Research in Veterinary Science*, 119, 134–142.
- Van der Velde, R. Y., Brouwers, J. R. B. J., Geusens, P. P., Lems, W. F., & van den Bergh, J. P. W. (2014). Calcium and vitamin D supplementation: state of the art for daily practice. *Food & Nutrition Research*, 58(1), 217–296.
- Wang, B., Yu, X., Wang, D., Qi, X., Wang, H., Yang, T., & Xu, X. (2007). Alterations of trace elements (Zn, Se, Cu, Fe) and related metalloenzymes in rabbit blood after severe trauma. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(2), 102–107.
- Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering. *Bone & Joint Research*, 7(3), 232–243.
- Yefimov, V. G., & Rakytianskyi, V. M. (2012). Vplyv guminovyh rehovyn na mineralnyj obmin u koriv [Effect of humic substances on mineral metabolism in cows]. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 1(1), 66–70 (in Ukrainian).