

ТРАКИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
Катедра “Ветеринарна хирургия”

Радина Наскова Василева-Минкова

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ И КЛИНИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ
ЗА ОЦЕНКА НА РЕГЕНЕРАТИВНИЯ ПОТЕНЦИАЛ НА
ЕРИТРОПОЕТИНА ВЪРХУ КОСТНОТО ЗАРАСТВАНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен „доктор“ по научна специалност „Ветеринарна
хирургия“

Научен ръководител: **Доц. д-р Цветан Минчев Чапръзов, д-м**

Стара Загора

2022

Дисертационният труд е написан на 191 стандартни страници и е онагледен с 14 таблици и 76 фигури. Библиографската справка съдържа 387 автора, от които 14 на кирилица и 373 на латиница. Номерацията на включените в автореферата фигури, таблици и раздели не съответства на тази в дисертацията.

Дисертационният труд е обсъден на 25.11.2022 год. от Разширен катедрен съвет, определен със заповед № 57/11.11.2022 год. на Декана на ВМФ при Тракийски университет и е насочен за защита пред Научно жури.

Дисертантът е асистент в катедра „Ветеринарна хирургия“ на ВМФ при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Изказвам сърдечна благодарност на:

- Научния ми ръководител доц. д-р Цветан Чапръзов, двм за непрекъснатата подкрепа и съдействие през всички етапи на работния процес.
- Проф. д-р Димитър Димитров, двм, проф. д-р Димитър Сиврев, дб и проф. д-р Радостин Симеонов, двмн за напътствията при осъществяване на хистологичните изследвания.
- Колегите от катедра “Ветеринарна хирургия” и целия колектив на Университетска ветеринарна болница за помощта и съдействието при набиране на пациенти.
- Проф. д-р Анелия Миланова, двмн, р-л на секция “Фармакология”, където бяха направени ELISA изследванията.
- Д-р Жулиета Пракова и медицински център „Диамедикъл“ за съдействието при извършване на денситометричните изследвания.
- На моето семейство за огромната подкрепа и разбиране.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на
от часа в,

на Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, гр. Стара Загора.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на ВМФ и на интернет страницата на Тракийски университет (www.uni-sz.bg).

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	6
РЕЗУЛТАТИ	17
ИЗВОДИ	42
ПРИНОСИ	43
ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА	44
ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА	45
ENGLISH SUMMARY	46

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ЕПО – еритропоетин

ОРИП – относителна рентгенова плътност

ALP – Alkaline phosphatase (обща алкална фосфатаза)

BALP – Bone specific alkaline phosphatase (костно специфична алкална фосфатаза)

Ca – Calcium (калций)

CT – Computed tomography (компютърна томография)

CTX – C-terminal telopeptid of collagen type I (карбокситерминален телопептид на колаген тип I)

DEXA – Dual energy X-ray absorptiometry (двойно енергийна рентгенова абсорбциометрия)

DPD – Deoxyuridinoline (дезоксипиридинолин)

EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (етилен диамин тетраацетат)

Er – Erythrocytes (еритроцити)

HGB – Hemoglobine (хемоглобин)

HCT – Hematocrit (хематокрит)

HU – Hounsfield units (Хънсфилдови единици)

P – Phosphorus (фосфор)

PINP – Procollagen I N-terminal propeptide (аминотерминален пропептид на проколаген тип I)

PLT – Platelets (тромбоцити)

rhEpo – Recombinant human erythropoietin (рекомбинантен човешки еритропоетин)

WBC – White blood cells (бели кръвни клетки)

УВОД

Костната тъкан е минерализирана съединителна тъкан, която изпълнява опорно-механична, защитна и метаболитна функция в човешкия и животинския организъм. Нейно съществено предимство е, че притежава свойството да регенерира, като най-честата и разпознаваема форма на регенерация е зарастването на фрактурите. В по-голяма част от случаите този процес завършва без да се формира белег, но понякога е възможно да настъпят усложнения, които да компрометират възстановяването.

Предизвикателство за медицината се оказва лечението на състояния, при които се формират големи костни дефекти. Предпочитана техника в тези случаи е използването на автогенна костна присадка, притежаваща всички необходими за костното зарастване свойства: остеогенеза, остеоиндукция и остекондукция. Приложението на автотрансплантати в редица случаи среща трудности и ограничения, поради което през последните години изследванията в областта са насочени върху утвърждаването на нови стратегии за стимулиране на костната регенерация. Проучват се различни биоматериали, естествени или синтетични, приложени самостоятелно или в комбинация със сигнални молекули, каквито са растежните фактори, цитокините и хормоните.

Еритропоетинът представлява хормон, чиято физиологична функция се изразява в стимулиране на еритропоезата. В спорта се използва като допинг средство, докато за регенеративната медицина значение придобиват неговите допълнителни, т.н. плеiotропни функции. Данни за остеогенния и ангиогенния му потенциал, предизвикаха нашия изследователски интерес да потърсим отговор на въпроси, свързани с неговия ефект върху костното зарастване.

Настоящият дисертационен труд проучва ефекта от приложението на рекомбинантния човешки еритропоетин (rhEpo) при лечението на критични костни дефекти при плъхове, както и възможността за клиничното му приложение при пациенти с фрактури на тръбестите кости.

Процесът на костно формиране е обективизиран чрез приложението на образно-диагностични методи като рентгенография, компютърна томография, остеоденситометрия, както и неинвазивни методи за проследяване динамиката на костните маркери. Използването на животински модел в проучването прави възможно изследването на процеса в хистологичен аспект.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи влиянието на еритропоезина върху регенерацията на плоски и тръбести кости с критични дефекти при плъхове и възможността за клиничното му приложение при котки с фрагментирани фрактури на дълги тръбести кости.

За постигането на основната цел са поставени следните задачи:

1. Изработване на експериментален модел с критичен костен дефект при плъхове за оценка потенциала на rhEpo по отношение регенерацията на плоските кости.
2. Изработване на експериментален модел с критичен костен дефект при плъхове за оценка потенциала на rhEpo по отношение регенерацията на тръбести кости.
3. Оценка на системния ефект от приложението на rhEpo чрез изследване на показателите общ брой еритроцити, хемоглобин и хематокрит.
4. Проследяване на костното зарастване чрез рентгенологични изследвания (рентгенография, компютърна томография и остеоденситометрия).
5. Хистологична оценка на ефекта от rhEpo върху костната регенерация при плъхове.
6. Приложение на rhEpo с цел ускоряване на костното зарастване при котки с фрагментирани фрактури на дълги тръбести кости.
7. Оценка процеса на костно зарастване чрез биохимични, рентгенологични и хистологични изследвания, както и проследяване динамиката на костни маркери при котки с фрагментирани фрактури на бедрената кост.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Животни

Експерименталните изследвания бяха проведени в периода 2019-2021 год. върху 92 бели лабораторни плъха, породна линия Wistar, мъжки пол, скелетно зрели, средно тегло 270 ± 25 грама. В първата опитна постановка за оценка ефекта на rhEpo върху регенерацията на плоски кости бяха използвани 36 от тях, а във втората опитна постановка за оценка ефекта на rhEpo върху регенерацията на тръбести кости – 56.

По време на опитите, животните бяха отглеждани в Биобазата към Ветеринарномедицински факултет при Тракийски университет, в

лабораторни полипропиленови корита с метални покривни решетки с размери 427x287x198 mm, съгласно изискванията, посочени в приложение №4 на Наредба №20/01.11.2012 год. Плъховете бяха хранени с гранулирана храна, използвана за този животински вид (Мелхран ЕООД, Стара Загора, България) и имаха свободен достъп до хранилките и поилките.

Експерименталните изследвания бяха одобрени от Комисията по етика към животните на Българската агенция по безопасност на храните и проведени в съответствие със Закона за ветеринарномедицинска дейност и Наредба №25/10.06.2005 год. за хуманно отношение към опитните животни. Разрешенията са вписани под рег. №241/04.09.2019 год. и рег. № 276/02.07.2020 год.

Клиничните изследвания бяха извършени в периода септември 2020 – март 2022 год. В проучването бяха включени шест котки, от смесена порода, на възраст $7,3 \pm 4,3$ месеца, с тегло $2,17 \pm 1,2$ кг. Всички те бяха пациенти на Клиниката за дребни животни към Университетска ветеринарна болница, ВМФ, Тракийски университет и бяха диагностицирани с фрагментирана фрактура в областта на диафизата на бедрената кост, която подлежи на остеосинтеза с метална пластина и винтове.

2. Материали

Еритропоедин

В проучването беше използван Binocrit (Sandoz GmbH, Kundl, Austria). Binocrit 2000 IU е инжекционен разтвор, всеки милилитър от който съдържа 2000 IU епоетин алфа, еквивалентни на $16,8 \mu\text{g/ml}$. Произведен е посредством рекомбинантна ДНК технология в клетъчна линия от овариални клетки на китайски хамстер.

Колагенов конус

Collacone® (Botiss biomaterials GmbH, Germany) е колагенов конус, който е изграден на базата на свински колаген и напълно се резорбира в организма за 2 - 4 седмици.

Костозаместител

Bio-Gen® (BiOTECK, Italy) представляват спонгиозни гранули от конски произход. Времето за ремоделиране е от 4 до 6 месеца.

Метални импланти

За извършване на остеосинтезата при плъхове бяха използвани метални пластини (30 mm дължина и 4 mm ширина), които бяха прикрепени към костта с помощта на четири кортикални винта с диаметър 1.5 mm и дължина 6 или 8 mm (Biortho-Vet-Eur, Jiangsu, China). При клиничните пациенти бяха използвани фиксиращи елементи, избрани съобразно индивидуалния размер на пациента.

3. Анестезиологичен протокол

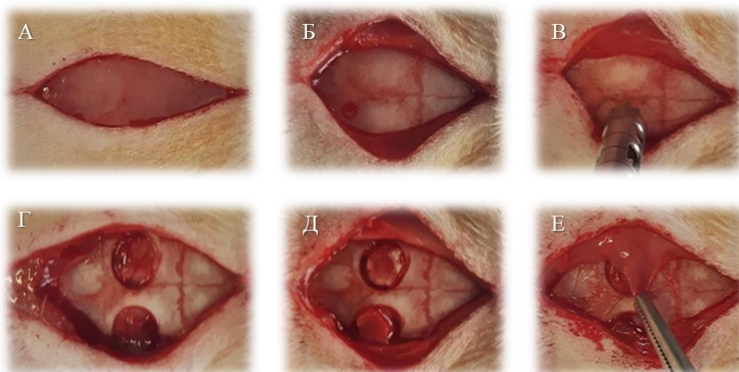
Плъховете бяха анестезирани чрез интрамускулно инжектиране на комбинация от 80 mg/kg кетаминов хидрохлорид 10 % (Anaket®, Richter Pharma AG, Austria) и 10 mg/kg ксилазинов хидрохлорид 2 % (Xylazin®, Alfazan, Netherlands) (Динев & Симеонова, 2009).

Котките бяха премедикирани с атропинов сулфат (0,1% Atropin, Sopharma, Bulgaria) в доза 0,02 mg/kg, приложен подкожно. Въвеждането в анестезия беше осъществено чрез интравенозно приложение на комбинация от золазепам/тилетамин (Zoletil 50, Virbac, France) в доза 15 mg/kg, а поддържането в анестезия чрез инхалационна анестезия с изофлуран 2,5% в смес с кислород (AErrane, Baxter, USA).

4. Оперативен протокол

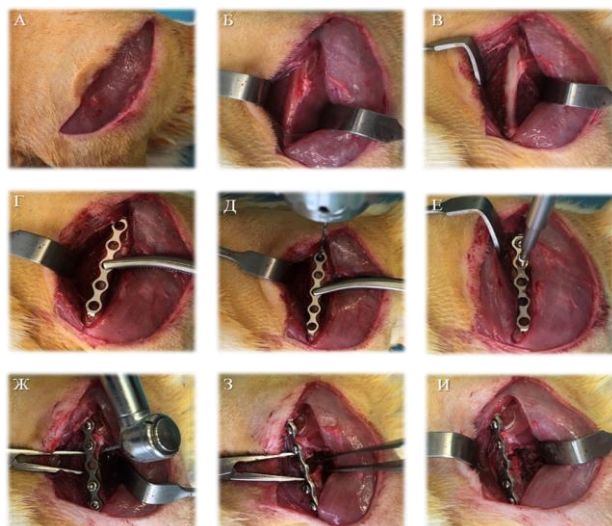
Хирургическите интервенции бяха осъществени при спазване изискванията за асептика и антисептика.

За изработването на калвариални костни дефекти космената покривка на фронталната част на кожата, покриваща скалпа, беше отстранена чрез застригване. След антисептична обработка с 2 % хлорхексидин глюконат и 10 % повидон-йод (Braunol, B. Braun Melsungen AG, Germany) беше направена инцизия по медианната линия от назофронталната част до окципиталната протуберанция. Отпрепарирано бе периостално ламбо, за да се достигне до калвариалната кост. С трепан-борер (Acurata GmbH & Co KG, Thurmansbang, Germany) при непрекъснато охлаждане с физиологичен разтвор и на бавни обороти (900 об/мин), бяха създадени два симетрични костни дефекта с критичен размер от 5 mm всеки, като се пазеха от увреждане *dura mater*, подлежащите артериални съдове и краниалния синус. Полученият калвариален диск беше отстранен. Поставени бяха биоматериалите, след което периостът бе върнат на място, а разрезът - защит с единични прекъснати шевове и резорбируем шевен материал (4-0 PGA, Kruuse, Denmark). Етапите от оперативния протокол са представени на фиг. 1.



Фиг. 1 Етапи при изработване на стандартизирани калвариални костни дефекти. А/ създаване на кожен разрез; Б/ отпрепариране на периоста В/ създаване на костен дефект посредством трепан борер Г/ създаване на втори калвариален дефект Д/ поставяне на колагенов носител с ЕПО/физ. разтвор в мястото на дефектите Е/ връщане на периоста и зашиване на кожния разрез.

За изработването на сегментен костен дефект космената покривка на тазовият крайникът беше отстранена чрез застригване. Кожата бе обработена с 4 % разтвор на хлорхексидин глюконат (HMI scrub classic, HMI, Bulgaria) и 10 % повидон-йод (Braunol, B. Braun Melsungen AG, Germany). Нанесен беше разрез на кожата с приблизителна дължина 2-3 см по краниолатералната повърхност на бедрената област на левия тазов крайник, започващ от trochanter major и достигащ до латералния епикондил на бедрената кост. Подкожната тъкан и fascia lata бяха разрязани. M. biceps femoris беше отместен в каудална посока, а m. vastus lateralis – в краниална, за да се открие диафизата на бедрената кост. Извършена беше остеостинтеза, като пластината се поставя по страничната повърхност на бедрената кост и се фиксира към нея с четири кортикални винта, два проксимално и два дистално. В средата на диафизата посредством дентален борер и постоянна иригация с физиологичен разтвор се извършва остеотомия, като се отстранява костен фрагмент с критичен размер от 5 mm. В така създадения дефект се поставят биоматериалите, след което разрезът се затваря послойно чрез поставянето на непрекъснат шивашки шев и използването на резорбируем шевен материал (4-0 PGA, Kruuse, Denmark). Отделните етапи са представени на фиг. 2.



Фиг. 2 Етапи при изработването на сегментен дефект в бедрената кост при плъхове.

А) Кожен разрез; Б) Достъп до бедрената кост; В) Откриване тялото на бедрената кост; Г) Поставяне на пластина; Д) Създаване на отвори за винтовете; Е) Поставяне на винтовете; Ж) Създаване на критичния дефект; З) Визуализация на дефекта; И) Поставяне на биоматериалите;

В следоперативния период на плъховете беше приложен с водата за пиене антибиотик енрофлоксацин (Baytril® 5% inj. sol., Bayer, Germany) в доза 10 mg/kg, в продължение на 3 дни.

При клиничните пациенти след отстраняване на космената покривка чрез застригване, полето беше обработено с 4% хлорхексидин диглюконат (HMI® Scrub Classic, Bulgaria) и 10% повидон-йод (Braunol, B. Braun Melsungen AG, Germany). След извършване на стандартен латерален достъп до бедрената кост, костните фрагменти бяха репонирани и фиксирани в това положение посредством остеосинтеза с метална планка и винтове.

В мястото на фрактурната линия беше приложен локално еритропоетин в доза 1000 IU (Binocrit, Sandoz GmbH, Austria). Разрезът беше затворен послойно чрез налагането на непрекъснат шивашки шев. Фасцията и подкожната тъкан бяха защити с резорбируем шевен материал (PGA 2-0, Kruuse, Denmark), а кожата - с нерезорбируем (Nylon 3-0, Kruuse, Denmark). В следоперативния период котките бяха третирани против болката с мелоксикам (MeloXidolor, Produlab Pharma B.V, Netherland) в доза 0.3 mg/kg, приложен подкожно, и антибиотик амоксицилин/ клавуланова киселина

(Synulox RTU, Pfizer, USA) в доза 25 mg/kg, приложен подкожно в продължение на 6 дни.

5. *Опитни групи*

За оценка потенциала на rhЕро по отношение регенерацията на плоските кости, лабораторните животни бяха разделени в три основни групи от по дванадесет животни. В калварията на всяко от тях бяха създадени по два отвора, като по този начин се формираха шест опитни групи (D1-D6):

- При животните от първата група в левия дефект беше поставен колагенов конус, напоен с 49 IU ЕПО (D1; n=12), а в десния - колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор (D2; n=12).
- При животните от втората група в левия дефект беше поставен костозаместител в комбинация с колагенов конус, напоен с 49 IU ЕПО (D3; n=12), а в десния - костозаместител в комбинация с колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор (D4; n=12).
- При животните от третата група – в левия дефект беше поставен колагенов конус (D5; n=12), а десният - оставен празен (D6; n=12).
Интраперитонеално животните бяха инжектирани с ЕПО в доза 4900 IU/kg.

За оценка потенциала на rhЕро по отношение регенерацията на тръбести кости, лабораторните животни бяха разделени в шест групи – една контролна и пет опитни. След създаването на сегментен дефект с критичен размер, костта се фиксира по описания метод, а в мястото на остеотомия се поставят биоматериалите, както следва:

- F1 група (n=10) – дефектът се оставя празен
- F2 група (n=10) – дефектът се оставя празен, а интраперитонеално плъховете се инжектират еднократно с ЕПО в доза 4 900 IU/kg.
- F3 група (n=8) – колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор
- F4 група (n=10) – колагенов конус, напоен с 49 IU ЕПО
- F5 група (n=8) – костозаместител в комбинация с колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор
- F6 група (n=10) – костозаместител в комбинация с колагенов конус, напоен с 49 IU ЕПО

6. *Клинични и параклинични изследвания*

В следоперативния период ежедневно беше извършван клиничен преглед, като бе проследено състоянието на операционната рана и извършена визуална оценка на показатели куцота, болка, оток.

За проследяване на хемопоестичния потенциал на ЕПО и промените в показателите общ брой червени кръвни клетки Eг (Т/L), хемоглобин HGB (g/L) и хематокрит HCT (%), кръвни проби от опитните животни бяха получавани трикратно – в деня на операцията, на 30-тия и 90-тия ден след това. За венепункция беше използвана *v. caudalis lateralis* (фиг.14). Предварително животните бяха седирани, а опашките им хиперемирани с цел по-добра визуализация на кръвоносния съд (Гундашева и Джелебов, 2017).

При котки хематологични изследвания бяха проведени преди оперативната интервенция, на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та, 6-та, 8-ма седмица след това, като проследихме следните показатели: бели кръвни клетки (WBC) с абсолютното и процентно съотношение на неутрофили, лимфоцити, моноцити, еозинофили и базофили, и червена кръвна картина. За отчитането им беше използван Автоматичен хематологичен анализатор BS-5000Vet (Mindray).

Биохимичните показатели калций (Ca), фосфор (P) и обща алкална фосфатаза (ALP) съответно проследихме през същите интервали и анализирахме посредством Автоматичен биохимичен анализатор BS-120 (Mindray).

7. Изследвания на костни маркери

След получаване на кръвните проби в епруветки с EDTA през споменатите по-горе интервали, те бяха центрофугирани за 10 мин при 3 000 оборота, за получаване на EDTA-плазма, която до момента на изследване беше съхранявана при – 80 °C.

Чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ изследвахме следните костни маркери, а резултатите са представени като ng/ml:

- Костно специфична алкална фосфатаза – Cat Bone-specific Alkaline Phosphatase (BALP), BT LAB, Birmingham, United Kingdom.
- Аминотерминален проколаген тип I – Cat Total Procollagen Type I intact N-terminal Propeptide (PINP), BT LAB, Birmingham, United Kingdom.
- Карбокситерминален телопептид на колаген тип I – Cat Cross-Linked C-terminal telopeptides of Type I Collagen (CTX), Abebio, Wuhan, China.
- Дезоксипиридинолин – Cat Deoxypyridinoline (DPD), Abebio, Wuhan, China.

8. Рентгенографско изследване

Периодични рентгенографски изследвания на главата при плъхове бяха извършени веднага след операцията, на 30-тия и 90-тия ден в дорзо-вентрална проекция, а тези на бедрената област – в anteriор-постериорна (фиг.15). За целта беше използван апарат PHILIPS SUPER 50 CP-D (Hamburg, Germany), на който бяха зададени следните данни: 45 kV, 8 mAs.

Рентгенограмите бяха подложени на компютърна обработка посредством софтуерен продукт Image J (ImageJ Analysis System, National Institutes of Health, Bethesda, USA) за отчитане на показателя относителна рентгенова плътност (ОПП), който показва съотношението на средната стойност на интензитета на сивото на дефекта към средната стойност на интензитета на сивото на околната тъкан. За превръщане на качествените показатели в количествени използвахме точкова скала, взимствана от Oryan et al. (2015) и модифицирана от нас (табл. 1).

Таблица 1. Точкова система за оценяване процесът на зарастване на костни дефекти чрез рентгенография (Oryan et al., 2015)

1. Костно формиране	
Няма данни за костно формиране	1
Костното зарастване води до запълване на 25% от дефекта	2
Костното зарастване води до запълване 50% от дефекта	3
Костното зарастване води до запълване 75% от дефекта	4
2. Рентгенологично установяване на костно сливане	
Не се установява сливане	1
Възможно е да настъпи сливане	2
Рентгенологично установимо сливане	3
3. Сливане, проксимално на остеотомията	
Не се установява сливане	1
Слабо примостяване (<50%)	2
Умерено примостяване (>50%)	3
Сливане	4
4. Сливане, дистално на остеотомията	
Не се установява сливане	1
Слабо примостяване (<50%)	2
Умерено примостяване (>50%)	3
Сливане	4
5. Примостяване	
Не се установява примостяване	1
Примостяване <50%	2

Примостяване >50%	3
Напълно настъпило примостяване	4
Нормална костна морфология	5
6. Фрактурна линия	
Фрактурна линия от 1 до 5 mm без наличие на костна пролиферация	1
Фрактурна линия от 1 до 5 mm с костна пролиферация, но без примостяване	2
Фрактурна линия от 1 до 5 mm с костна пролиферация и примостяване	3
Фрактурна линия < 1 mm без наличие на костна пролиферация	4
Фрактурна линия < 1 mm с костна пролиферация, но без примостяване	5
Фрактурна линия < 1 mm с костна пролиферация и примостяване	6
Не се установява фрактурна линия	7
7. Резорбция на импланта	
Не е резорбиран	1
Слаба резорбция	2
Пълна резорбция	3
8. Съединяване на присадката с костта	
Не се установява съединяване	1
Кортекс със спонгиоза	2
Кортекс с кортекс от едната страна	3
Кортекс с кортекс от двете страни	4
9. Ремоделиране	
Не е настъпило ремоделиране	1
Ремоделиране в костномозъчния канал	2
Пълно ремоделиране	3

При котки, периодични рентгенографски изследвания на бедрената област извършихме в кранио-каудална проекция преди операцията, на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та, 6-та и 8-ма седмица посредством апарат PHILIPS SUPER 50 CP-D (Hamburg, Germany) при данни 50 kV и 10 mAs за проследяване на ранния етап от костното зарастване. Рентгенограмите подложихме на компютърна обработка посредством софтуерен продукт iQ-VIEW/PRO USER MANUAL version 2.7.0 INT EN003R

9. Компютърно-томографско изследване

Проследяване на костното зарастване при животните от първа опитна постановка беше осъществено чрез периодични компютърно томографски изследвания веднага след оперативната интервенция, на 30-тия и на 90-тия ден. За оценка на ефекта от приложението на еритропоетин, бяха конструирани триизмерни образи посредством компютърен софтуер ANIMAGE (Animage, LLC, California, USA). Чрез използване на проекции с

максимум интензитет, генерирани от софтуера беше извършена качествена оценка на костното формиране и образуването на костни мостове в мястото на дефекта по четири точковата система на Patel et al., 2008 (фиг. 3). Промените в костната плътност в мястото на дефекта, бяха отчетени в Хънсфилдови единици (HU).

При плъховете от втора опитна постановка, компютърно-томографски изследвания на тазобедрена област бяха извършени на 90-ти ден след оперативната интервенция и след отстраняване на металните импланти само на животни от опитните групи, при които беше наблюдавано костно зарастване.

Сканиранията бяха извършени с апарат Fidex Animage 3825 Hopyard Road, Pleasanton, California 94588.925.416.1900.

Костно формиране по цялата дължина на дефекта	4
Костно формиране по частичната дължина на дефекта	3
Костно формиране само по границите на дефекта	2
Няколко костни формации, пръснати в мястото на дефекта	1
Липсва костно формиране в мястото на дефекта	0



Фиг. 3 Точкова система за оценка скоростта на костно съединение и свързване посредством формирането на костни мостове.

10. Остеоденситометрия

Измерване на костната плътност на бедрената кост при плъхове от опитните групи, където беше установено костно зарастване, бе извършено на 90-ти ден след оперативната интервенция и след отстраняване на металните импланти посредством двойно енергийна рентгенова абсорбциометрия (DEXA).

Измерване на костната плътност на бедрената кост при котки беше извършено след настъпване на костното зарастване и отстраняване на металните импланти посредством метода, описан по-горе.

За сканиранията беше използван апарат OsteoSys SMART FAN-BEAM (OsteoSys, Seoul, Korea). Данните от изследването за костна

минерална плътност бяха генерирани от софтуер Excellus (OsteoSys, Seoul, Korea) и представени като g/cm².

11. Хистологични изследвания

От всяка опитна група половината от плъховете бяха евтаназирани на 30-ти ден след оперативната интервенция, а другата половина на 90-ти ден. Избраният метод за евтаназия бе контролирано подаване на определени дози инхалационен анестетик (AErrane 100% Liquid Inhalation Vapour (Isoflurane), Baxter SA) в анестезиологична камера.

При клинични пациенти костна биопсия беше извършена на втора седмица след оперативната интервенция за получаване на материал за хистологично изследване по техниката, описана от Dunn (1990). За целта пациентът беше седиран посредством интрамускулно приложение на комбинация от золазепам/тилетамин (Zoletil 50, Virbac, France) в доза 15 mg/kg, а самата манипулация извършена при спазване на асептика и антисептика.

Костните биоптати бяха фиксирани за 7 денонощия в 10% воден разтвор на неутраленформалин, след което декалцинирани посредством 8% азотна киселина и включени в парафинови блокчета. Оцветяването се извърши по три различни метода: хематоксилин-еозин (ХЕ), по Шморл (Schmorl) и трихромно оцветяване по Masson-Goldner (MGT).

Получените хистологични препарати се наблюдават на бинокулярен светлинен дигитализиран микроскоп Leica DM1000 (Leica Microsystems, UK) при увеличение x40, x100 и x200 и камера LEICA DFC 290 (Leica Microsystems, UK). След прецизно светлинномикроскопско изследване на всички хистосрези, се търсеше новообразувана кост и остатъци от костозаместител.

12. Статистически методи

На база на събраната първична информация бяха проведени следните статистически анализи (GraphPad InStat ® версия 3.06; MedCalc версия 10.2.0.0, MedCalc Software, Belgium):

- Дескриптивен статистически анализ – изчисляване на средно аритметично, стандартно отклонение/грешка, медиана, минимални и максимални стойности;
- Еднофакторен дисперсионен анализ – чрез непараметричен (Mann-Whitney) и параметричен тест (ANOVA).

РЕЗУЛТАТИ

1. Резултати от експерименталния модел за оценка ефекта на rhЕpo върху регенерацията на плоски кости при плъхове

1.1. Клинични и параклинични изследвания

В следоперативния период плъховете бяха в добро общо състояние и със запазен апетит. Наблюдавахме умерен оток в областта на хирургическата интервенция, който отшумяваше в рамките на 3-5 дни.

Стойностите на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита при плъховете от трите опитни групи на 0, 30-ти и 90-ти ден са обобщени в таблица 2.

Таблица 2. Стойности на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита, представени като медиана (мин-макс), при плъховете от I, II, III опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.

	Група	ден 0 n=12	30 ден n=12	90 ден n=6
Еритроцити, T/L	I	6.22 (5.36-8.24)	6.74 (6.29-9.09) ^{c**}	6.77 (6.22-8.28)
	II	6.83 (4.66-8.12)	6.99 (6.35-8.85) ^{b***}	6.86 (6.72-8.03)
	III	5.63 (5.03-8.00)	6.25 (5.66-7.04) ^{a***}	7.50 (7.22-7.87) ^{a***}
Хемоглобин, g/L	I	139 (113-157)	142 (134-185)	148 (138-164) ^{a***}
	II	137 (101-165) ^{b**}	150 (126-185) ^{b*}	145 (136-156) ^{b**}
	III	117 (105-137)	142 (112-158) ^{a*}	158 (150-163) ^{a***}
Хематокрит, %	I	34.2 (31.4-44.1) ^{c**}	37.6 (34.1-47.7)	37.9 (35.5-44.7)
	II	36.3 (24.7-26.9) ^{b*}	37.0 (35.1-46.9)	39.7 (37.5-40.7)
	III	30.6 (26.9-36.0)	35.7 (30.5-42.0)	42.6 (38.8-44.1) ^{a***}

a* p<0.05; a** p<0.01; a*** p<0.001 спрямо ден 0 в рамките на групата; b* p<0.05; b** p<0.01; b*** p<0.001 между II и III група през съответния период; c** p<0.01 между I и III група през съответния период.

При животните с локално приложение на еритропоетин, както самостоятелно така и в комбинация с костозаместител, се установиха статистически незначителни промени в изследваните стойности през съответните периоди. Изключение прави стойността на хемоглобина, която се повишаваше от 139 до 148 g/L на 90-ти спрямо 0-вия ден при плъховете от първа опитна група (p<0.01).

Еритроцитите, хемоглобина и хематокрита се покачиха рязко и статистически достоверно при животните от трета опитна група, на които еритропоетинът е приложен системно чрез интраперитонеално инжектиране. Достоверна разлика се установи в стойностите на хемоглобина ($p<0.05$) и еритроцитите ($p<0.001$) на 30-тия спрямо ден 0, докато на 90-тия и за трите показателя степента на достоверност е $p<0.001$.

1.2. Рентгенографски изследвания

Резултатите от рентгеновите изследвания са показани на фиг. 4, 5 и 6. И при трите опитни групи до края на експеримента рентгенологично видими промени върху оперираните кости не се установиха. При групата с приложение на костозаместител на 30-тия ден се установи организация на спонгиозните гранули, което на 90-тия ден е още по-ясно изразено, но до пълна костна регенерация не се стигна.



Фиг. 4 Рентгенографии в дорзо-вентрална проекция на калвариалните кости при плъхове от I опитна група на ден 0, 30-ти, 90-ти.



Фиг. 5 Рентгенографии в дорзо-вентрална проекция на калвариалните кости при плъхове от II опитна група на ден 0, 30-ти, 90-ти.



Фиг. 6 Рентгенографии в дорзо-вентрална проекция на калвариалните кости при плъхове от III опитна група на ден 0, 30-ти, 90-ти.

Получените резултати от измерването на относителната рентгенова плътност са представени на таблица 3. При животните от първа и втора опитна група се наблюдаваше нарастване на рентгеновата плътност в отделните периоди, но стойностите не бяха статистически значими. Достоверна разлика бе установена на 90-тия ден при плъховете, на които е прилаган костозаместител в комбинация с еритропоетин (D3) спрямо тези, при които е съвместно с физиологичен разтвор (D4) ($p < 0.05$). При дефектите от трета опитна група рентгенологично костната плътност намаляваше.

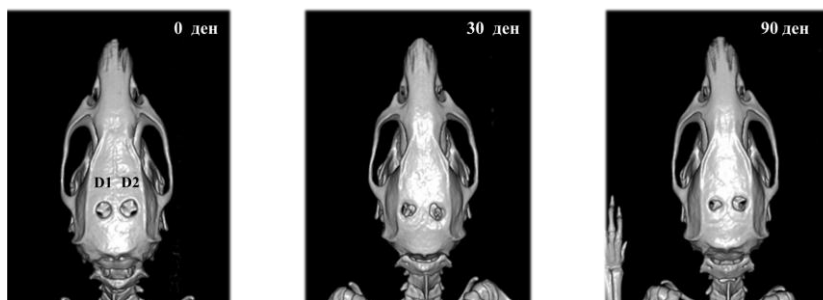
Таблица 3. Относителна рентгенова плътност представена като медиана (мин-макс) при плъховете от I, II, III опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.

Дефект		Ден 0 n=12	30-ти ден n=12	90-ти ден n=6
I опитна група	D1	0.93 (0.90-0.95)	0.92 (0.88-0.99)	0.97 (0.86-0.99)
	D2	0.93 (0.88-0.96)	0.92 (0.88-0.96)	0.95 (0.86-0.96)
II опитна група	D3	0.97 (0.93-0.99)	0.96 (0.86-1.05)	0.98* (0.95-0.99)
	D4	0.95 (0.90-1.00)	0.94 (0.85-1.07)	0.94 (0.93-0.99)
III опитна група	D5	0.92 (0.91-0.94)	0.92 (0.89-0.97)	0.89 (0.86-0.93)
	D6	0.93 (0.90-0.95)	0.91 (0.86-0.95)	0.89 (0.88-0.96)

* $p < 0.05$ между D3 и D4 на 90-ти ден

1.3. Компютърно-томографски изследвания

Върху компютърно-томографските изображения на калвариалните костни дефекти на животните от първа опитна група се наблюдаваха нови костни формации по границите на дефекта, които продължаваха да нарастват до края на експеримента (фиг. 7). На 30-тия ден се установи статистически достоверна разлика в полза на дефектите, локално третирани с ЕПО спрямо тези с приложение на физиологичен разтвор ($p<0.05$), докато на 90-тия ден тя намаляваше.



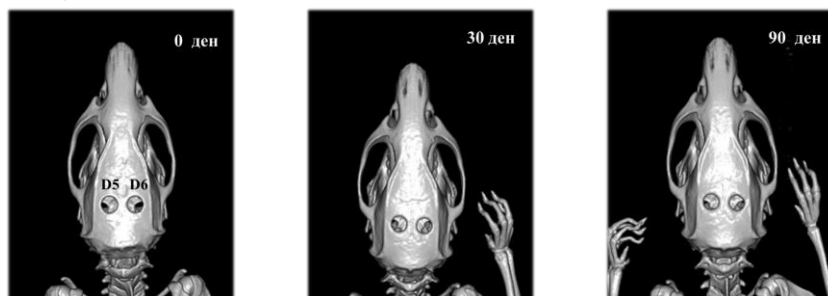
Фиг. 7 3D СТ изображения на калвариалните кости на плъхове от I опитна група.

При животните от втора опитна група се визуализираше костно примостяване по дължината на дефектите. В много по-голяма степен това бе изразено при левите дефекти, където костозаместителят е в комбинация с ЕПО (фиг. 8). При сравнението им с десните резултатите на 30-тия ден са статистически значими ($p<0.05$) и се запазват такива на 90-тия ден ($p<0.05$).



Фиг. 8 3D СТ изображения на калвариалните кости на плъхове от II опитна група.

Калвариалните дефекти на плъховете от трета опитна група останаха празни до края на опита (фиг. 9). Отделни индивиди правеха изключение, като при тях на 90-тия ден се установиха единични костни формации в мястото на дефекта. При всички опитни групи, с изключение на третата, отчетените резултати от точковата система на 30-ти и 90-ти ден са статистически значими спрямо изходните нива. Данните са представени на таблица 4.



Фиг. 9 3D CT изображения на калвариалните кости на плъхове от III опитна група.

Таблица 4. Резултатите от точковата система за оценка на костното зарастване при плъховете от I, II, III опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден, представени като медиана (мин-макс).

Дефект		Ден 0 n=12	30-ти ден n=12	90-ти ден n=6
I опитна група	D1	0 (0-0)	2 (2-3) ^{a***}	2 (2-3) ^{a***}
	D2	0 (0-0)	1 (0-2) ^{a***b**}	2 (1-2) ^{a**}
II опитна група	D3	1 (1-1)	4 (2-4) ^{a***c**}	4 (3-4) ^{a***c*}
	D4	1 (1-1)	3 (1-3) ^{a***}	3 (3-4) ^{a***}
III опитна група	D5	0 (0-0)	0 (0-2)	1 (0-2)
	D6	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)

^{a**} $p < 0.01$; ^{***} $p < 0.001$ в рамките на една група спрямо ден 0; ^{b**} $p < 0.01$ между D1 и D2 през съответния период; ^{c*} $p < 0.05$; ^{c**} $p < 0.01$ между D3 и D4 през съответния период

Резултатите от изследването на костна плътност са представени на таблица 5.

Таблица 5. Резултатите от костната плътност, измерена в Хънсфилдови единици (НУ) при плъховете от I, II, III опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден, представени като медиана (мин-макс).

	Дефект	Ден 0 n=12	30-ти ден n=12	90-ти ден n=6
I опитна група	D1	1178 (1116-1238)	1400** (1312-1641)	1657*** (1479-1864)
	D2	1114 (1009-1193)	1257** (1144-1424)	1401*** (1354-1455)
II опитна група	D3	1964 (1896-2075)	2261*** (2116-2690)	2499*** (2250-2575)
	D4	1842 (1732-1957)	1983* (1736-2097)	2129*** (2004-2198)
III опитна група	D5	1132 (1076-1204)	1193* (1163-1275)	1250*** (1195-1359)
	D6	1140 (1070-1222)	1178 (1137-1225)	1168 (1152-1215)

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ в рамките на една група спрямо ден 0

Костната плътност на калвариалните дефекти (D1-D5), измерена в Хънсфилдови единици, се повиши статистически значимо още на 30-ти ден след оперативната интервенция и продължи да се покачва до 90-тия. Изключение правеше само десният дефект при животните от трета опитна група (D6), чиято стойност се запази приблизително еднаква и през трите периода на изследването.

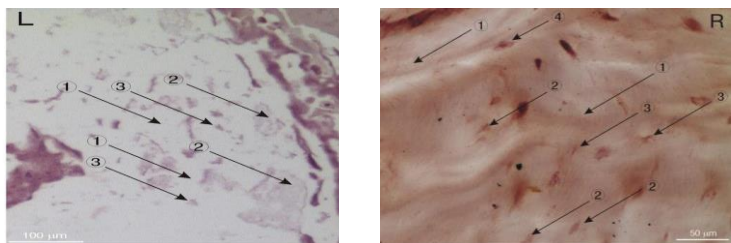
При сравнение между десния и левия калвариален дефект на плъховете от I опитна група се установи достоверна разлика и за трите периода на изследването ($p<0.01$).

Наблюдаваните разлики между двата дефекта при животните от II опитна група също са статистически значими и за трите периода на изследването ($p<0.001$), докато при тези от III опитна група достоверна разлика между левия и десния дефект бе установена само на 90-ти ден ($p<0.01$).

1.4. Хистологични изследвания

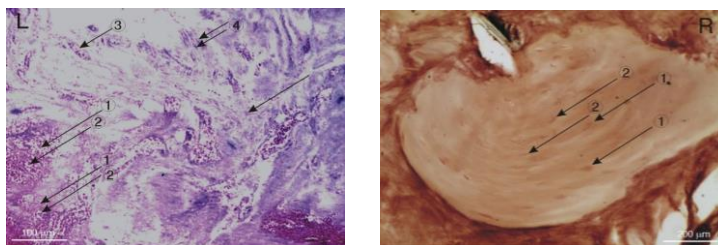
Микроскопски препарати на 30-ти ден:

При животните от първа опитна група установихме, че имплантираният конус бе напълно резорбиран. Десните дефекти бяха запълнени с фиброзна тъкан. Наблюдаваше се слаб инфилтрат от фибробласти и фиброцити в центъра и единични остеобласти по периферията. Централната част на левите дефекти бе заета от фиброзна тъкан. Костното зарастване започваше от периферията, близо до границите на костни дефект, където се установявиха остецити (фиг.10).



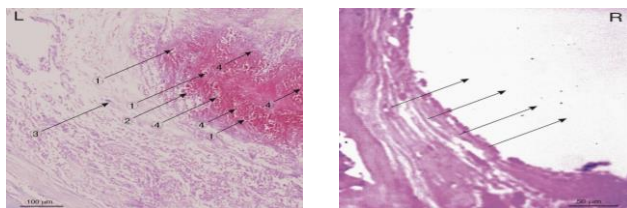
Фиг. 10 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от I опитна група на 30-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, x 200: 1-фиброзна тъкан; 2-новообразувана костна тъкан; 3 – остецити. Дясно (R) – оцветяване по Schmorl, x 400: 1-фиброзна тъкан; 2-фибробласти; 3-фиброцити; 4-остеобласти.

При животните от втора опитна група установихме, че и двата дефекта са изпълнени с костна тъкан, като в левите се наблюдаваха повече кръвоносни съдове (фиг. 11).



Фиг. 11 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от II опитна група на 30-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, x 200: 1-фиброзна тъкан; 2-хондробласти; 3 – хондроцити; 4-остеобласти. Дясно (R) – оцветяване по Schmorl, x 100: 1-остеобласт; 2-остеоцит.

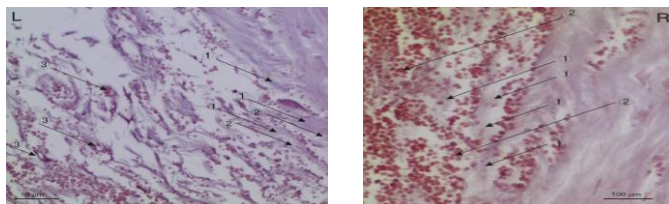
При животните от трета опитна група десните дефекти са празни (0т). При левите дефекти колагеновият конус бе резорбиран, в центъра се наблюдаваха фиброзна тъкан с фиброцити, хондроцити, а по периферията единични остеобласти (фиг. 12).



Фиг. 12 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от III опитна група на 30-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, х 200: 1-хондроцити; 2-кръвоносен съд; 3 – остеобласт; 4-фиброцити. Дясно (R) – оцветяване по ХЕ, х 100: дефектът е празен.

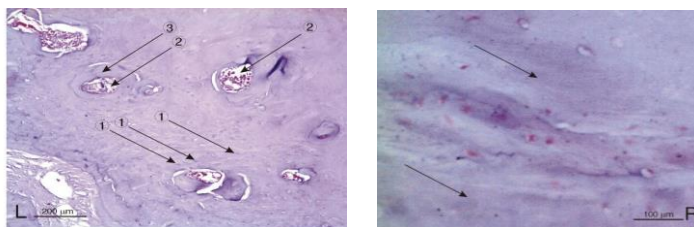
Микроскопски препарати на 90-ти ден:

Десните дефекти при животните от първа опитна група показаха оскъдно формиране на нова костна тъкан, като преобладаваше фиброзната такава. Левите дефекти бяха напълно регенерирали (фиг. 13). По периферията се наблюдаваше ламеларна кост. Липсваха възпалителни клетки, все повече присъстваха остеоцити и кръвоносни съдове.



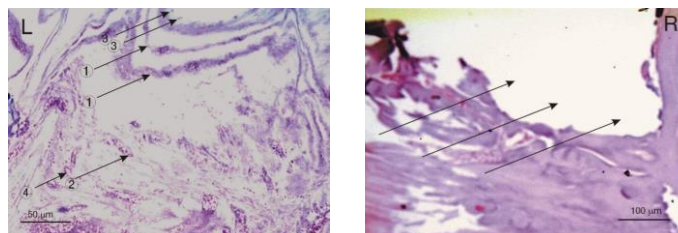
Фиг. 13 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от I опитна група на 90-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, х 100: 1-новообразувана костна тъкан; 2-остеоцити; 3 – кръвоносни съдове. Дясно (R) – оцветяване по ХЕ, х 200: 1-новообразувана костна тъкан; 2-фиброзна тъкан.

При животните от втора опитна група и двата дефекта бяха напълно регенерирали и запълнени с нова кост (фиг. 14). Броят на кръвоносните съдове в левите дефекти бе по-голям.



Фиг. 14 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от II опитна група на 90-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, x 200: 1-остеоцити; 2-кръвоносни съдове; 3 – новообразувана костна тъкан. Дясно (R) – оцветяване по ХЕ, x 200: новообразувана костна тъкан.

При трета опитна група десните дефекти бяха празни, докато при левите установихме осъждно формиране на нови трабекули и то само при някои индивиди (фиг. 15).



Фиг. 15 Хистологични препарати от калвариалните кости на плъховете от III опитна група на 90-ти ден. Ляво (L) – оцветяване по ХЕ, x 100: 1-единични трабекули; 2-хондроцити; 3 – остеобласти; 4-кръвоносни съдове. Дясно (R) – оцветяване по ХЕ, x 200: дефектът е празен.

2. Резултати от експерименталния модел за оценка ефекта на rhЕро върху регенерацията на дълги тръбести кости при плъхове

2.1. Клинични и параклинични изследвания

В следоперативния период плъховете бяха в добро общо състояние със запазен апетит. В бедрената област на оперирания крайник беше наблюдаван умерен оток, който при различните индивиди изчезваше в рамките на 3-5 дни. През първия ден след хирургическата интервенция животните обременяваха крайника, като проявяваха нискостепенна куцота, която след третия ден напълно отшумяваше.

Стойностите на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита при плъховете от шестте групи на 0, 30-ти и 90-ти ден са представени в таблица 6. Промените в показателите хемоглобин, хематокрит и еритроцити не бяха значими. Изключение правят животните от втора опитна група с общо приложение на ЕПО, при които се установи статистически достоверна разлика в измерените стойности и на трите показателя на 90-ти спрямо 0-вия ден.

Таблица 6. Стойности на еритроцитите, хемоглобина и хематокрита при плъховете от F1 – F6 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден, представени като медиана (мин-макс).

	Група	Ден 0	30-ти ден	90-ти ден
Еритроцити, Т/Л	F1	7.85 (5.75-8.53)	7.55 (6.01-7.87)	7.57 (6.53-7.90) ^{b***}
	F2	7.53 (6.17-8.73)	7.94 (5.44-8.87)	9.09 (8.45-9.30) ^{a**}
	F3	6.93 (6.01-7.98)	6.69 (5.70-7.41)	6.92 (6.25-7.30)
	F4	6.32 (5.07-7.79)	6.83 (5.78-7.71)	6.53 (6.06-7.71)
	F5	7.36 (6.66-8.86)	7.38 (5.36-8.50)	7.38 (6.90-8.25)
	F6	7.05 (5.55-8.01)	6.03 (6.44-8.62)	7.53 (6.90-7.76)
Хемоглобин, g/L	F1	149 (119-154)	145 (123-154)	144 (139-149) ^{b***}
	F2	140 (125-153)	150 (102-160)	162 (154-166) ^{a**}
	F3	142 (139-153)	137 (121-149)	140 (136-144)
	F4	138 (100-150)	142 (120-157)	139 (129-157)
	F5	141 (136-153)	141 (97-163)	142 (137-147)
	F6	143 (115-162)	137 (131-155)	147 (143-156)
Хематокрит, %	F1	43.7 (33.1-45.7)	42.3 (36.0-44.7)	44.7 (36.5-43.9) ^{b**}
	F2	40.4 (35.3-44.8)	44.3 (30.5-47.1)	47.6 (45.9-48.5) ^{a**}
	F3	39.6 (33.4-43.1)	38.3 (33.3-42.7)	39.3 (38.7-40.2)
	F4	35.1 (29.1-42.6)	38.3 (31.0-44.0)	38.3 (36.4-43.0)
	F5	41.5 (39.0-45.0)	39.8 (27.6-48.2)	41.4 (38.7-43.2)
	F6	38.3 (29.8-43.3)	39.7 (37.3-45.0)	41.0 (39.3-43.9)

a* p<0.05; a** p<0.01; a*** p<0.001 спрямо ден 0 в рамките на групата; b** p<0.01; b*** p<0.001 между F1 и F2 група в един и същи период

2.2. Рентгенографски изследвания

Резултатите от рентгеновото изследване са представени на таблица 7 и фиг. 16-21.

Таблица 7. Цифрово изражение на промените в рентгеновата картина при плъховете със сегментен костен дефект в бедрената кост, отчетени по точкова система и представени като медиана (мин-макс).

Група	Ден 0	30-ти ден	90-ти ден
F1	n=10 9 (9-9)	n=10 11 (11-11) ^{a***}	n=5 11 (11-11) ^{a**}
F2	n=10 9 (9-9)	n=10 11 (11-11) ^{a***}	n=5 11 (11-11) ^{a***}
F3	n=8 9 (9-9)	n=8 15 (11-16) ^{a**}	n=4 16.5 (14-19) ^{a** b*}
F4	n=10 9 (9-9)	n=10 16.5 (11-25) ^{a**}	n=5 22 (21-32) ^{a***}
F5	n=8 11 (11-11)	n=8 25.5 (22-28) ^{a*** c*}	n=4 24.5 (21-30) ^{a**}
F6	n=10 11 (11-11)	n=10 28 (25-34) ^{a***}	n=5 32 (25-34) ^{a**}

a* $p < 0.05$; a** $p < 0.01$; a*** $p < 0.001$ спрямо ден 0 в рамките на групата; b* $p < 0.05$ между F3 и F4 опитна група през съответния период; c* $p < 0.05$ между F5 и F6 опитна група през съответния период



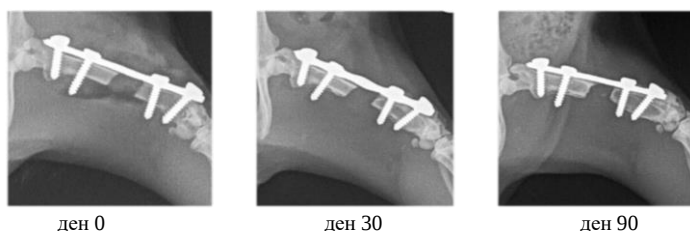
Фиг. 16 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция на бедрената кост при плъхове от F1 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.



Фиг. 17 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция на бедрената кост при плъхове от F2 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.

При животните от контролната група (F1), както и при тези с общо приложение на еритропоетин (F2), признаци на костно формиране не бяха установени. В отделните периоди на изследването ясно си личаха линиите на остеотомия и създаденият костен дефект.

При групата с локално приложение на ЕПО (F4) се индуцираше костно образуване около краищата на гостоприемниковата кост, като резултатите на 30-ти и 90-ти спрямо 0-я ден бяха статистически достоверни. В сравнение с групата, на която е приложен колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор (F3) разликата на 90-тия ден беше значима ($P < 0.05$), което води до намаляване на обема на костния дефект и образуване на костни мостове при животните от F4. Върху рентгенограмите се установява нехомогенна сянка с повишена плътност в резултат на новообразуваната костна тъкан.



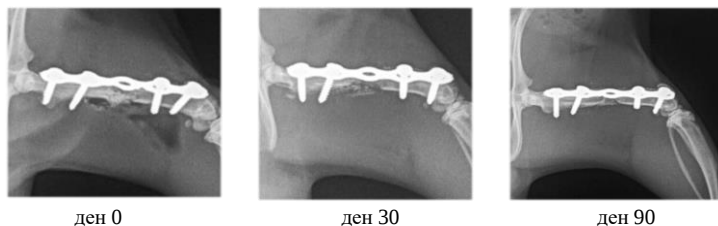
Фиг. 18 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция на бедрената кост при плъхове от F3 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.



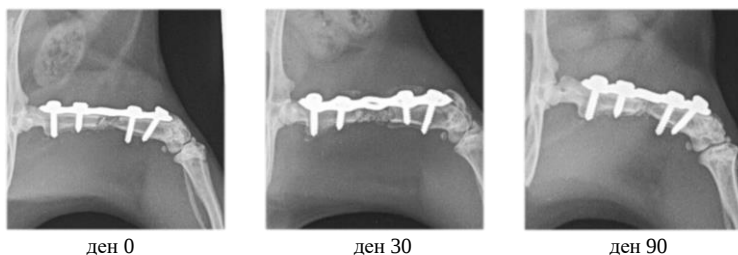
Фиг. 19 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция проекция на бедрената кост при плъхове от F4 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.

Върху рентгенограмите на животните, на които е приложен костозаместител, последният се визуализираше като силна нехомогенна сянка и бе рентгенологично видим от началото на експеримента до самия край. Костно срастване на ксенотрансплантата с гостоприемниковата кост не се наблюдаваше при животните, на които бе приложен в комбинация с

физиологичен разтвор (F5). Костно формиране се установи при пациентите от групата, където костозаместителят бе използван съвместно с еритропоетин (F6). Статически значима разлика между двете групи бе установена на 30-тия ден ($P < 0.05$).



Фиг. 20 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция на бедрената кост при плъхове от F5 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.



Фиг. 21 Рентгенографски изображения в anteriор-постериорна проекция на бедрената кост при плъхове от F6 опитна група на 0, 30-ти и 90-ти ден.

Получените резултати от измерването на показателя относителна рентгенова плътност са представени на таблица 8.

Промени в стойността на ОРП се установяват и при шестте опитни групи през целия период на изследването. Обработването на резултатите показва наличие на статистически значима разлика при групите F1-F4 на ден 30-ти спрямо ден 0, както и на ден 90-ти спрямо ден 0. Статистически достоверни бяха стойностите на 90-тия ден в сравнение с 30-тия ден отново за четирите групи.

Наблюдаваните промени при групите F5 и F6 също показват тенденция към повишаване на относителната рентгенова плътност, но стойностите на 90-тия ден спрямо предходните периоди не бяха статистически значими.

При сравнение между стойността на ОРП при плъхове от контролната група (F1) и тези с общо приложение на ЕПО (F2), достоверна разлика е установена единствено на 30-ти ден ($p < 0.01$).

Таблица 8. Стойности на относителна рентгенова плътност на бедрените кости при плъхове, представени като медиана (мин-макс).

Дефект	Ден 0	30-ти ден	90-ти ден
F1	n=10 0.60 (0.47-0.63)	n=10 0.66 ^{a***} (0.64-0.71)	n=5 0.75 ^{a*** b***} (0.73-0.77)
F2	n=10 0.52 (0.43-0.63)	n=10 0.71 ^{a***} (0.69-0.73)	n=5 0.76 ^{a*** b***} (0.73-0.78)
F3	n=8 0.66 (0.54-0.68)	n=8 0.70 ^{a***} (0.65-0.74)	n=4 0.75 ^{a*** b**} (0.73-0.77)
F4	n=10 0.65 (0.60-0.69)	n=10 0.72 ^{a***} (0.68-0.76)	n=5 0.85 ^{a*** b***} (0.77-0.86)
F5	n=8 0.86 (0.74-0.88)	n=8 0.87 (0.84-0.94)	n=4 0.92 (0.87-0.96)
F6	n=10 0.87 (0.75-0.90)	n=10 0.92 (0.84-0.95)	n=5 0.98 (0.90-0.99)

^{a***} $p < 0.001$ в рамките на една група спрямо ден 0; ^{b**} $p < 0.01$; ^{b***} $p < 0.0001$ в рамките на една група спрямо 30-я ден.

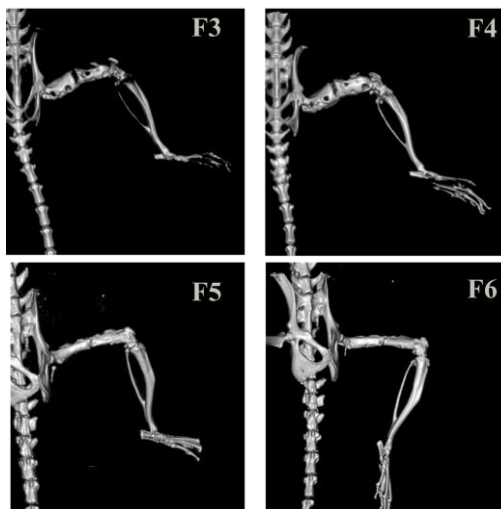
Статистически значима бе и разликата, наблюдавана на 90-ти ден между плъховете с локално приложение на колагенов конус, напоен с физиологичен разтвор (F3), и плъхове с локално приложение на колагенов конус, напоен с ЕПО (F4) ($p < 0.05$), както и между плъховете, на които бе приложен костозаместител в комбинация с колагенова мембрана, напоена с физиологичен разтвор, и плъховете с приложение на костозаместител в комбинация с колагенова мембрана, напоена с еритропоетин ($p = 0.05$).

2.3. Компютърно-томографски изследвания

При извършените компютърно-томографски изследвания се установи, че критичният дефект при плъхове от F3-F6 опитна група е запълнен с новообразувана костна тъкан. При дефектите от F3 и F4 опитна група се наблюдаваше примостяване и костно свързване на проксималния с дисталния фрагмент, като в много по-голяма степен това бе изразено при животните, на които бе приложен колагенов конус в комбинация с еритропоетин.

При животните от F5 и F6 опитна група, на които бе приложен костозаместител самостоятелно или в комбинация с ЕПО, дефектите са със

значително намалени размери. Наблюдаваше се контакт на кортекс с кортекс, но все още се визуализираше фрактурната линия (фиг. 22).



Фиг. 22 3D CT изображения на плъховете от F3-F6 опитна група, при които се наблюдава костно зарастване, на 90 ден.

2.4. Остеоденситометрия

Резултатите от DEXA изследването показаха, че костната плътност на левите бедрени кости, които са претърпели костна регенерация, е по-висока в сравнение с десните, които са здрави (табл. 9). Разликите в стойностите между отделните опитни групи не бяха статистически значими. Достоверна бе разликата, установена между десен и ляв крайник при животните от F6 опитна група ($p < 0.05$), на които бе прилагана комбинация от костозаместител и еритропоетин върху колагенов носител.

Таблица 9. Стойности на костната плътност, измерена в g/cm^2 , на бедрените кости при плъхове от F4, F5 и F6 опитна група на 90-ти ден, представени като медиана (мин-макс).

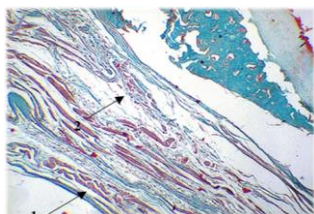
	F4 група (n=5)	F5 група (n=4)	F6 група (n=5)
Десен крайник	0.303 (0.217-0.396)	0.318 (0.240-0.384)	0.320* (0.266-0.396)
Ляв крайник	0.378 (0.335-0.408)	0.400 (0.311-0.420)	0.430 (0.380-0.513)

* $p < 0.05$ между десен и ляв тазов крайник в съответната група

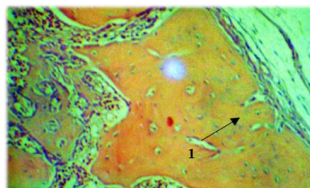
2.5. Хистологични изследвания

Микроскопски препарати на 30-ти ден:

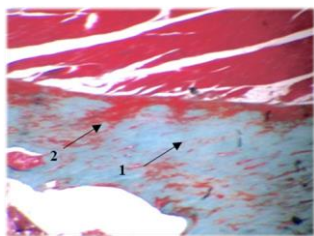
На всички хистосрези добре се открояваше линейната разрезна повърхност на пурпурно-червено оцветените микроструктурни елементи от експерименталния колагенов носител, който контактуваше най-често с биопатни хрущялни фрагменти. На повечето от хистологични срези хрущялните фрагменти показваха морфологични признаци на трансформация в ламеларна костна тъкан, но в различна степен от процеса.



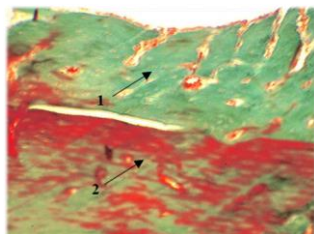
Фиг. 23 – Плъх от първа опитна група на 30-ти ден: 1-мускулни влакна; 2-единични фибри и снопчета от преколагенни и колагенни влакна; Оцветяване – MGT, x 100.



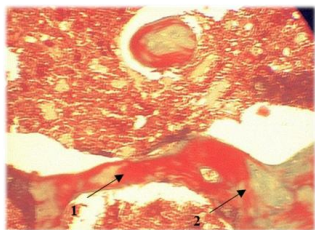
Фиг. 24 – Плъх от втора опитна група на 30-ти ден: 1-недиференцирани клетъчни елементи подобни на мезенхимните; Оцветяване – ХЕ, x 125.



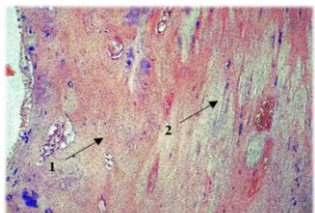
Фиг. 25 – Плъх от трета опитна група на 30-ти ден: 1-хрущялен фрагмент; 2-елементи от експериментален колагенов носител; Оцветяване – MGT, x 125.



Фиг. 26 – Плъх от четвърта опитна група на 30-ти ден: 1-хрущялна тъкан; 2-елементи от експерименталния колагенов конус. Оцветяване – MGT, x 125.



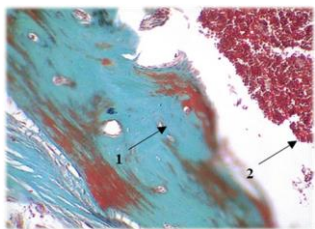
Фиг. 27 – Плът от пета опитна група на 30-ти ден: 1-елементи от експерименталния колагенов носител; 2-хрущялна тъкан; Оцветяване – MGT, x 125.



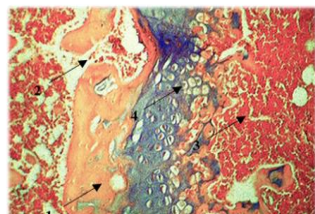
Фиг. 28 – Плът от шеста опитна група на 30-ти ден: 1-хрущялна тъкан; 2-началната диференциация в костна тъкан. Оцветяване – ХЕ, x 125.

Микроскопски препарати на 90-ти ден:

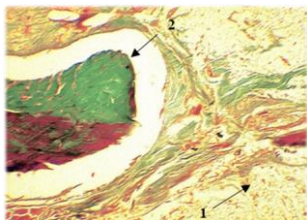
Във всички срези зрителната микроскопска повърхност показва, в посока от съединителнотъканните покрития към вътрешността на биопатите, наличието на активни процеси, включващи трансформация на хрущялната в костна тъкан, започваща диференциация на грубовлакната в ламеларна костна тъкан и начало при формирането на костна канална система и костен мозък.



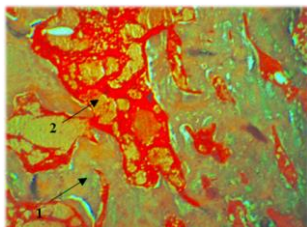
Фиг. 29 – Плът от първа опитна група на 90-ти ден: 1-хрущялна тъкан; 2-функционално пълноценен червен костен мозък. Оцветяване – MTG, x 125.



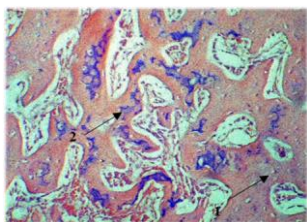
Фиг. 30 – Плът от втора опитна група на 90-ти ден: 1-зряла хиалинна хрущялна тъкан; 2-ламеларна костна тъкан; 3-червен костен мозък; 4-бяла мастна тъкан. Оцветяване – ХЕ, x 125.



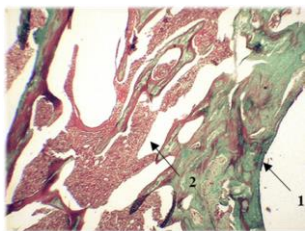
Фиг. 31 – Плъх от трета опитна група на 90-ти ден. 1-аморфно вещество, обграждащо биопатния материал; 2-хрущялна тъкан; Оцветяване – MGT, x 100.



Фиг. 32 – Плъх от четвърта опитна група на 90-ти ден: 1- грубовлакнеста костна тъкан; 2- ламеларна костна тъкан; Оцветяване – MGT, x 125.



Фиг. 33 - Плъх от пета опитна група на 90-ти ден: 1-хрущялна тъкан; 2-ламеларна костна тъкан, но в различна степен от процеса; Оцветяване – ХЕ, x 120.



Фиг. 34 – Плъх от шеста опитна група на 90-ти ден: 1-трансформиращата се хрущялна в костна тъкан; 2- диференциращата се грубовлакнеста в ламеларна костна тъкан; Оцветяване – MGT, x 120.

3. Резултати от приложението на rhЕро при котки с фрактури на бедрена кост

3.1. Клинични и параклинични изследвания

В следоперативния период животните не показаха отклонения в общото състояние. Вътрешната телесна температура, пулсът и дишането бяха в референтните за вида граници. В бедрената област се установяваше

умерен оток, слабо болезнен и леко темпериран, който в рамките на 3 дни отшумяваше. Котките започваха да обременяват крайника на 1-2-ри ден след операцията, а в края на първата седмица куцотата изчезваше и те използваха крайника активно.

Получените резултати от параклиничните изследвания са показани на таблица 10 и 11. Всички изследвани показатели бяха в референтните за вида стойности. Броят на левкоцитите бе най-висок на изходното ниво, след което значително се понижи от $18,09 \pm 3,21$ на $8,79 \pm 1,73$ през 3-тата седмица. До края на изследването стойността им се повишаваше, но без достоверна разлика. Еритроцитите, хемоглобина и хематокрита показяха тенденция за постепенно повишаване на техните стойности, но и при трите показателя статистически значима разлика спрямо изходните нива се установи на 8-мата седмица, която бе съответно – $p < 0.001$ за еритроцитите, $p < 0.01$ за хемоглобина и $p < 0.05$ за хематокрита.

Таблица 10. Средни стойности $\pm$ SEM на хематологичните показатели при котки (n=6) през отделните периоди на изследване.

	WBC, G/L	Er, T/L	HGB, g/L	HCT, %	PLT, G/L
	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
0 h	$18,09 \pm 3,21$	$6,13 \pm 0,51$	$90,17 \pm 6,38$	$26,87 \pm 1,60$	$243,67 \pm 61,51$
1 w	$15,29 \pm 2,96$	$6,27 \pm 0,47$	$93,00 \pm 7,53$	$27,73 \pm 2,43$	$262,83 \pm 66,45$
2 w	$13,16 \pm 2,53$	$7,73 \pm 0,57$	$109,33 \pm 7,81$	$33,73 \pm 2,41$	$367,33 \pm 47,32$
3 w	$8,79 \pm 1,73^*$	$7,64 \pm 0,51$	$106,00 \pm 4,15$	$31,92 \pm 1,42$	$316,83 \pm 58,45$
4 w	$15,28 \pm 2,68$	$7,50 \pm 0,80$	$102,17 \pm 7,08$	$30,77 \pm 2,78$	$322,00 \pm 73,39$
6 w	$11,77 \pm 1,77$	$7,76 \pm 0,66$	$106,83 \pm 8,30$	$32,60 \pm 1,99$	$261,33 \pm 86,61$
8 w	$9,38 \pm 0,88$	$9,23 \pm 0,58^{****\#}$	$122,17 \pm 5,63^{**\#}$	$35,95 \pm 1,46^{*\#}$	$206,07 \pm 48,25$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $p < 0.001$ спрямо 0h; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ спрямо 1w

Общият **калций** в кръвта се понижава незначително на 1-вата седмица след оперативната интервенция, след което се повишава, за да достигне своя максимум през 2-рата седмица. От 3-та седмица стойностите му плавно се понижават и остават относително постоянни до края на изследването.

Общото количество на **фосфора** се увеличава незначително в края на 1-вата седмица, след което показва тенденция за понижаване, достигайки

минимума през 4-та седмица. В последните два периода на изследването стойностите му са близки до изходните нива.

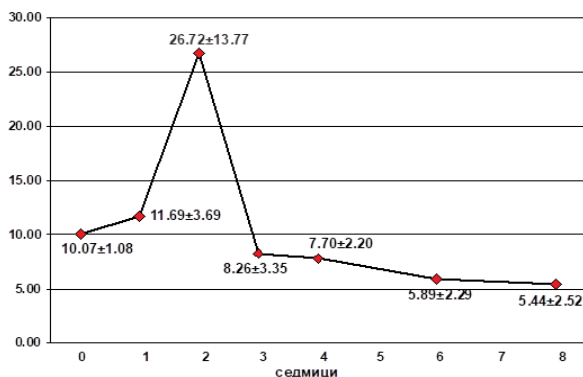
За разлика от фосфора, стойностите на **общата алкална фосфатаза** варират в широки граници, като най-високи са те през 2-ра и 3-та седмица, най-ниски през 4-та и отново завишени през последните два периода. Промените и при трите показателя не са статистически достоверни.

Таблица 11. Средни стойности $\pm$ SEM на биохимичните показатели при котки (n=6) през отделните периоди на изследване.

	Ca, mmol/L	P, mmol/L	ALP, U/L
	n=6	n=6	n=6
0 h	2,31 $\pm$ 0,06	1,89 $\pm$ 0,29	94,50 $\pm$ 35,71
1 w	2,22 $\pm$ 0,13	2,07 $\pm$ 0,23	89,50 $\pm$ 33,84
2 w	2,72 $\pm$ 0,14	2,08 $\pm$ 0,24	102,50 $\pm$ 36,91
3 w	2,51 $\pm$ 0,15	1,91 $\pm$ 0,17	138,17 $\pm$ 32,70
4 w	2,29 $\pm$ 0,15	1,74 $\pm$ 0,18	59,83 $\pm$ 14,72
6 w	2,44 $\pm$ 0,14	1,97 $\pm$ 0,14	116,50 $\pm$ 39,61
8 w	2,53 $\pm$ 0,14	1,99 $\pm$ 0,212	144,00 $\pm$ 33,78

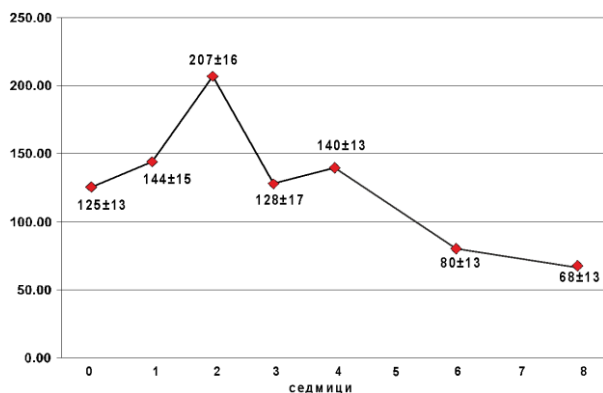
3.2. Изследване на костни маркери

Активността на **костно-специфичната алкална фосфатаза (BALP)** се повишава значително през първите две седмици след извършване на оперативната интервенция (фиг. 35). Статистически достоверна е разликата в получените стойности на 2-рата седмица спрямо началния период ($p<0.001$) и спрямо 1-ва седмица ($p<0.001$). След този пик, настъпващ през втората седмица, се наблюдава значително понижаване на показателя на 3-та, 4-та, 6-та и 8-ма седмица. И при четирите периода степента на достоверност е ($p<0.001$).



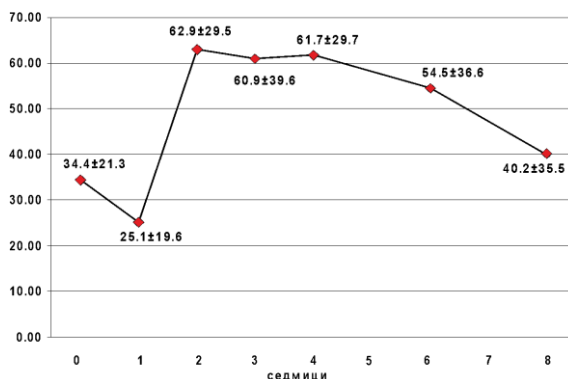
Фиг. 35 Промени в кръвните нива на костно-специфичната алкална фосфатаза (BALP) при котки (n=6) с остеосинтеза с планка, на които е приложен локално еритропоетин. Данните са представени в ng/ml като средно аритметично ± SD.

N-пропептидът на проколаген тип I (PINP) показва тенденция за повишаване, чийто пик се достига на 2-ра седмица (фиг. 36). След това стойностите му постепенно се понижават и достигат статистически значими разлики на 6-та (от 207 ± 16 ng/ml до 80 ± 13 ng/ml при $p < 0,01$) и 8-ма седмица (от 207 ± 16 ng/ml до 68 ± 13 ng/ml при $p < 0,001$).



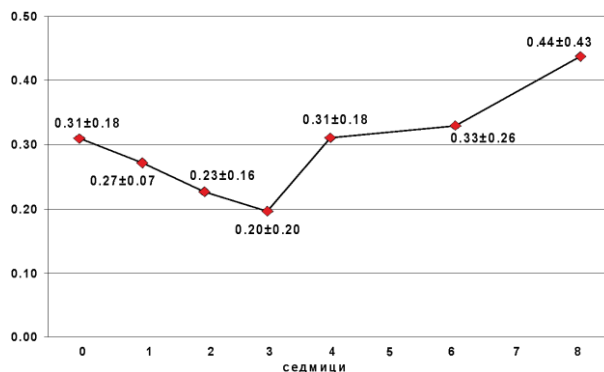
Фиг. 36 Промени в кръвните нива на N-пропептид на проколаген тип I (PINP) при котки (n=6) с остеосинтеза с планка, на които е приложен локално еритропоетин. Данните са представени в ng/ml като средно аритметично ± SD.

Дезоксипиридинолинът (DPD) се понижава незначително през 1-вата седмица, нараства два пъти и половина пъти, достигайки пик от 62.9 ± 29.5 ng/ml през 2-рата седмица, след което не се променя статистически достоверно до края на периода на изследване (фиг. 37).



Фиг. 37 Промени в кръвните нива на дезоксипиридинолина (DPD) при котки (n=6) с остеосинтеза с планка, на които е приложен локално еритропоедин. Данните са представени в ng/ml като средно аритметично $\pm$ SD.

Стойностите на С-терминалния телопептид на колаген тип I (СТХ) намаляват от началото до 3-та седмица, след което до края постепенно нарастват, но и в двата случая без статистически значима разлика между отделните периоди (фиг. 38).

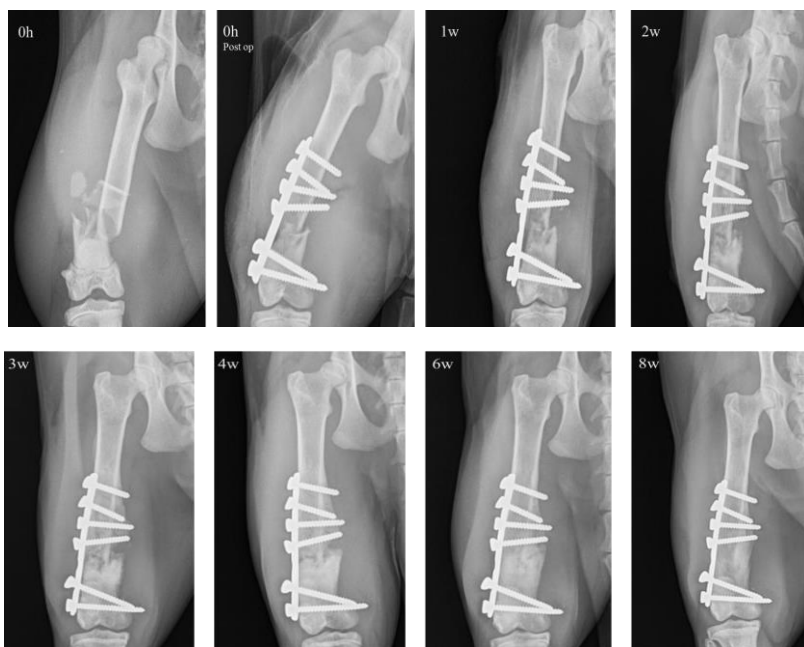


Фиг. 38 Промени в кръвните нива на С-терминален телопептид на колаген тип I (СТХ) при котки (n=6) с остеосинтеза с планка, на които е приложен локално еритропоедин. Данните са представени в ng/ml като средно аритметично $\pm$ SD.

3.3. Рентгенографски изследвания

През първата седмица след остеосинтезата се установява намалена рентгенова плътност в мястото на фрактурната линия, съответстващо на настъпващата костна резорбция в краищата на костните фрагменти. Костното образуване става рентгенологично видимо през втората седмица, когато в мястото на фрактурата започват процесите на калцификация (фиг. 39).

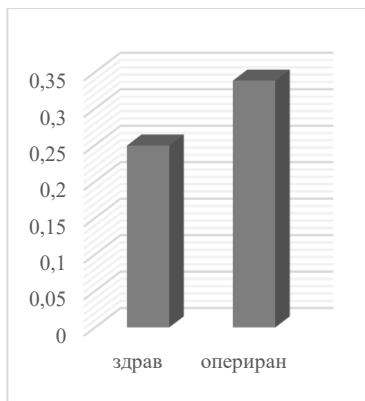
Костното зарастване се проявява през трета и четвърта седмица. Фрактурната линия постепенно се запълва от формирания периостален и ендоостален калус, докато напълно изчезне през шеста седмица. Признаци на ремоделиране се установяват през осмата седмица, когато костта се възвръща към първоначалната си форма.



Фиг. 39 Промени в рентгеновата картина при котка с остеосинтеза с пластина и винтове, на която е приложен локално еритропоедин, през отделните периоди.

3.4. Остеоденситометрия

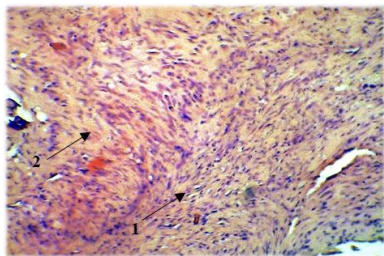
Два месеца след оперативната интервенция и след отстраняване на металните импланти за остеосинтеза се установява повишаване в стойностите на костната минерална плътност на бедрената кост на оперирания спрямо неоперирания крайник, но без тази разлика да бъде статистически достоверна (фиг. 40).



Фиг. 40 Промени в костната минерална плътност на бедрената кост при котки (n=6) в g/cm².

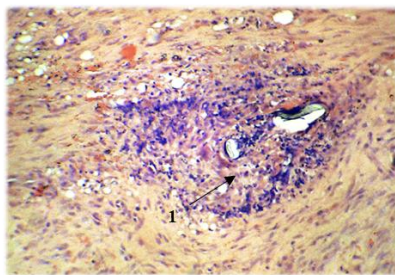
3.5. Хистологично изследване

При изследваните хистосрези беше установено наличие на новосъздадена гъста кръвоносна мрежа от различни по диаметър капилярни съдове сред активно развиващата се грануляционна тъкан (фиг. 41).



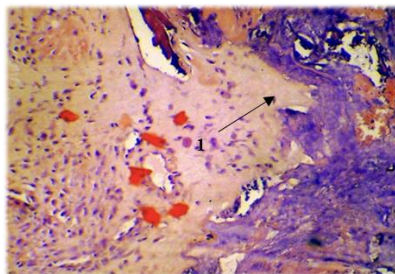
Фиг. 41 Биоптат от котка, 2 седмици след операция: 1-новосъздадена кръвоносна мрежа; 2-грануляционна тъкан; Оцветяване – ХЕ, x 100.

Значим бе броят на изследваните хистосрези, в които се открояваха перивазални клетъчни сгрупвания. Това бяха предимно венули, артериоли, рядко малки вени и артерии. Внимателният „прочит” на контрастно базифилно оцветените перивазални клетъчни сгрупвания открояващи се на цветовия фон от околни тъкани установи, че това бяха предимно различни според матurationния им период лимфоцити (фиг. 42). При тези срези кръвоносните съдове в биоптатите са дилатирани или съдържат в лумена си различни количества клетъчни елементи на цяла кръв.



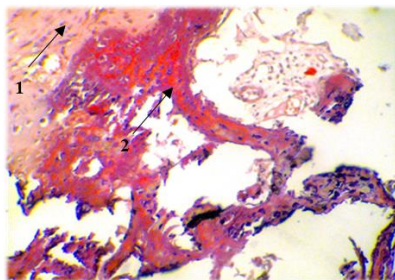
Фиг. 42 Биоптат от котка, 2 седмици след операция: 1-перивазални клетъчни струпвания от лимфоцити; Оцветяване – ХЕ, х 100.

Някои препарати притежаваха срези, част от които с базофилното си оцветяване и своята микроструктурираност, доказаха наличието на хрущялна тъкан в биоптатите. Всеки един от тези препарати разкрива зони освен с изградена, така и новосъздадена хрущялна тъкан (фиг. 43).



Фиг. 43 Биоптат от котка, 2 седмици след операция: 1-новосъздадена хрущялна тъкан; Оцветяване – ХЕ, х 100.

Изследваните срези доказаха наличието на остеогенеза в биоптатния материал. В него се наблюдава, на разрезната хистологична повърхност, начални процеси от трансформация на хрущялна тъкан в костни гредици и фрагменти (фиг. 44).



Фиг. 44 Биоптат от котка, 2 седмици след операция: 1-хрущялна тъкан; 2-костна тъкан; Оцветяване – ХЕ, х 100.

ИЗВОДИ

1. Проведените експериментални изследвания показват, че еритропоетинът притежава остеоиндуктивен потенциал и води до костна регенерация на критични дефекти върху плоски и тръбести кости при плъхове.
2. Локалното приложение на еритропоетин ускорява процесите на костно зарастване при котки с фрагментирана фрактура на бедрената кост.
3. Опитните постановки при плъхове с дефекти на плоски и тръбести кости, установяват най-добри резултати от локалното приложение на еритропоетин в комбинация с колагенов конус и костозаместител.
4. Еритропоетинът потенцира остеокондуктивните качества на ксенографта от спонгиозни гранули, използван като костнозаместващ материал при всички опитни постановки.
5. Еритропоетинът, приложен локално върху колагенов носител, има способност да индуцира костното зарастване, докато еднократното му интраперитонеално приложение във висока доза повлиява в незначителна степен костното формиране.
6. При експериментални и клинични пациенти локалното приложение на ЕПО не оказва системен ефект върху организма, докато интраперитонеалното му инжектиране при плъхове повишава общия брой на еритроцитите и стойностите на хемоглобина и хематокрита.
7. Компютърната томография значително превъзхожда класическата рентгенография при образна диагностика в областта на главата, предоставяйки възможност за по-ранна визуализация на костния калус.
8. Остеоденситометрията е неинвазивен метод за определяне на костната минерална плътност, който може да се използва за оценка на здравината на новоформирания костен калус.
9. След локално приложение на ЕПО и остеосинтеза с метална пластина при котки с фрагментирани фрактури на бедрената кост,

рентгенографски признаци на костно зарастване се установяват в периода от трета до шеста седмица.

10. При зарастването на фрактури след локално приложение на еритропоетин при котки, костно специфичната алкална фосфатаза (BALP) и N-пропептида на проколаген тип I (PINP) достигат своя пик на 2-рата седмица след оперативната интервенция.
11. Стойностите на C-терминалния телопептид на колаген тип I (CTX) при котки след остеосинтеза и локално приложение на еритропоетин са най-ниски през втора седмица след оперативната интервенция, а тези на дезоксипиридинолина (DPD) - на трета седмица, след което постепенно се повишават до края на изследването.
12. Стойностите на калция и фосфора, както и активността на общата алкална фосфатаза, не биха могли да послужат като маркери за процесите на костно зарастване.
13. Избраните хистологични методи за оцветяване предоставят възможност за ясно разграничаване на тъканите и за ранно установяване на настъпващите промени при формирането на костния калус (формиране на хрущялна тъкан, гъста мрежа от кръвоносни съдове и трансформация на хрущялна в костна тъкан).
14. Зарастването на критични костни дефекти, след приложение на еритропоетин се осъществява чрез енхондрална осификация.

ПРИНОСИ

1. Оригинални приноси

1. За пръв път е проучена възможността за клинично приложение на рекомбинантен човешки еритропоетин при котки с фрагментирани фрактури на бедрената кост с цел стимулиране на костното зарастване.
2. Направено е комплексно проучване, което позволява сравнение между зарастването на критични костни дефекти при плоски и тръбести кости на плъхове, след приложение на еритропоетин.
3. За пръв път е проучена комбинацията от спонгиозни гранули и ЕПО върху регенерацията на плоски и тръбести кости при плъхове.

4. Проследен е ефектът от приложението на еритропоетин върху костната минерална плътност чрез остеоденситометрия при експериментални животни и клинични пациенти.
5. Направена е образно-диагностична, биохимична и хистологична оценка на костното зарастване след стимулиране на процеса с еритропоетин при котки с фрагментирани фрактури на бедрената кост.

2. Потвърдителни приноси

1. Локалното приложение на еритропоетин, чрез напояването на колагенови гъби, е достъпен метод, който с успех може да се прилага за стимулиране на костната регенерация при критични дефекти.
2. Интраперитонеалното приложение на еритропоетин води до повишаване на общия брой еритроцити, хемоглобин и хематокрит в периферната кръв.
3. От хистологична гледна точка, костното зарастване при критични дефекти се осъществява чрез трансформация на хрущялна в костна тъкан.
4. Компютърната томография превъзхожда рентгенографията при проследяване процесите на костно образуване, костно зарастване и костна резорбция по отношение на образна детайлност и при отсъствие на фиксиращи елементи.

ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Локалното приложение на ЕПО може да се препоръча като метод за стимулиране на костното зарастване при критични дефекти и фрагментирани фрактури.
2. Комбинираното приложение на еритропоетин и ксенографт от спонгиозни гранули трябва да се предпочита пред самостоятелното им приложение, поради синергичния им ефект.
3. Нивата на костно специфичната алкална фосфатаза могат да се използват като надежден критерий за процесите на костно формиране при котки.

4. Остеоденситометрията е нов, неинвазивен и достъпен метод, който може да послужи при мониторинга на костното зарастване.

ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Vasileva R.** & Ts. Chaprazov. Preclinical studies on pleiotropic functions of erythropoietin on bone healing. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine, 2021, 24(1), 1-11.
2. **Vasileva R.**, Ts. Chaprazov & D. Sivrev. Histological evaluation of erythropoietin application on bone healing in rat calvaria. Egyptian Journal of Histology - Accepted for online publish on 01.06.2022
3. **Vasileva R.** Local application of erythropoietin and xenograft for enhancing bone regeneration. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine, 2022, 7, 1(12): 38-43.

ENGLISH SUMMARY

Erythropoietin (EPO) is a hormone, whose physiological function is to stimulate erythropoiesis. Its additional, pleiotropic functions are important for regenerative medicine. Available data on its osteogenic and angiogenic potential raised our interest to seek answers on questions associated with its effect on bone healing.

The main purpose of the present PhD thesis was to investigate the effect of EPO on regeneration of flat and long tubular bones with critical-size defects in rats and the potential for its application in cats with fragmented fractures of long tubular bones.

Experiments were conducted with 92 male skeletally mature Wistar albino rats. The clinical survey was performed on six mixed-breed cats aged 7.3 ± 4.3 months, with average body weight 2.17 ± 1.2 kg.

Bone formation was objectively evaluated by diagnostic imaging techniques – radiography, computed tomography, densitometry and non-invasive methods for monitoring bone markers dynamics. The use of an animal model in studies allowed also histological examination of bone healing.

The results from experiments demonstrated that the local application of EPO induced bone healing and did not exert any systemic effect, whereas its intraperitoneal application increased total red blood cell counts, haemoglobin content and haematocrit but without satisfactory clinical effect. Furthermore, EPO potentiated the osteoconductive properties of the xenograft from spongy granules used as bone substitute in experiments.

The clinical studies in cats with fragmented femoral fractures evidenced that erythropoietin offers a new alternative for bone healing enhancement.