

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА
СУГЛОБІВ ІМ. ПРОФ. М.І.СИТЕНКА АМН УКРАЇНИ»

На правах рукопису

Нікольченко Ольга Анатоліївна

УДК 576.2:616.71-003.93:546.41:578.08

**МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗУ В УМОВАХ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФЦИТУ
КАЛЬЦІЮ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Дисертація на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Науковий керівник
ДЄДУХ Нінель Василівна,
доктор біологічних наук,
професор

Харків – 2009

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1 Сучасний стан проблеми регенерації кісткової тканини	12
1.2 Вплив аліментарного дефіциту кальцію на кісткову тканину та репаративний остеогенез	16
1.3 Стромальні клітини кісткового мозку як джерело репаративного остеогенезу	22
РОЗДІЛ 2	
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	25
2.1 Матеріали дослідження	25
2.1.1 Моделювання аліментарного дефіциту кальцію у щурів	26
2.1.2 Моделювання травматичного ушкодження кістки	28
2.1.3 Тестування <i>in vivo</i> остеогенних властивостей клітин кісткового мозку	29
2.2 Методи дослідження	32
2.2.1 Гістологічний метод	32
2.2.2 Електронно-мікроскопічний метод	32
2.2.3 Морфометричні та статистичні методи	33
РОЗДІЛ 3	
СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ГУБЧАСТОЇ ТА КОМПАКТНОЇ ТКАНИН СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ	36
3.1 Структурна організація губчастої та компактної кістки після 1-місячної низькокальцієвої дієти	36

	3
3.2 Структурна організація губчастої та компактної кістки після 5-місячної низькокальцієвої дієти	50
3.3 Структурна організація губчастої та компактної кістки після 11-місячної низькокальцієвої дієти	58
РОЗДІЛ 4	
СТАДІЙНО-ЧАСОВІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ПРИ ВІДНОВЛЕННІ ЗМОДЕЛЬОВАНОГО ДЕФЕКТУ У МЕТАФІЗИ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ, ЯКИХ УТРИМУВАЛИ В УМОВАХ НИЗЬКОКАЛЬЦІЄВОЇ ДІЄТИ	68
РОЗДІЛ 5	
ВПЛИВ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ НА ПРОЯВ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ	110
5.1 Гістологічні особливості ектопічного остеогенезу після трансплантації клітин кісткового мозку щурів, яких утримували в умовах 5-місячної низькокальцієвої дієти	111
5.2 Гістологічні особливості ектопічного остеогенезу після трансплантації клітин кісткового мозку щурів, яких утримували в умовах 11-місячної низькокальцієвої дієти	117
РОЗДІЛ 6	
ЗАКЛЮЧЕННЯ	127
ВИСНОВКИ	133
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	136
ДОДАТКИ	157

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГАП	гідроксилапатит
ЕПС	ендоплазматична сітка
ДУ «ІПХС ім.проф.М.І.Ситенка АМНУ»	Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів імені професора М.І.Ситенка Академії медичних наук України»
ІІ	інтерлейкін
ІПФР	інсуліноподібний фактор росту
ГМ-КСФ	гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор (<i>син.</i> КСФ-1)
ККМ	клітини кісткового мозку
КМГБ(и)	кістковий морфогенетичний білок(и)
МДСК	малодиференційовані сполучнотканинні клітини
М-КСФ	макрофагальний колонієстимулювальний фактор
МСК	мезенхімальні стовбурові клітини
ПТГ	паратиреоїдний гормон (<i>син.</i> - паратгормон)
ССК	стовбурові стромальні клітини
ТЕМ	трансмісійна електронна мікроскопія
ТФР	трансформувальний фактор росту
ФНП	фактор некрозу пухлини
ФРЕС	фактор росту ендотелію судин
ФРТц	фактор росту тромбоцитів
ФРФ	фактор росту фібробластів
цАМФ	циклічний аденозинмонофосфат
ЦОГ	циклооксигеназа

ВСТУП

Актуальність теми

Репаративний остеогенез – це складний біологічний процес, який лежить в основі відновлення структурної організації кісткової тканини та цілісності кісток після ушкоджень. Кісткова тканина має генетично детерміновану властивість повної регенерації (реституції), але у 10-18% випадків спостерігається її порушення (дисрегенерація), що надає проблемі репаративної регенерації кістки фундаментального медико-біологічного значення [49, 52, 62].

Про актуальність проблеми репаративної регенерації кісткової тканини також свідчить офіційне визнання експертами ВООЗ, що травми опорно-рухової системи становлять серйозну медичну та соціально-економічну проблему суспільства, для вирішення якої необхідно провести «... активізацію досліджень по розробці ефективних профілактичних, лікувальних і діагностичних заходів [67, с. 4]»*.

На цей час накопичений значний обсяг знань стосовно закономірностей репаративного остеогенезу, на базі якого сформована концепція про можливість керування цим процесом [72, 93, 133]. Водночас отримані результати досліджень поставили і ряд нових питань щодо нерозкритих механізмів регуляції перебігу репаративного остеогенезу та впливу на ці механізми різних факторів.

На сьогоднішній день встановлено, що порушення репаративної регенерації кістки можуть викликати різні чинники, до яких належать попередні захворювання, пов'язані з порушенням структурно-функціонального стану кісткової тканини, зокрема, остеопороз [41, 50].

* Поворознюк В.В. Використання нестероїдних протизапальних препаратів у місцевій терапії у хворих різного віку з патологією кістково-м'язової системи / В.В.Поворознюк, І.К.Бабова, Т.В.Орлик. - Київ, 2004. - 29 с.

Низький вміст кальцію в раціоні харчування є одним із важливих чинників ризику виникнення структурних порушень кістки, що доведено численними експериментальними та клінічними дослідженнями [30, 48, 130, 153, 162, 172, 176, 178].

Епідеміологічні дані свідчать про недостатній вміст кальцію у раціоні харчування як дорослого, так і дитячого населення різних регіонів України [68], а також багатьох країн світу [42, 108, 147]. В Україні проблема «кальцієвого голоду» та дисрегенерації кістки при остеопорозі набуває особливої актуальності через несприятливі екологічні умови, пов'язані з аварією на Чорнобильській АЕС. Зокрема, остеотропний радіонуклід стронцію (Sr^{90}), а також свинець (Pb) конкурують із кальцієм при мінералізації кісткової тканини і тим самим порушують її структурно-функціональні властивості [12, 68, 75, 155].

Відомо, що у експериментальних тварин на фоні модельованого аліментарного дефіциту кальцію спостерігається порушення перебігу остеорепації [168, 169]. Невисвітленими залишаються морфологічні особливості формування кісткового регенерату на ранніх стадіях в умовах низькокальцієвої дієти. У зв'язку з цим дослідження стадійно-часових характеристик репаративного остеогенезу на клітинному та тканинному рівнях сприятиме розкриттю особливостей остеорепації в умовах аліментарного дефіциту кальцію та отриманню нових знань для наукового обґрунтування цілеспрямованої розробки заходів профілактики та коректної медикаментозної терапії порушень регенерації кістки у людини і тварин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДУ «ПХС ім.проф.М.І.Ситенка АМНУ» в рамках двох тем: "Розробити алгоритмізовану систему лікування хворих з переломами кісток, які перебігають на тлі остеопенії та остеопорозу (експериментально-клінічне дослідження)" (шифр ЦФ.2000.1.АМНУ, держреєстрація №0103U000264) (робота відзначена дипломом Президії АМНУ як краща, яка була виконана у

2004 році); ”Вивчити перебіг репаративного остеогенезу при травматичних ушкодженнях довгих кісток в умовах ендокринного остеопорозу“ (шифр ЦФ.2005.1.АМНУ, держреєстрація №0105U000963).

Мета роботи – вивчити морфологічні особливості перебігу репаративної регенерації кістки в умовах аліментарного дефіциту кальцію у лабораторних щурів.

Задачі дослідження:

1. Визначити структурні особливості губчастої та компактної тканин стегнової кістки щурів (самців та самиць) на різних термінах моделювання аліментарного дефіциту кальцію.
2. Вивчити вплив низькокальцієвої дієти на формування регенерату у змодельованому дефекті стегнової кістки щурів на основі ультраструктурного, гістологічного та гістоморфометричного аналізу.
3. Дослідити на гістологічному рівні прояв остеогенних властивостей клітин кісткового мозку, трансплантованих до ектопічної ділянки, у щурів з модельованим аліментарним дефіцитом кальцію.

Об’єкт дослідження: репаративна регенерація кісткової тканини та остеогенний потенціал клітин кісткового мозку в умовах низькокальцієвої дієти.

Предмет дослідження: губчаста та компактна кістка лабораторних щурів, регенерат у зоні дефекту стегнової кістки, прояв остеогенних властивостей клітин кісткового мозку на гістологічному рівні в ектопічній ділянці.

Методи дослідження: гістологічний аналіз – для оцінки загальних структурних змін у кістковій тканині, перебудови тканин в зоні ушкодження кістки та прилеглих до неї ділянках, складу тканин у порах імплантатів; морфометричний аналіз – для кількісної оцінки стану кісткової тканини, клітинного та тканинного складу кісткового регенерату, ектопічно утвореної кісткової тканини; електронно-мікроскопічний аналіз – для вивчення ультраструктурної організації клітин та матриксу кісткової тканини та

кісткового регенерату; статистичний аналіз – для оцінки статистичної достовірності отриманих цифрових даних.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше з використанням гістоморфометрії та електронної мікроскопії на моделі аліментарного дефіциту кальцію у щурів досліджений репаративний остеогенез на ранніх термінах (1-7 доба). Встановлено порушення перебігу регенерації кістки вже на запально-проліферативній стадії, яке було пов'язане з низькою функціональною активністю макрофагів, а також зі зменшенням кількості макрофагів, тканинних базофілів і фібробластів у зоні травматичного ушкодження порівняно з контрольною групою тварин. Це свідчить про уповільнення темпу катаболізму продуктів запалення і порушення процесу диференціювання клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів, що обумовлювало на подальших стадіях затримку реорганізації тканин регенерату – формування остеоїду, кісткових трабекул та відновлення кортикальної кістки (за типом затриманого первинного зрощення).

Вперше отримані нові знання щодо впливу низькокальцієвої дієти на прояв остеогенних властивостей клітин кісткового мозку, які трансплантовані в ектопічну ділянку (підшкірно) на носіях із пористого гідроксилапатиту. Встановлено, що низький вміст кальцію у раціоні харчування (як щурів-донорів, так і щурів-реципієнтів) пригнічує остеогенну активність клітин кісткового мозку. Внаслідок цього після 5-місячного дефіциту аліментарного кальцію площа та зрілість ектопічно утвореної кісткової тканини у порях керамічного імплантата менші порівняно з контролем, а після 11-місячного – ектопічний остеогенез не виявляється.

В роботі набуло подальшого розвитку експериментальне моделювання аліментарного дефіциту кальцію і отримані нові знання стосовно характеру структурних змін у кістковій тканині стегнової кістки щурів різної статі. На основі комплексного морфологічного дослідження одержані нові дані, які засвідчують, що у щурів обох статей атрофічні зміни прогресують,

насамперед, у губчастій кістці, а після 5-місячної дієти вони більш виражені у самців у порівнянні з самицями. Вперше доведено, що при нетривалому моделюванні (1 місяць) у компактній кістці самців переважає періостальна резорбція кістки, яка призводить до зменшення ширини зовнішніх генеральних пластинок. При тривалій дієті у тварин обох статей спостерігається звуження як ширини остеонного шару (5-місячна дієта), так і шару зовнішніх генеральних пластин (11-місячна дієта), що свідчить про зниження активності процесу кісткоутворення. Встановлено, що в умовах низькокальцієвої дієти (0,03% Ca) має місце активізація кісткової резорбції за остеокластичним, остеоцитарним, периканалікулярним та пазушним типами.

Практичне значення одержаних результатів

Виявлені особливості структурних змін кісткової тканини та перебігу репаративного остеогенезу в умовах аліментарного дефіциту кальцію можуть бути використаними в медицині та ветеринарній медицині як теоретичне підґрунтя для цілеспрямованої розробки комплексних заходів профілактики та лікування травматичних кісткових ушкоджень у пацієнтів і тварин зі зміненими якостями кісток внаслідок остеопенії та остеопорозу. Отримані результати можуть знайти практичне застосування при подальшому використанні досліджених у роботі експериментальних моделей з метою тестування фармакологічних препаратів та лікувальних засобів.

Результати дослідження впроваджено у навчальний процес і науково-дослідну роботу на кафедрі анатомії людини Луганського ДМУ, кафедрі нормальної анатомії людини Кримського ДМУ ім. С.І.Георгієвського, кафедрі анатомії та гістології ім. О.П.Ковальського Білоцерківського державного аграрного університету.

Особистий внесок здобувача

Автором особисто поставлені експерименти на щурах із відтворення всіх досліджуваних моделей, виконаний пошук та аналіз даних літератури, здійснена обробка матеріалу та виготовлення зрізів для електронно-мікроскопічного дослідження, проведено гістологічний, ультраструктурний,

гістоморфометричний аналіз та статистичну обробку цифрових даних. Автором самостійно узагальнені результати дослідження, обґрунтовані висновки.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертації оприлюднені на IV науково-практичній конференції «Морфогенез і патологія кісткової системи в умовах промислового регіону Донбасу» (Луганськ, 2003), V Українській конференції молодих вчених, присвяченій пам'яті акад. В.В.Фролькіса (Київ, 2004), XVIII науковій конференції гістологів «Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей», де робота була відзначена дипломом за кращу доповідь у номінації «Молодой ученый» (Санкт-Петербург, 2004), симпозіумі «Біологія опорно-рухового апарату (морфо-функціональні та клінічно-прикладні аспекти)» (Сімферополь-Ялта, 2004), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених і спеціалістів «Від фундаментальних досліджень до медичної практики» (Харків, 2005), I Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми біомінералогії» (Луганськ, 2005), II Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми біомінералогії» (Луганськ, 2006), науково-практичній конференції «Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика та лікування» (Євпаторія, 2006), IV Національному конгресі АГЕТ України (Сімферополь-Алушта, 2006), II Всеукраїнській школі «Фізіологія та морфологія тканин опорно-рухової системи в нормі і при ішемічних ушкодженнях» (Київ-Черкаси, 2007), 8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (Istanbul, 2008).

Публікації за темою дисертації

За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових робіт (6 тез та 9 статей), серед них 4 статті – у виданнях, рекомендованих ВАК України за фахом «біологія».

Обсяг та структура дисертації

Робота викладена на 124 сторінках основного тексту та складається зі вступу, 6 розділів, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Дисертація ілюстрована 85 рисунками (45 мікрофотографій, 29 електронограм, 2 схеми, 8 гістограм, 1 діаграма) та 16 таблицями, з яких 1 подана у додатках. Список використаної літератури містить 189 посилань (100 кирилицею та 89 латиницею). Бібліографічний опис джерел літератури, ілюстрації та додатки викладені на 34 сторінках.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасний стан проблеми регенерації кісткової тканини

Репаративний остеогенез (*син.* – репаративна регенерація кістки) – відновний формоутворюючий процес, викликаний ушкодженням кісткових структур. Кісткова тканина характеризується здатністю до повної регенерації або реституції (відновлення дефекту тканиною, яка ідентична до загиблої), для неї властива клітинна форма регенерації (шляхом проліферації за рахунок поділу клітин) [84], тому увага дослідників протягом останніх десятиріч зосередилась на визначенні та вивченні клітинних джерел формування повноцінного регенерату при відновленні кісткових ушкоджень.

У кістковій тканині постійно відбуваються процеси кісткоутворення та кісткової резорбції, пов'язані з функціонуванням клітин, які належать до двох основних клітинних диферонів – остеобластичного та моноцитарно-макрофагального [19, 29, 46, 77]:

- *остеобластичний диферон*: 1) стовбурові стромальні клітини (ССК); 2) преостеобласти (уніпотентні клітини-попередники остеобластів); 3) остеобласти → остецити (термінальний стан диференціації). В науковій літературі ССК та преостеобласти часто поєднують під назвою «клітини-попередники остеобластів» або «остеогенні клітини»;
- *моноцитарно-макрофагальний диферон*: 1) стовбурові кровотворні клітини; 2) напівстовбурові клітини мієлопоезу → уніпотентні колонієутворювальні моноцитарні клітини; 3) монобласти, промоноцити, моноцити кісткового мозку → моноцити периферійної крові → тканинні макрофаги (остеокласти - термінальний стан диференціації).

Успіх репаративного остеогенезу значною мірою залежить від клітин, які беруть участь у формуванні кісткового регенерату, здатні до проліферації та диференціації в остеобласти. Встановлено, що остецити незворотно

втрачають здатність до проліферації, а остеобласти виявляють вкрай низьку проліферативну активність [77], тому джерелом для формування кісткового регенерату є малодиференційовані (*син.* – детерміновані або прекомітовані) клітини-попередники остеобластів, проліферативна функція яких не заблокована. Визначено, що до таких клітин належать стовбурові стромальні клітини (ССК) кісткового мозку, клітини ендосту, внутрішнього шару періосту та каналів остеонів, а також периваскулярні клітини [44, 52, 57, 74, 173]. Є дані, що диференціюватись у остеобластичному напрямку можуть також недиференційовані (*син.* - індуцибельні або некомітовані) клітини, але лише після дії певних індукторів [23, 53, 187].

При порушенні цілісності кістки запускаються як локальні, так і системні події, які носять поєднаний характер [26, 84]. Складна система взаємодії між біологічно активними речовинами та клітинами регенерату розгортається як каскад реакцій, який призводить до зміни гістологічних картин у зоні ушкодження впродовж всього процесу репаративного остеогенезу [38, 49, 140].

На сьогоднішній день не існує єдиної класифікації стадій репаративного остеогенезу, та більшість з них побудовані на характеристиці місцевих змін клітинно-тканинного складу в зоні ушкодження. Різні автори виділяють від 3 до 8 стадій, пов'язаних з формуванням різних клітинних диферонів та гістіонів, які є гістологічними маркерами стадійності процесу [25, 37, 86]. На думку багатьох авторів, саме на знаннях про стадійні особливості репаративного остеогенезу повинна базуватись сучасна медикаментозна терапія травматичних кісткових ушкоджень [8, 28, 85, 140]. З цієї точки зору, найбільш задовільною та зручною є така класифікація стадій репаративного остеогенезу [38, 49]:

I стадія - травматичне запалення (0-5 діб після травми);

II стадія - диференціація клітин та формування тканинносPECIFICІЧНИХ структур у ділянці травмованої кістки (4-10 діб після травми);

III стадія - реорганізація тканинних структур та мінералізація (9-25 діб після травми, може тривати до 16 тижня);

IV стадія - ремоделювання (25-50 діб після травми);

V стадія - завершення (45 та більше діб після травми).

На стадії травматичного запалення регенерат в зоні кісткового ушкодження представлений осередками крововиливу (гематомою) та молодою грануляційною тканиною з клітинами запалення (нейтрофілами, лімфоцитами, макрофагами) та малодиференційованими клітинами, а також великою кількістю капілярів та тонкостінних судин. З часом молода грануляційна тканина перетворюється на зрілу, в якій переважають клітини фібробластичного диферону, що свідчить про початок репаративної стадії, для якої характерно диференціювання клітин та формування тканинноспецифічних структур. На цей період остеорепації в регенераті переважає фіброретикулярна тканина і водночас виявляються залишки грануляційної тканини та невеликі ділянки остеогенезу (або ділянки хондроїда). В англійській науковій літературі фіброретикулярну тканину визначають терміном «фіброзна тканина». Ми віддаємо перевагу терміну «фіброретикулярна тканина», запропонованому Т.П. Виноградовой та Г.И. Лаврищевой [13], тому що при травмуванні кісток до зони ушкодження, майже завжди, залучається кістковий мозок і його елементи, в тому числі ретикулярні клітини, які знаходяться у складі строми кісткового мозку, а термін «фіброретикулярна тканина» більш чітко це підкреслює (важливо відрізнити від терміна «ретикулофіброзна тканина», див. далі).

На стадії реорганізації тканинних структур та мінералізації в зоні кісткового ушкодження збільшується площа ділянок остеогенезу, які перетворюються на трабекули грубоволокнистої (*син.* ретикулофіброзної) кісткової тканини, що перемежаються із ділянками фіброретикулярної тканини. На останніх стадіях остеорепації в кістковому регенераті переважають новоутворені трабекули, які зазнають ремоделювання та перебудову незрілої грубоволокнистої кісткової тканини у зрілу

пластинчасту кісткову тканину з формуванням кістковомозкових просторів, заповнених елементами кісткового мозку. Рештки фіброретикулярної тканини поступово також заміщаються кістковою тканиною, і процес завершується реституцією з органотопічним відновленням кістки. При порушенні перебігу репаративного остеогенезу на будь-якій зі стадій процес набуває характеру патологічної регенерації (*син.* – дисрегенерації) [17, 84].

На даний час більшість науковців, які вивчають проблему репаративної регенерації кістки, підкреслюють важливість подій під час перебігу стадії травматичного запалення, тому що утворення гематоми та кооперативні взаємодії клітин, які беруть участь у запально-регенеративному процесі, закладають передумови перебігу подальших стадій регенерації і визначають результат репаративного остеогенезу [4, 17, 33, 95-97, 110, 118]. Ці події пов'язані з індукцією змін у локальних і системних регуляторних механізмах, в результаті чого стимулюється експресія цілого ряду факторів росту, цитокінів, гормонів, простагландинів, які забезпечують хемотаксис до осередку ушкодження клітин запалення, ССК кісткового мозку та фібробластів, а також індують проліферацію і диференціацію остеогенних клітин [86, 157, 180, 189]. Диференціація клітин-попередників остеобластів пов'язана зі зниженням транскрипції генів білків, які беруть участь у проліферації й адгезії клітин, та зі збільшенням транскрипції генів білків, специфічних для остеобластів: колагену I типу, неколагенових білків кісткового матриксу (остеокальцин, остеоонектин, остеоопонтин і кістковий сіалопротейн, КМГБи), а також лужної фосфатази [188].

Успіхи у вивченні механізмів репаративної регенерації, які були досягнуті останнім часом, дозволили сформулювати концепцію про феномени регіонарного та системного прискорення репаративного процесу, які полягають у синхронізації процесів «ушкодження – виділення остеоіндуктивних і остеоінгібіторних чинників, що є регуляторами для клітин» та дозволяють обґрунтувати закономірність зміни стадій репаративного остеогенезу [49, 101, 140, 151, 179].

На сьогоднішній день численними дослідженнями встановлений цілий ряд факторів, які впливають на репаративний остеогенез та можуть порушувати його перебіг, тому при відновленні ушкоджених кісток спостерігається значна варіабельність морфологічних картин, які виявляють стадійно-зонально-часову залежність [120, 189].

1.2 Вплив аліментарного дефіциту кальцію на кісткову тканину та репаративний остеогенез

Експериментальне моделювання патологічних процесів у тварин надає можливість отримати нові знання про механізми розвитку різних захворювань, у тому числі такого мультифакторіального захворювання, як остеопороз. На сьогоднішній день розроблений цілий ряд експериментальних моделей остеопорозу на тваринах [30, 91, 186].

Модель аліментарного дефіциту кальцію, як і інші моделі остеопорозу, використовується дослідниками для вивчення реакції кісткової тканини, що має остеопоротичні зміни, на дію фармакологічних препаратів [5, 6, 122, 131], імплантаційних матеріалів [71], при репаративній регенерації [14, 27, 132, 168].

Для відтворення моделі аліментарного остеопорозу дослідних тварин утримують на зерново-овочевій дієті з низьким вмістом кальцію терміном від 3 місяців та більше. На ранніх термінах цю модель більш коректно називати моделлю аліментарного дефіциту кальцію, відповідно до якої добовий вміст кальцію у раціоні харчування лабораторного щура, за даними різних авторів, складає 0,01 - 0,1 % (при нормі від 0,5 % до 1,85 %) [5, 116, 129, 130, 138, 160, 162, 176, 178].

Дієту з низьким вмістом кальцію також використовують як чинник, який прискорює розвиток та ступінь прояву кісткових порушень на інших моделях остеопорозу – постменопаузального [119, 158, 182],

глюкокортикоїд-індукованого [7], зумовленого невагомістю [181], проте механізми розвитку остеопоротичних змін у кістках тварин різні.

Основним джерелом надходження кальцію в організм є продукти харчування, що містять цей мінеральний елемент (молоко та молочні продукти, овочеві, зернобобові). Організм має здатність регулювати обмін кальцію в залежності від його вмісту у раціоні харчування і виявляє достатньо гнучку систему адаптації до різних рівнів споживання кальцію з харчами (у людини - від 200-300 до 1000-1200 мг на добу). Адаптація до низького вмісту кальцію у харчах досягається шляхом значного посилення його всмоктування у тонкому кишечнику (важлива роль регулятора належить вітаміну Д₃) та зменшення виділення з сечею [60]. Якщо аліментарний дефіцит кальцію перевищує реалізацію адаптивних можливостей цими шляхами, то пул кальцію крові поповнюється за рахунок використання кальцієвого резерву кісток шляхом підсилення кісткової резорбції та зниження кісткоутворення в процесі ремоделювання кісткової тканини. При цьому відбувається втрата мінеральної щільності кістки та розвиток порушень структурно-функціонального стану кісткової тканини [178]. Це, з одного боку, є одним із факторів ризику виникнення остеопенічних станів, які можуть призвести до остеопорозу та переломів кісток, а з іншого боку, являє той негативний фактор, на фоні якого відбувається регенерація.

Регуляція обміну кальцію в організмі пов'язана з регуляцією остеогенезу і здійснюється, головним чином, паратгормоном, кальцитоніном та кальцитріолом (вітамін D₃) [24, 45, 60, 70, 79]. При цьому, кальцієвий обмін пов'язаний з обміном фосфору, а тому більш коректним є термін «кальцій-фосфорний обмін» [46].

При зниженні кальцію в крові збільшується синтез та секреція ПТГ, основною дією якого на кісткову тканину є стимуляція кісткової резорбції шляхом активації остеокластів (остеокластична резорбція) та остеоцитів (остеоцитарний остеоліз). У остеокластів не виявлені рецептори до ПТГ, їх активацію опосередковують остеобласти.

В остеобластах ПТГ гальмує синтез РНК та колагену, що призводить до зменшення кількості матриксу, який утворюють ці клітини. Під його впливом зменшується активність лужної фосфатази, внаслідок чого зменшується мінералізація органічного матриксу кістки. Водночас ПТГ стимулює секрецію остеобластами колагеназ (металопротеїназ), які розчиняють проективний шар кісткового матриксу та підготовляють його поверхню до остеокластичної резорбції [99]. Але ПТГ здійснює складний подвійний вплив на кісткоутворення: може як стимулювати, так і гальмувати синтез колагену та кісткового матриксу. Так, безперервний короткотривалий вплив призводить до затримки формування нової кістки, тоді як імпульсний короткотривалий вплив стимулює синтез колагену та кісткоутворення. ПТГ стимулює синтез ІПФР-1, з яким пов'язують анаболічний ефект дії ПТГ [78].

В експерименті на щурах-самицях D.N.Kalu et al. [144] провели порівняльний аналіз моделей постменопаузального остеопорозу (оваріоектомія) та аліментарного остеопорозу (низькокальцієва дієта) після 6-місячного терміну їх відтворення. У тварин обох моделей була зменшена мінеральна щільність та вміст кальцію у кістках, водночас у сироватці крові оваріоектомованих щурів виявлявся менший вміст кальцитоніну та не спостерігалось достовірних змін вмісту ПТГ та $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$, тоді як у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію зростала концентрація ПТГ та $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$.

Важливе значення в контролі остеокластичної резорбції мають статеві гормони. Основна біологічна дія естрогенів та тестостерону на кісткову тканину полягає у зниженні швидкості її резорбції в результаті прямого впливу ПТГ на попередників остеокластів та блокування остеокластогенезу, тому зниження синтезу статевих гормонів вважається фактором ризику розвитку остеопорозу [45]. Естрогени здійснюють більш виражений «захисний» вплив, ніж тестостерон, а губчаста та компактна кістка по-різному «реагують» на вплив цих гормонів. Так, H.Seto et al. [168] виявили, що після короткотривалої (1-3 доби) низькокальцієвої дієти (0,05%) у щурів-

самців були зменшений об'єм губчастої кістки та збільшена кількість остеобластів та остеокластів та поверхні трабекул, тоді як компактна кістка не зазнала виражених змін. У роботі J.Iwamoto et al. [176] на щурах-самицях було показано, що низькокальцієва дієта (0,1%) протягом 2,5 місяців викликає зменшення площі компактної кістки за рахунок зниження періостального кісткоутворення та збільшення кістковомозкової порожнини, а у губчастій кістці на поверхні трабекул спостерігається збільшена кількість як остеокластів, так і остеобластів, і хоча процес кісткоутворення зменшений порівняно з тваринами контрольної групи, але в цілому зменшення площі трабекул у проксимальному відділі великогомілкової кістки не перебільшує «втрати» компактної речовини її діафіза.

При проведенні порівняльного дослідження впливу різного вмісту кальцію у раціоні харчування (0,02%, 0,5%, 1,0%, 1,75%) протягом 1 місяця на скелет самців та самиць щурів 6-місячного віку W.Geng та G.L.Wrighth [141] визначили, що зменшення кальцію у дієті (від 1,0% до 0,02%) супроводжувалось підсиленням загальної кісткової резорбції у 2 рази (оцінювали за вмістом ^3H -тетрацикліну у сечі). При цьому, у тварин обох статей не спостерігалось достовірних змін загальної маси тіла, а за оцінкою маси кісток «втрата» осьового скелету відбувалась швидше, ніж інших кісток скелету. У самиць загальна кісткова резорбція мала максимальний прояв вже при дієті з 0,05% вмістом кальцію, тоді як у самців – при 0,02%.

C.A.Peterson et al. [116] показали, що у 3-місячних щурів-самців після низькокальцієвої дієти (0,15%) тривалістю 2 місяці спостерігаються зменшення мінералізації кісткового матриксу та стимуляція кісткової резорбції, яка визначається меншим об'ємом губчастої кістки хребця порівняно з тваринами контрольної групи. У старих тварин (2-річний вік), не дивлячись на те, що зріла кістка має відносно «стабільну» структуру, аліментарний дефіцит кальцію також призвів до зменшення об'єму губчастої кістки, хоча менш вираженого, ніж у молодих щурів.

На моделі аліментарного дефіциту кальцію Н.Ж.Армбрехт та Л.Р.Форте [109] провели дослідження впливу віку тварин та терміну тривалості (1,5; 3; 4,5 та 6 місяців) низькокальцієвої дієти (0,02%) на зміну біохімічних показників ПТГ та $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$. Результати цього дослідження показали, що у щурів середнього віку (14-16 місяців) вміст ПТГ у сироватці крові повільно зростав у 2 рази, а $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ у сечі – також зростав, але достовірна різниця у порівнянні з контрольною групою була виявлена лише через 4,5 місяці дієти. Водночас у молодих щурів (3-місячного віку) вже через 1 місяць дієти рівень ПТГ був у 13 разів вищий за контрольні показники, а $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ – у 4 рази перевищував контроль. Автори підсумовують, що у дорослих щурів швидкість та величина метаболічної відповіді на тривалість низькокальцієвої дієти менші, ніж у молодих тварин.

Експериментальні дослідження репаративного остеогенезу при остеопорозі проведені переважно на моделях постменопаузального остеопорозу (оваріоектомія) [100, 135, 136, 139, 169] і глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу [30], та пов'язані, в основному, з вивченням мінеральної щільності кісткової тканини та механічних властивостей регенерату.

При дослідженні репаративного остеогенезу у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію встановлено, що загоєння переломів кісток проходить ті ж самі стадії, що й у тварин контрольних груп, і завершується зрощенням перелому, але процес загоєння є пролонгованим у часі [168]. Проте у цих роботах виявляються суперечливі дані щодо стадії, на яких відбувається порушення перебігу остеорепації. Так, Т.Кубо et al. [169] вважають, що експериментальний остеопороз негативно вплинув не стільки на ранній період (6 тижнів після операції) репаративного остеогенезу, скільки позначився на пізньому періоді (12 тижнів після операції), тоді як Н.Намкунг-Маттайл et al. [168] виявили, що порушення репаративного остеогенезу спостерігаються саме на ранніх стадіях процесу (7 діб після операції).

Переважна більшість цих робіт містить результати біохімічних та біомеханічних методів дослідження, тоді як гістологічні характеристики регенерату кістки в умовах аліментарного дефіциту кальцію залишилися менш висвітленими. Так, аналіз літератури свідчить, що, морфологічні дослідження регенерації кістки у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію проводилися щонайменше через 7 діб після травматичного ушкодження, тобто на стадії формування тканинних структур регенерату, і не торкнулись попередніх стадій - запалення та проліферації клітин [168].

Необхідно пам'ятати про обережну екстраполяцію результатів експериментальних досліджень на людину та враховувати видові особливості. Наприклад, було проведено морфологічне порівняння перебігу ранніх стадій при відновленні діафізарних переломів у людини та експериментальних тварин, результати якого свідчать про подібність за швидкістю інтенсивності розгортання запальної стадії, високою васкуляризацією та утворенням хрящової та кісткової тканин. Але були виявлені і відмітні особливості: по-перше, при переломах у людини хондрогенез та остеогенез перебігали водночас, тоді як в експерименті у тварин – послідовно; по-друге, у людини в регенераті виявлялися поодинокі тканинні базофіли, тоді як у тварин спостерігалася більша кількість цих клітин [167].

Дослідження регенерації кістки в умовах аліментарного остеопорозу є необхідними, тому що аліментарний дефіцит кальцію часто супроводжує розвиток різних типів остеопорозу, але механізми виникнення структурних порушень кісткової тканини при різних типах остеопорозу теж різні. Морфологічний аналіз стадійно-часових характеристик формування кісткового регенерату є важливим для більш поглибленого розуміння біологічних закономірностей перебігу остеорепарації на фоні недостатнього вмісту кальцію у раціоні харчування.

1.3 Стромальні клітини кісткового мозку як джерело репаративного остеогенезу

ССК являють собою малодифереційовані клітини мезенхімального походження, тому в науковій літературі їх часто визначають термінами «мезенхімальні стовбурові клітини» (МСК) або «скелетогенні мезенхімальні клітини». За морфологічними ознаками ССК – це фібробластоподібні (веретеновидні) клітини, які знаходяться у G_0 фазі клітинного циклу [22].

Відомі дані про зменшення з віком кількості ССК, які диференціюються у остеогенні клітини, та знижується їх здатність до проліферації та метаболічна активність у відповідь на дію цілого ряду регуляторних факторів [1, 16, 23, 105, 128]. З віком також зменшується кількість остеобластів [106] та знижується синтез ними регуляторних факторів остеогенезу (ШФР, КМГБів) [165, 117], тому кісткоутворення стає обмеженим.

ССК як нащадки мезенхімальних клітин здатні диференціюватись також у хондро-, фібро-, адипогенному напрямках. О.Каженова et al. [150] показали, що з віком баланс між диференціацією ССК у остеобласти та адипоцити зміщується у бік останніх, і це сприяє розвитку остеопорозу.

На реалізацію остеогенного потенціалу ККМ впливає не тільки вік, але й метаболічний стан організму. Так, в експериментах на щурах доведено, що режим гіподинамії негативно впливає (а саме, затримує) на остеогенну диференціацію ССК кісткового мозку [76].

ССК у постменопаузальних жінок виявляють низьку швидкість росту, недостатню здатність до диференціації по остеогенній лінії та ослаблену, затриману в часі відповідь на механічну напругу, що може бути причиною зниженої здатності до репаративної регенерації при остеопорозі [102].

Травма та метаболічні захворювання додатково руйнують клітини і можуть спровокувати «остеогенну недостатність» та обмежити регенерацію

кісткового дефекту [140]. Найбільш чутливі до дії сигналів, які інформують про стан ложа кісткового дефекту, - це ССК, і кістковий мозок є головним депо цих клітин [124].

Особлива увага дослідників останніми роками прикута до кісткового мозку не тільки тому, що він містить клітини-попередники остеогенезу, а також через те, що поєднує у собі три системи – кісткову, гемопоетичну та імунну, які підпадають під однакові регуляторні механізми, що діють на системному рівні та у мікрооточенні. Отже, ці три системи пов'язані між собою не лише спільним місцем розташування, але й функціонально, і при виникненні травматичних ушкоджень кістки вони всі беруть участь у запально-репаративній реакції [26].

ССК мігрують до ділянки ушкодження, де, адаптуючись до умов мікрооточення, забезпечують репаративну регенерацію [52, 161, 185]. Використання клітин-попередників остеобластів з метою оптимізації перебігу репаративного остеогенезу при переломах кісток стало новим напрямком досліджень для впровадження до практичної медицини [15, 64, 112, 115, 134, 156]. Позитивні результати, що були отримані при використанні суспензії культивованих ССК кісткового мозку для лікування незрослих переломів [111, 145] та тримірних матриць, збагачених аутологічними ССК кісткового мозку, для заповнення сегментарних дефектів [175], підтвердили перспективність поширення досліджень у цьому напрямку.

На сьогодні розроблені методи, які дозволяють дослідити остеогенну активність клітин кісткового мозку (ККМ) окремо від інших джерел, котрі також мають остеогенні властивості та визначають перебіг регенерації кісткової тканини, а саме періосту, ендосту, ендотелію кровоносних судин каналів остеонів. Одним із методів є культивування ККМ *in vitro*, в умовах якого утворюються характерні колонії фібробластів (колонієутворювальні клітини фібробластів – КУК-Ф). Їх кількість служить опосередкованим

показником остеогенного потенціалу ССК, які знаходяться серед ККМ [3, 11, 31, 57, 65, 74, 82, 90, 94, 103, 171].

Інший метод, який також широко використовується дослідниками для тестування остеогенного потенціалу ККМ, – це моделювання ектопічного остеогенезу *in vivo* [114, 127, 128, 142, 148, 149, 165, 166, 183].

Цей метод передбачає трансплантацію ККМ у ділянки організму, де нема остеогенних клітин і за природних умов кісткова тканина не утворюється (частіше за все під шкіру або між м'язами). Перевагою даного методу є те, що має місце дія всіх факторів організму. Як носії для трансплантації ККМ використовують штучні імпланти, серед яких перевага віддається гідроксилапатиту ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), що отримав широке використання у кістковій хірургії завдяки своїм специфічним властивостям, а саме біосумісності, біоактивності, остеокондуктивності та здатності до біодеградації [39, 40, 81, 92, 107, 144].

Продовження морфологічних досліджень закономірностей гістогенезу після травми кісток в умовах дії факторів, які викликають порушення остеорепації, зокрема, аліментарного дефіциту кальцію, є актуальним. У цьому напрямку важливим є дослідження у тварин з аліментарним дефіцитом кальцію остеогенних властивостей ССК кісткового мозку як джерела репаративного остеогенезу.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Матеріали дослідження

Експериментальні дослідження виконані на нелінійних білих щурах популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М.І. Ситенка АМНУ» загальною кількістю 252 тварин у 3 серіях відповідно до відтворюваних експериментальних моделей (табл. 2.1). Систематичне положення модельного об'єкта: вид *Rattus norvegicus* - альбінос, родина *Muridae*, ряд *Rodentia*, клас *Mammalia*, підтип *Vertebrata*, тип *Chordata*.

Таблиця 2.1

Розподіл щурів за серіями експерименту

№ серії	Експериментальна модель	Тривалість низько- кальцієвої дієти, місяць	Кількість тварин у групах				Загаль- на кіль- кість тварин
			контроль		дослід		
			самці	самиці	самці	самиці	
1	Аліментарний дефіцит кальцію	1	7	7	7	7	84
		5	7	7	7	7	
		11	7	7	7	7	
2	Травматичне ушкодження на фоні аліментарного дефіциту кальцію	5	70	0	70	0	140
3	Тестування остеогенних властивостей клітин кісткового мозку після аліментарного дефіциту кальцію	5	7	0	7	0	28
		11	7	0	7	0	

Біоетика. Експерименти виконані з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (ст. 26) [36, 69]. Всі оперативні втручання у щурів проведені під загальним знеболюванням (тіопентал, в/м, 25 мг/кг живої маси) в умовах асептики та антисептики. Евтаназію тварин здійснювали шляхом передозування діетилового ефіру. Протокол експериментів та відповідність проведених досліджень сучасним вимогам біоетики затверджені Комітетом з питань біоетики ДУ «ІПХС ім. проф. М.І.Ситенка АМНУ» (протоколи №11 від 23.06.2003 р. та №37 від 23.04.2007 р.).

2.1.1. Моделювання аліментарного дефіциту кальцію

Модель аліментарного дефіциту кальцію відтворювалась у щурів з 1-місячного віку шляхом їх утримання на низькокальцієвій зерново-овочевій дієті. Добовий раціон харчування тварин в дослідних групах кожної серії нашого експерименту містив 0,03 % кальцію (0,029 % фосфору, 233 МО вітаміну D₂), а в контрольних групах – 1,2 % кальцію (0,80 % фосфору, 233 МО вітаміну D₂). Склад продуктів з розрахунком вмісту кальцію та інших хімічних компонентів у раціоні харчування щурів контрольної та дослідної груп (табл. 2.2 та додаток А) був визначений на підставі вітчизняних норм [32, 51, 83] та міжнародних стандартів утримання лабораторних тварин [143, 154].

Моделювали аліментарний дефіцит кальцію протягом трьох строків тривалості – 1, 5, 11 місяців, і після кожного з них проводили гістологічне, ультраструктурне і морфометричне дослідження губчастої кістки (дистальний епіметафіз стегнової кістки) та компактної кістки (середня третина діафіза стегнової кістки).

У подальшому на цій моделі були відтворені дві інші моделі – травматичного uszkodження кістки та тестування остеогенного потенціалу ККМ в ектопічній ділянці (під шкірою).

Добовий раціон харчування щура

№ з/п	Назва продукту харчування	100 гр. продукту		Вітамін D, МО/г	КОНТРОЛЬНА ГРУПА				ДОСЛІДНА ГРУПА			
		Са, мг	Р, мг		Продукт, г	Са, мг	Р, мг	Вітамін D, МО/г	Продукт, г	Са, мг	Р, мг	Вітамін D, МО/г
1	Хліб житній	21	87	0	10	2,1	8,7	0	---	---	---	---
2	М'ясо II категорії	10	210	0,13	10	1,0	21,0	0,013	---	---	---	---
3	Молоко згущене	307	219	0	4	12,28	8,76	0	---	---	---	---
4	Молоко пастериз.	121	91	0,02	5	6,05	4,55	0,001	---	---	---	---
5	Сир голанд.	1000	544	0	5	50,0	27,2	0	---	---	---	---
6	Сир домаш.	95	130	0	5	4,75	6,5	0	---	---	---	---
7	Морква	51	55	0	6	3,06	3,3	0	10	5,1	5,5	0
8	Буряк	37	43	0	---	---	---	---	10	3,7	4,3	0
9	Капуста	48	31	0	6	2,88	1,86	0	20	9,6	6,2	0
10	Гарбуз	40	25	0	---	---	---	---	20	8,0	5,0	0
11	Яблука	10	6	0	---	---	---	---	18	1,8	1,08	0
12	Сало свиняче	0	0	0	---	---	---	---	1,5	0	0	0
13	Овес	12	35	0	---	---	---	---	10	1,2	3,5	0
14	Ячмінь	6	34	0	---	---	---	---	10	0,6	3,4	0
15	Крупа вівсяна	64	361	0	20	12,8	72,2	0	---	---	---	---
16	Комбікорм	125	80	0,007	20	25	16	0,001	---	---	---	---
17	Борошно кісткове	2650	1400	0	4,5	119,25	63	0	---	---	---	---
18	Карбонат кальцію	38000	0	0	0,5	190	0	0	---	---	---	---
19	Фосфат кальцію	23000	17000	0	3,5	805	595	0	---	---	---	---
20	Сіль	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0
21	Ергокальциферол®	0	0	58140	0,004	0	0	232,6	0,004	0	0	232,6
Всього					100	1234,2	828,1	232,6	100	30,00	28,98	232,6

2.1.2. Моделювання травматичного ушкодження кістки

Для вивчення репаративного остеогенезу в умовах модельованого аліментарного дефіциту кальцію (впродовж 5 місяців) щурам-самцям у дистальному метафізі стегнової кістки було створено травматичне ушкодження у вигляді перфораційного (наскрізного дірчастого) дефекту (рис. 2.1).

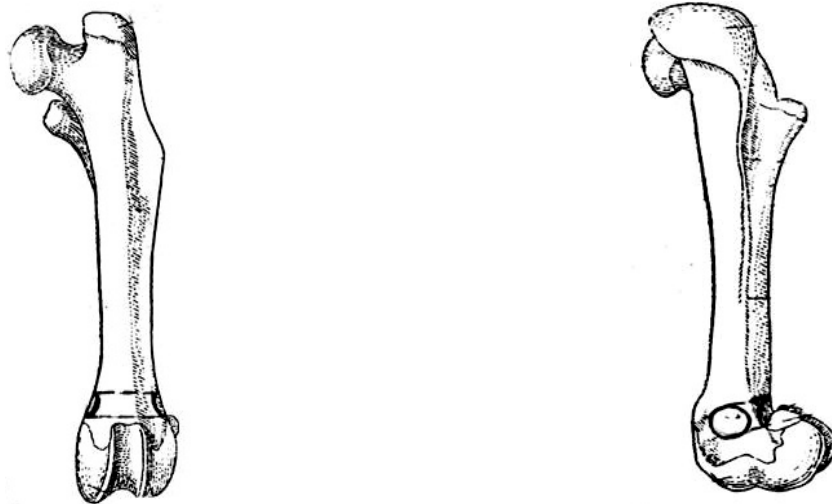


Рис. 2.1. Схема моделювання травматичного ушкодження дистального метафіза стегнової кістки щурів у вигляді перфораційного (наскрізного дірчастого) дефекту [за 18].

Після операції щурів продовжували утримувати на дієті, відповідній до їх експериментальної групи (контрольну групу – на стандартній дієті, дослідну групу – на низькокальцієвій дієті).

Техніка оперативного втручання. Латеральним доступом відкривали ділянку дистального метафіза лівої стегнової кістки (без артротомії колінного суглоба) та за допомогою стоматологічного бора (діаметр 1,3 мм) створювали перфораційний (наскрізний дірчастий) кістковий дефект (рис. 2.2). На шкірну рану накладали шви.

Виводили тварин з експерименту за такою схемою (відповідно до стадій репаративного остеогенезу у щурів): щоденно впродовж 1-7 діб, потім через 14, 21 та 28 діб після травматичного ушкодження.

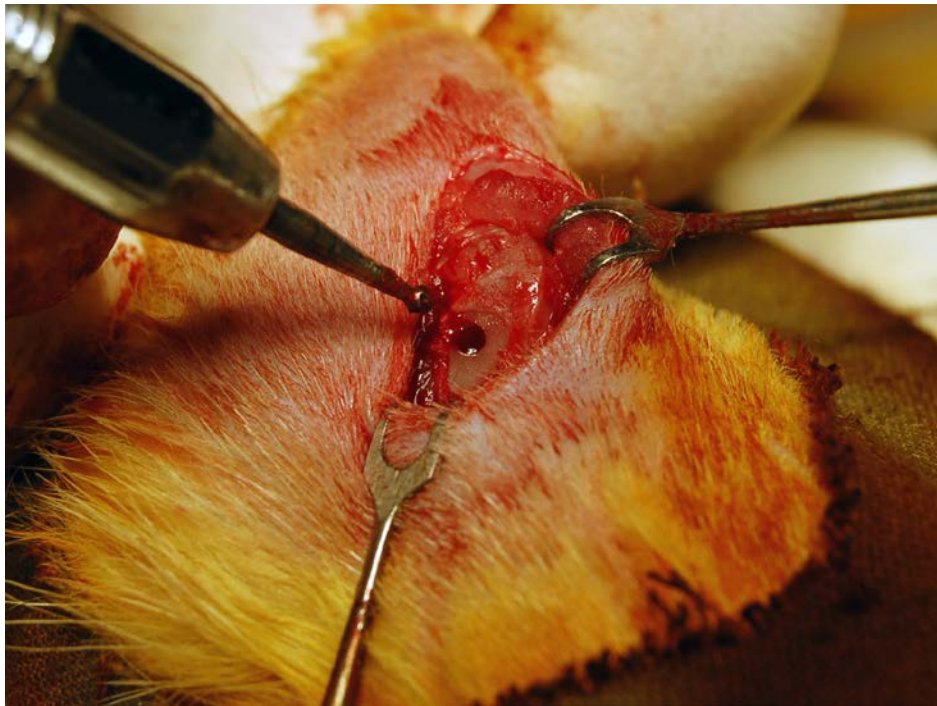


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд змодельованого перфораційного (наскрізного дірчастого) дефекту у дистальному метафізі стегнової кістки щура.

Для гістологічного та морфометричного досліджень виділяли дистальний відділ стегнової кістки з зоною дефекту, для електронномікроскопічного дослідження – тканини регенерату безпосередньо із дефекту.

2.1.3. Тестування *in vivo* остеогенних властивостей клітин кісткового мозку

В експерименті проведено вивчення остеогенних властивостей ККМ щурів-самців, утриманих на низькокальцієвій дієті впродовж двох термінів - 5 та 11 місяців. На кожний термін дослідження донорами ККМ були по 3 щура з дослідної (низькокальцієва дієта) та контрольної (стандартна дієта) груп, а реципієнтами – по 4 щура цих груп.

Імплантати-носії клітин. В якості носія для клітин кісткового мозку в експерименті використані 96 зразків пористого ГАП (пористість ГАП - $50 \pm 5\%$,

розмір пор ГАП – 300-600 мкм) у формі дисків діаметром 5 мм та висотою 2 мм (рис. 2.3). Виробник - кафедра фізики твердого тіла Харківського національного університету ім. В.Н.Каразіна.



Рис. 2.3. Зовнішній вигляд імплантатів із пористого ГАП, що використані як носії для трансплантації ККМ підшкірно щурам-реципієнтам.

Техніка підготовки ККМ до трансплантації. Робота проведена відповідно до методичних рекомендацій Н. Ohgushi et al. [165] та К. Inoue et al. [183]. Після вилучення стегнової та великогомілкової кісток в умовах стерильності відокремлювали їх епіфізи та за допомогою шприца фізіологічним розчином вимивали вміст кістковомозкової порожнини. ККМ осаджували шляхом центрифугування (1000 об/хв, 10 хв), осад відмивали у поживному середовищі 199 з повторним центрифугуванням та ресуспендуванням до отримання клітинної суспензії, яка містила 10^7 кл/мл. Кількість клітин підраховували в камері Горяєва.

Клітинну суспензію, отриману від одного щура-донора, наносили на 6 керамічних дисків на 20 хвилин ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), після чого імплантували під шкіру

щурам-реципієнтам. Один диск в середньому поглинав 60 μ л суспензії, яка містила 2×10^6 клітин. (Кількість клітин кісткового мозку, які адсорбувались дисками, розраховували шляхом визначення різниці об'єму клітинної суспензії і кількості у ній клітин перед початком процесу насичення керамічних імплантатів та після нього). Як контроль використані диски, насичені поживним середовищем 199 без ККМ.

Техніка оперативного втручання. Керамічні диски, збагачені ККМ та насичені середовищем 199 без ККМ, імплантували щурам під шкіру на спині. Для цього робили розтин шкіри розміром 8-10 мм, шпателем відшаровували шкіру від підшкірного шару, утворюючи «кишеню», в яку імплантували керамічний диск. На шкірні рани накладали шовкові шви.

Кожному щуру-реципієнту ККМ в дослідній та контрольній групах імплантували по 6 дисків – три з лівого та три з правого боків, схема розташування яких наведена на рис. 2.4.

Після операції тварин протягом 2 місяців продовжували утримувати на дієті, відповідній до експериментальної групи щурів-реципієнтів. Імплантати після видалення з організмів тварин досліджували гістологічним та морфометричним методами.

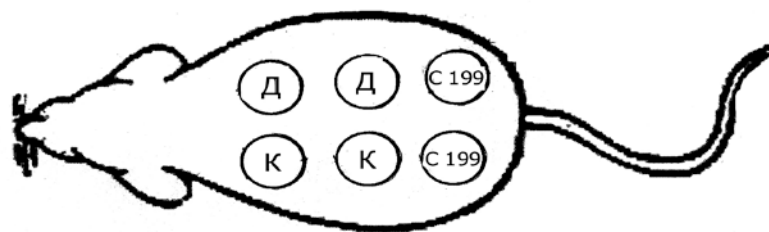


Рис. 2.4. Схема розташування досліджуваних імплантатів на спині у щурів-реципієнтів ККМ:

- Ⓚ – керамічний диск, збагачений ККМ щурів дослідної групи;
- Ⓚ – керамічний диск, збагачений ККМ щурів контрольної групи;
- Ⓚ – керамічний диск, насичений живильним середовищем 199 без ККМ.

2.2. Методи дослідження

У роботі використані методи експериментального моделювання різних станів організму у щурів (проведено на базі лабораторії експериментального моделювання ДУ «ПХС ім. проф. М.І. Ситенка АМНУ», зав. лабораторією – к.б.н. Малишкіна С.В.), а також застосовані методи морфологічного аналізу.

2.2.1. Гістологічний метод

Обробку фрагментів стегнової кістки проводили за стандартними гістологічними методами, керуючись рекомендаціями Д.С.Саркісова та Ю.Л.Перова [56], В.В.Некачалова [62]: фіксація у 10% розчині нейтрального формаліну, декальцинація у 5% розчині азотної кислоти, зневоднювання у розчинах етилового спирту зростаючої міцності (від 60° до 96°) та у розчині суміші етилового спирту з діетиловим ефіром (1:1), ущільнення в густому целоїдині параами хлороформу, заключення в целоїдин.

Зрізи (6-10 мкм) виготовляли на санному мікроскопі “Reichert”, забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізона для диференційного виявлення колагенових волокон [56].

Дослідження гістологічних зрізів проводили у світлових мікроскопах (“Carl Zeiss” (ок.12,5×, об. 6,3×, 12,5×, 25×, 50×) та “БИОЛАМ-ЛОМО” (ок.7×, об.3,7×, 8×, 40×), фотографування – у світловому мікроскопі “RATHENOV” (ок.10×, об. 12,5×, 25×, 100×) за допомогою цифрового фотоапарату “EOS 300 D”.

2.2.2. Електронно-мікроскопічний метод

Для ультраструктурного дослідження кісткового регенерату його безпосередньо вилучали із дефекту для вивчення ультраструктури губчастої та компактною кістки виділяли дистальний метафіз та ділянку діафіза стегнової кістки. Вилучений біоматеріал розрізали на шматочки розміром $\approx 1 \text{ мм}^3$ та

обробляли за стандартним методом електронної мікроскопії відповідно до рекомендацій Б.Уикли [87]: фіксація у 4% розчині глутаральдегіду на фосфатному буфері, декальцинація (для мінералізованих тканин) у 3,7% розчині трилону Б, додаткова фіксація у 1% розчині чотирьохокису осмію (OsO_4), зневоднювання у розчинах етилового спирту зростаючої міцності (від 50° до 96°) та в ацетоні, заключення в суміш епоксидних смол з епону та аралдиту.

Напівтонкі (1-2 мкм) та ультратонкі зрізи (0,05-0,09 мкм) виготовляли за допомогою скляних ножів на ультрамікротомі УМПТ-3М. Диференційне забарвлення напівтонких зрізів проводили 1% розчином метиленового синього та 1% розчином основного фуксину. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю та ураніацетатом за Рейнольдсом [43]. Ультраструктурний аналіз проводили у трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР ($\times 3\ 000 - 35\ 000$).

Висловлюю вдячність к.б.н. Л.М.Бенгус (ст.н.с лабораторії морфології сполучної тканини ДУ «ІПХС ім.проф.М.І.Ситенка АМНУ») за консультативну допомогу в оволодінні методом електронної мікроскопії.

2.2.3. Морфометричні та статистичні методи

Морфометричний аналіз проводили оптиковізуальним методом за допомогою стереоскопічного мікроскопа “МБС-10” (ок. 8^\times , об. 4^\times та об. 2^\times) з окулярною квадратною сіткою (сторона квадрату = 1 мм), а також світлових мікроскопів “БИОЛАМ-ЛОМО” (ок. 7^\times , об. $3,7^\times$, 8^\times , 40^\times) та “Carl Zeiss” (ок. $12,5^\times$, об. 50^\times) з окулярним гвинтовим мікрометром МОВ-1- 16^\times та квадратно-сітчастою окулярною вставкою Автанділова (256 малих квадратів або 289 точок перетинів). Аналізували центральні зрізи, у кожному окремому випадку - не менше 3 зрізів. При виконанні роботи керувались рекомендаціями Г.Г.Автанділова [2], В.Г.Ковешнікова та ін. [47].

У кістковій тканині щурів оцінювали такі параметри:

- 1) *відносну площу (%) губчастої кістки, коефіцієнт відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярних просторів.* В дистальному епіфізі рахували кількість точок перетинів сітки Автанділова, що припадали на кісткові трабекули і на міжтрабекулярні простори, та визначали коефіцієнт їх відношення;
- 2) *відносну площу (%) компактної кістки, коефіцієнт відношення площі компактної кістки до площі кістковомозкової порожнини діафіза.* На поперечних зрізах середньої третини діафіза рахували кількість точок перетинів окулярної квадратної сітки, що припадали на кісткову тканину і на кістковомозкову порожнину (разом із просторами від спонгізації кістки), та визначали коефіцієнт їх відношення;
- 3) *ширину шарів кортексу (мкм).* На поперечних зрізах у дорсальній та плантарній ділянках діафіза окулярним гвинтовим мікрометром вимірювали ширину зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок, остеонного шару та загальну ширину кортексу (по 10 вимірювань на кожному зрізі);
- 4) *діаметри остеонів та центральних каналів остеонів (мкм).* На поперечних зрізах у дорсальній та плантарній ділянках діафіза окулярним гвинтовим мікрометром виміряли їх ортогональні діаметри, потім розраховували середнє значення за формулою:

$$D_{\text{середній}} = (D + d) / 2,$$

де D – довгий діаметр, d – короткий діаметр.

На моделі травматичного ушкодження кістки оцінювали такі параметри:

- 1) *клітинний склад зони кісткового дефекту (%).* Через 1 та 3 доби після операції в зоні ушкодження визначали типи клітин та рахували їх кількість у чотирьох малих квадратах сітки Автанділова, загальна площа яких становить 1 мм^2 . Потім розраховували відсоток кожного типу клітин від загальної кількості клітин;

2) *відносну площу тканин регенерату (%)*. Через 5, 7, 14, 21 та 28 діб після операції в зоні дефекту за допомогою сітки Автанділова рахували кількість точок перетинів, що припадали на загальну площу дефекту та на структуру об'єктів у дефекті (грануляційна, фіброретикулярна, грубоволокниста та пластинчаста кісткові тканини, кістковий мозок, а також уламки материнської кістки з детритом). Потім визначали відсоток площі об'єктів від загальної площі дефекту.

При тестуванні остеогенного потенціалу клітин кісткового мозку оцінювали відносну площу (%) кісткової тканини, утвореної в порах керамічного диску: в імплантаті за допомогою окулярної сітки рахували кількість точок перетинів, що припадали на загальну площу імплантата і на кісткову тканину, а потім визначали відсоток площі кісткової тканини від загальної площі імплантата.

Статистичний аналіз. Для визначення достовірної різниці між вибірковими середніми застосовували критерії Стьюдента або Фішера [80].

РОЗДІЛ 3

СТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ ГУБЧАСТОЇ ТА КОМПАКТНОЇ ТКАНИН СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ

Даний розділ присвячений дослідженням гісто- та ультраструктури губчастої і компактної кістки щурів, утриманих на низькокальцієвій дієті впродовж трьох термінів – 1, 5, 11 місяців. Результати цього дослідження використані для проведення подальших експериментів із цією моделлю.

3.1. Структурна організація губчастої та компактної кістки після 1-місячної низькокальцієвої дієти

Губчата кістка. У щурів контрольної групи кісткові трабекули зони епіфіза формують характерну густу сітку, у міжтрабекулярних просторах якої міститься кістковий мозок (рис. 3.1).

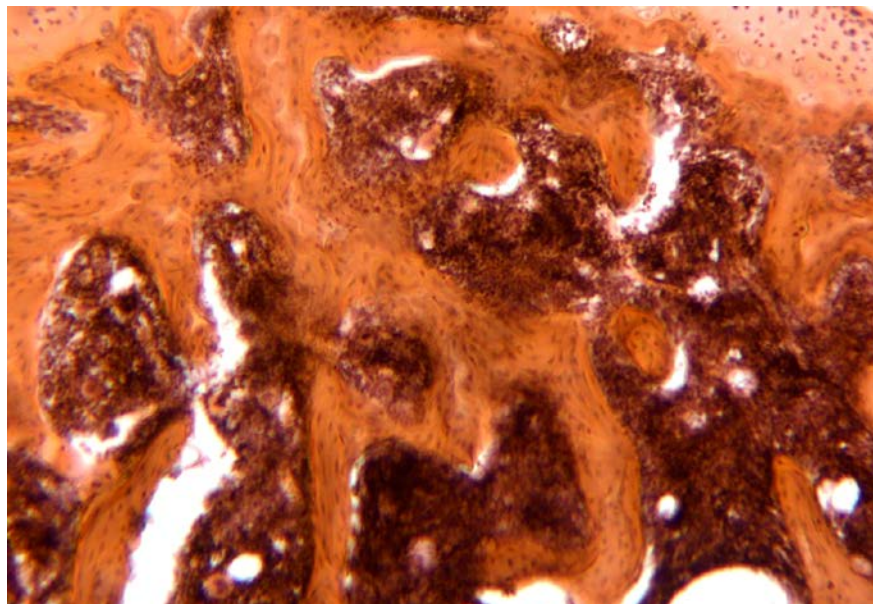


Рис. 3.1. Густа сітка кісткових трабекул. Дистальний епіфіз стегнової кістки щура-самця. Контроль, 1 місяць стандартної дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об. 25[×].

У самців та самиць дослідної групи губчаста кістка характеризується потоншенням трабекул та порушенням їх просторового розташування, а саме втратою насамперед горизонтальних трабекул, що призвело до зникнення зв'язків між сусідніми трабекулами та появи «відокремлених» кісткових трабекул. В результаті на гістологічних препаратах спостерігається порушення трабекулярної сітки та розширення міжтрабекулярних просторів, які заповнені кістковим мозком (рис. 3.2). У трабекулах визначаються щілини та відшарування кісткових пластин, нерівномірне потоншення трабекул та осередки лізису кісткової речовини у вигляді пазушного розсмоктування (рис. 3.3), ділянки остеокластичної резорбції (гаушипові лакуни), а також ділянки хрящової тканини з базофільним матриксом, які свідчать про затримку процесу енхдральної осифікації.

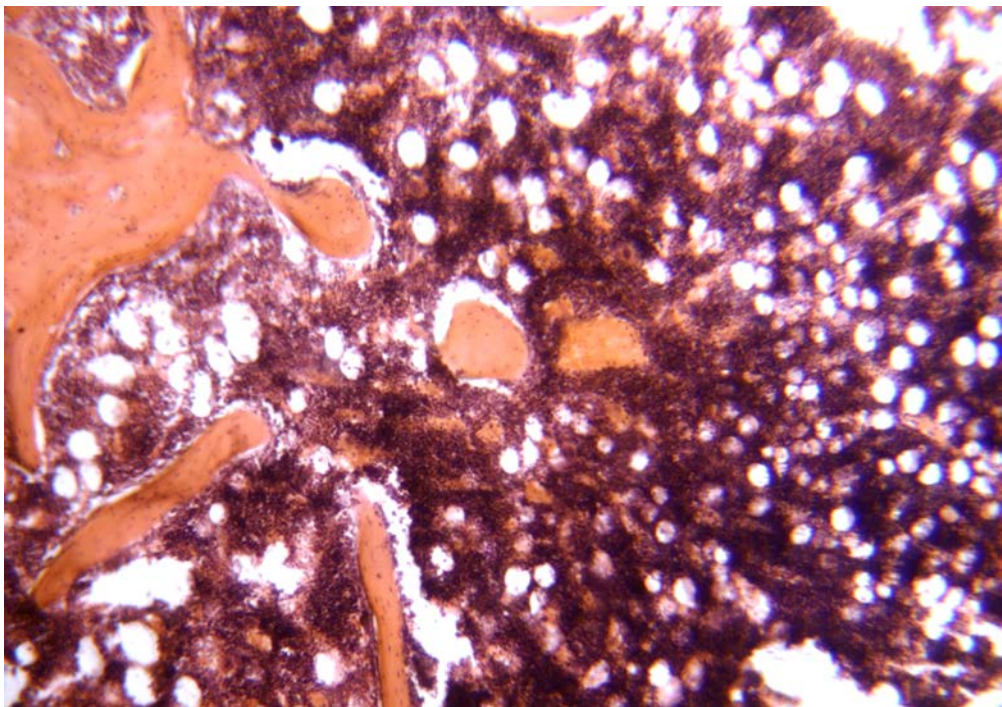


Рис. 3.2. «Відокремлені» кісткові трабекули та розширені міжтрабекулярні простори, які заповнені кістковим мозком. Дистальний епіфіз стегнової кістки щура-самця. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

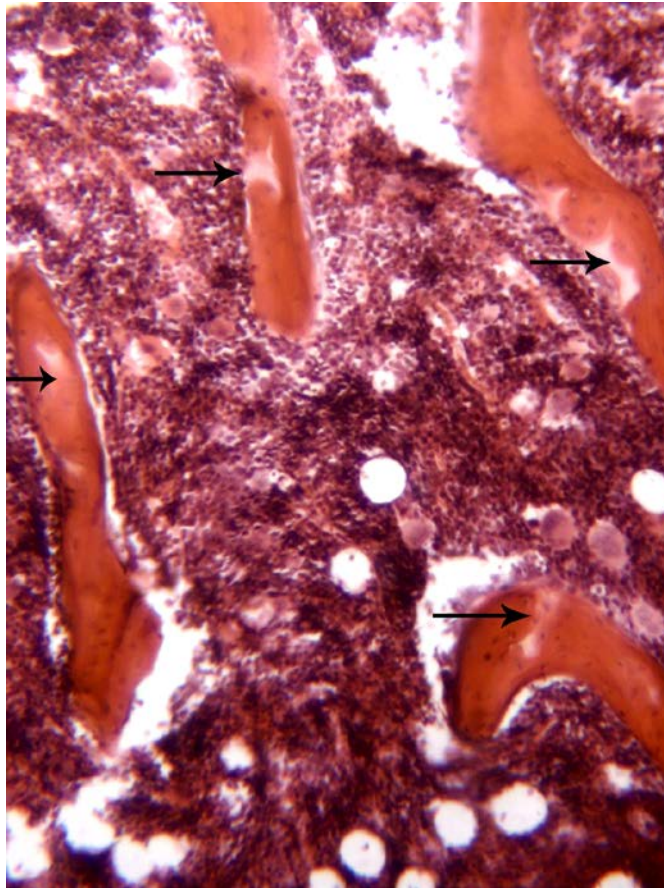


Рис. 3.3. «Відокремлені» вертикальні кісткові трабекули з ділянками остеолізу (стрілка). Дистальний епіфіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Компактна кістка. На поперечних зрізах діафіза стегнових кісток самців та самиць контрольної групи в компактній кістці чітко визначаються всі три зони: внутрішніх генеральних пластинок, остеонний шар, зовнішніх генеральних пластинок. В остеонному шарі спостерігаються численні остецити, остеони переважно еліпсоїдної форми мають кісткові концентричні пластинки, що представлені одною або двома генераціями кісткової тканини (рис. 3.4).

У тварин дослідної групи на відміну від контрольних щурів спостерігається значна кількість судинних каналів, котрі наскрізь

перетинають шар внутрішніх генеральних пластинок і остеонний шар або шар зовнішніх генеральних пластинок і остеонний шар. Водночас у самиць дослідної групи кістковомозкові простори, що утворилися на місці компактної кістки, мають великі розміри (рис. 3.5) порівняно не тільки із кісткою щурів контрольної групи, а також із кісткою самців дослідної групи (рис. 3.6).



Рис. 3.4. Численні остеони еліпсоподібної форми з 1-2 генераціями концентричних кісткових пластинок. Діафіз стегнової кістки щура-самця. Контроль, 1 місяць стандартної дієти. Зabarвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

Відомо, що судини, «врастаючи» у кістку, «перфоруєть» її, сприяють спонгізації та зникненню кісткової речовини [62], що дає підставу говорити про наявність васкулярного (син. каналікулярного) типу резорбції кістки. Все це свідчить, що в умовах аліментарного дефіциту кальцію різниця прояву структурних змін у компактній кістці залежить від статі щурів, а тому може виникати в результаті дії різних механізмів регуляції за участю статевих гормонів.

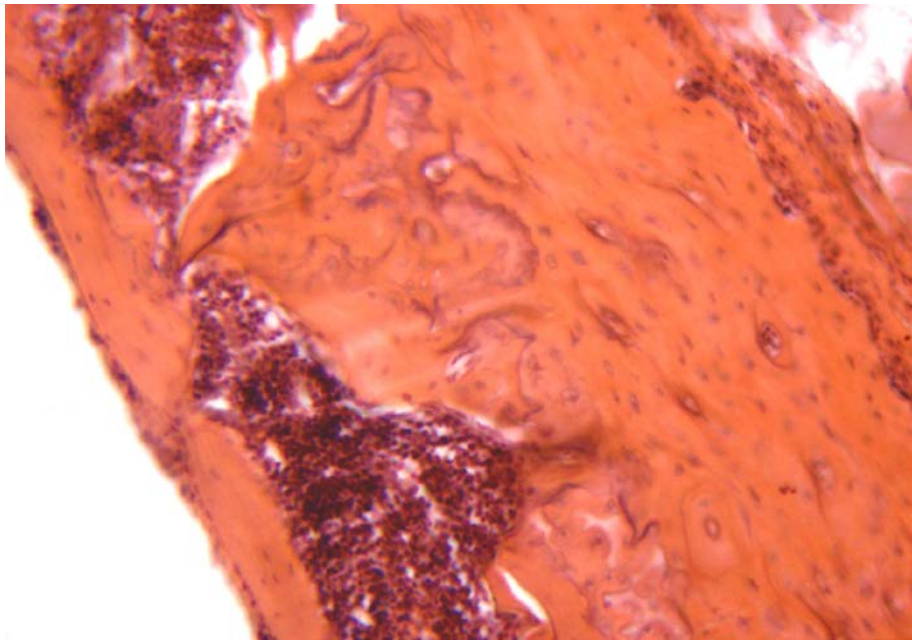


Рис. 3.5. Спонгізація компактної кістки з утворенням кістковомозкових просторів великих розмірів. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

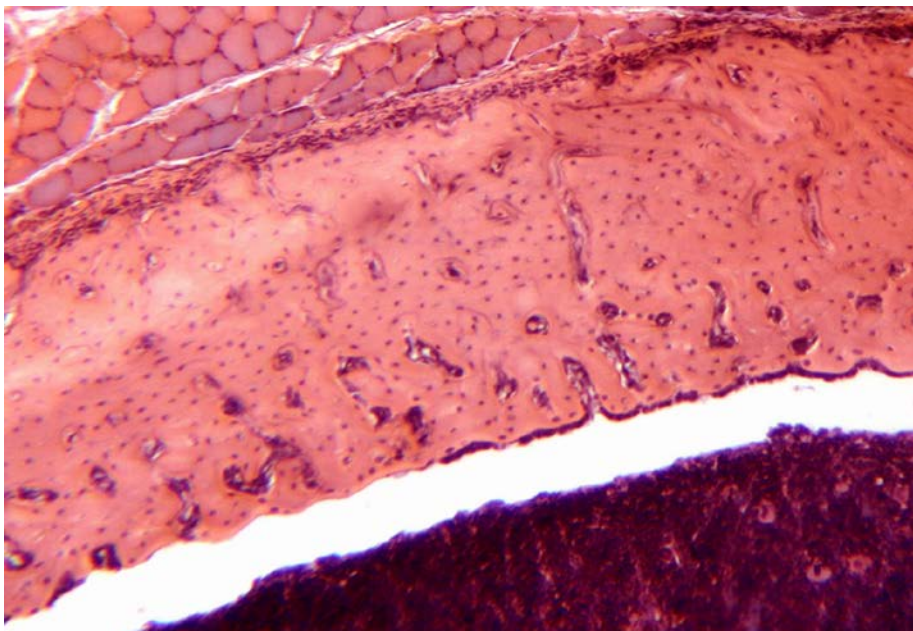


Рис. 3.6. Спонгізація компактної кістки з утворенням численних судинних каналів. Діафіз стегнової кістки щура-самця. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.6,3[×].

У дослідних самців та самиць, яких утримували на низькокальцієвій дієті, зовнішні та внутрішні генеральні пластинки містять ділянки без клітин, остецити з пікнотичними ядрами та розширеними лакунами, лакуни без остецитів, а також лінії цементації [термінологія відповідно до 55, 58, 59] із «зигзагоподібними» контурами, які свідчать про нерівномірність процесів перебудови компактної кістки. Зовнішня поверхня концентричних пластинок остеонів також має нерівні контури, спостерігається виражена базофілія центральних каналів остеонів (рис. 3.7). Визначаються ділянки потовщення періосту. На окремих ділянках кістки практично відсутній шар внутрішніх генеральних пластинок (рис. 3.8), або порушений шар зовнішніх генеральних пластинок, через що остеонний шар межує відповідно або з кістковою мозковою порожниною діяфіза, або з періостом.

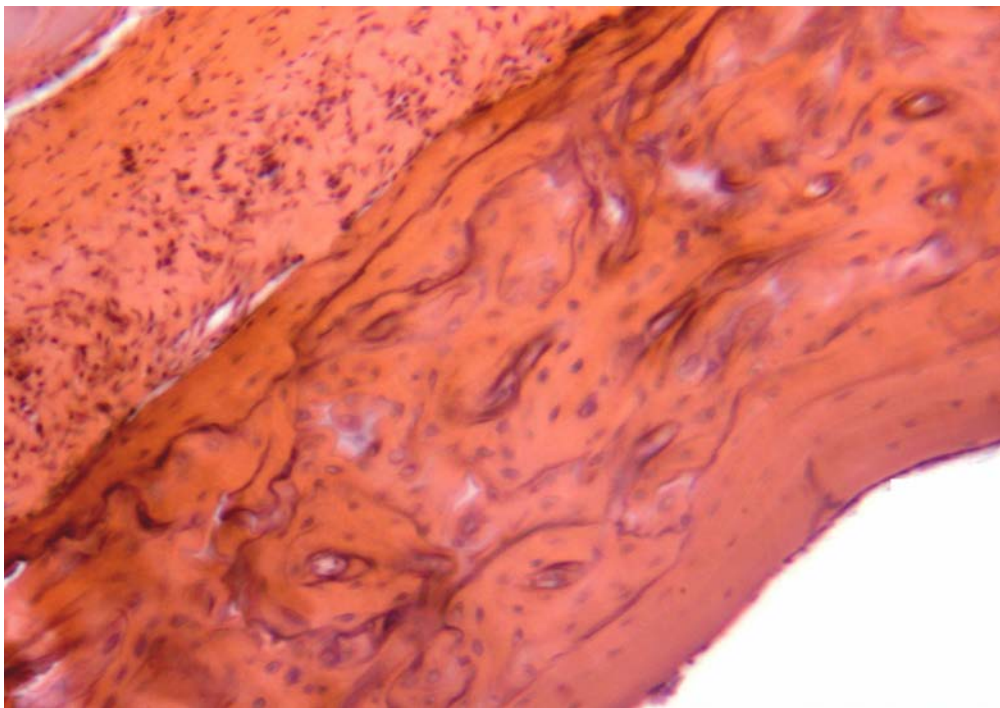


Рис. 3.7. Нерівномірність контурів ліній цементації зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок компактної кістки. Порушення концентричних пластин остеонів з формуванням «зигзагоподібних» контурів. Потовщення періосту. Діяфіз стегнової кістки щура-самця. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

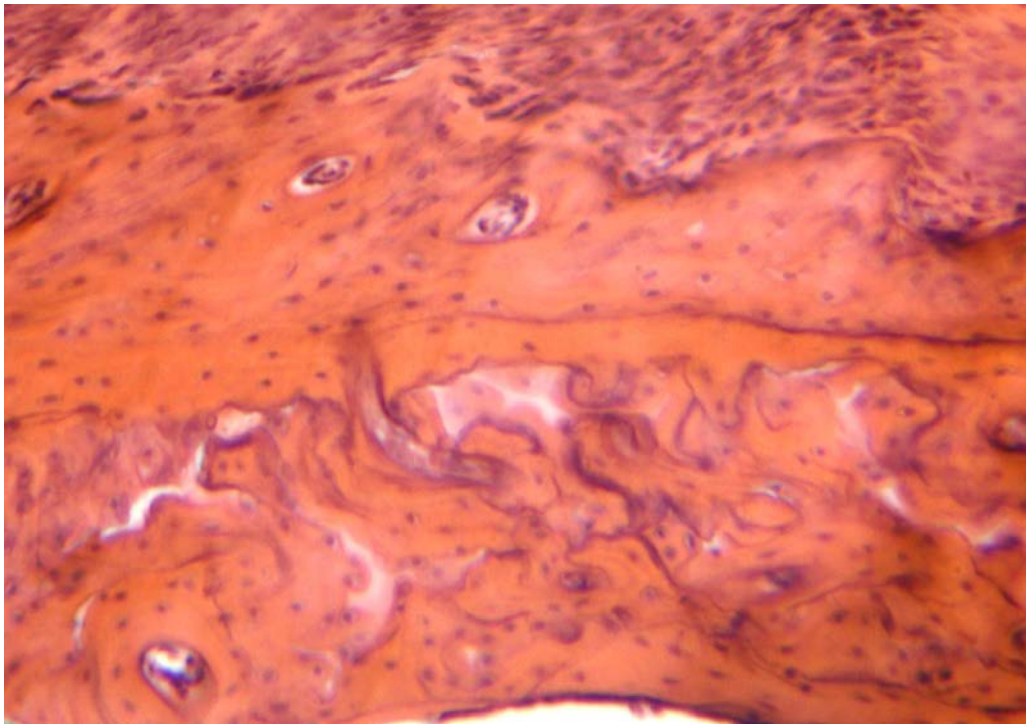


Рис. 3.8. Вузький шар внутрішніх генеральних пластинок та шар зовнішніх генеральних пластинок із ділянками порушення, які заміщені фіброзною сполучною тканиною. Діафіз стегнової кістки щура-самця. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

У декількох випадках спостерігається відшарування кісткового фрагменту від поверхні кортексу з боку періосту (рис. 3.9). У кортексі виявляються деструктивні тріщини та щілини, фрагменти матриксу кістки. Остеони асиметричної форми мають потовщені базофільно забарвлені стінки центрального каналу. В остеонному шарі присутні ділянки лізису різних розмірів. У остеонному шарі дослідних щурів звертає увагу численність ділянок пазушного розсмоктування компактної кістки за типом «рідкої кістки». Крім цього, виявляються тріщини, нерівномірні нашарування концентричних та вставних кісткових пластинок, остецити з пікнотичними ядрами та розширеними лакунами, остеони з гіперкальцифікованим кільцем.

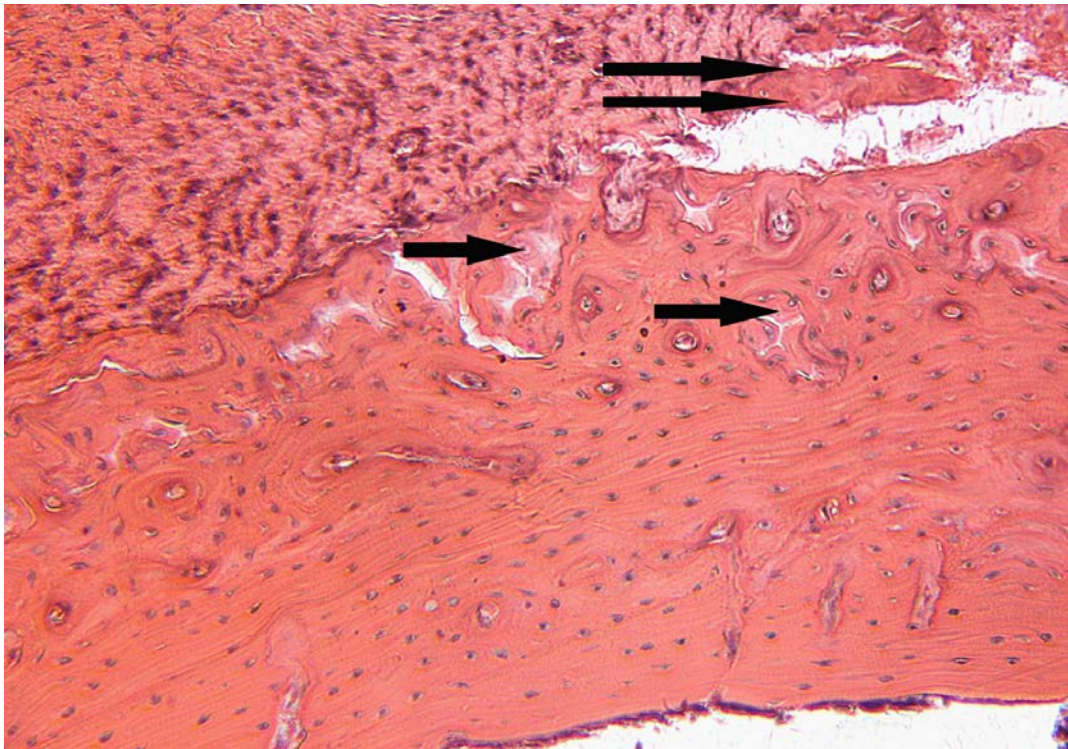


Рис. 3.9. Тріщини, ділянки лізису у вигляді пазушного розсмоктування за типом «рідкої кістки» (стрілка), відшарування кісткового фрагменту (дві стрілки) з боку періосту. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

Періостальна поверхня кортексу на багатьох ділянках має нерівні контури з лакунарними поглибленнями, у деяких з них містяться остеокласти (рис. 3.10), що свідчить про остеокластичний (*син.* лакунарний) тип резорбції компактної кістки.

Навколо розширених проривних судинних каналів у компактній кістці діафіза дослідних щурів виявляються численні резорбційні ділянки з нерівною поверхнею, тобто мають місце ознаки периканалікулярного остеолізису (рис. 3.11). Як зазначає В.В.Некачалов [62], периканалікулярний остеолізис часто спостерігається в умовах надлишкового ендогенного надходження до кров'яного русла ряду гормонів, в тому числі й ПТГ.

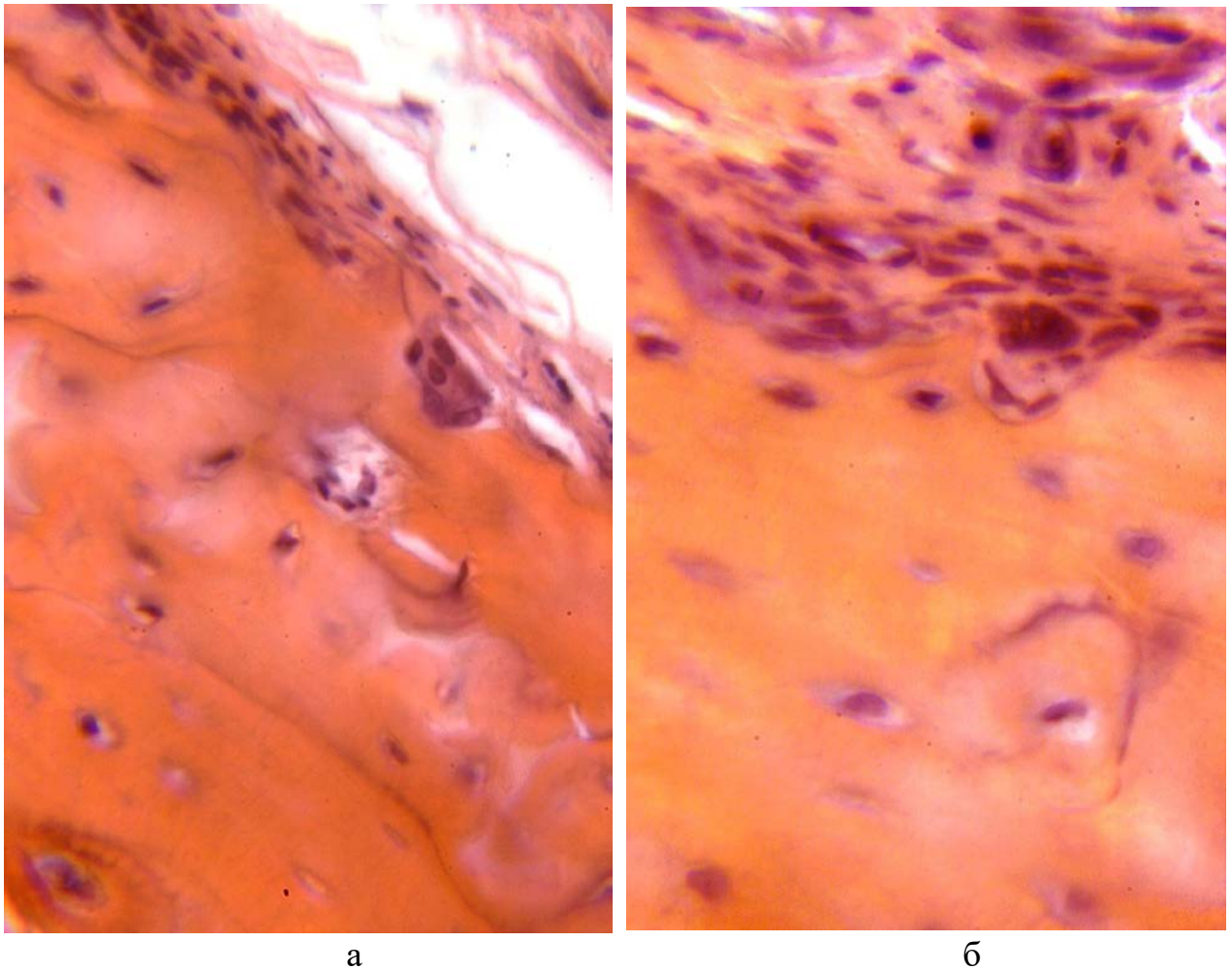


Рис. 3.10. Нерівномірність та виражена базофілія ліній цементації. Лакуни резорбції кістки з остеокластами на періостальній поверхні кортексу. Діафіз стегнової кістки щурів. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а) самиця, б) самець. Ок.10[×], об.50[×].

Численними експериментами показано, що при утриманні щурів на низькокальцієвій дієті у сироватці крові рівень ПТГ збільшується в залежності від тривалості експерименту в 8,5–13 рази [109, 176]. Відомо, що рецептори до ПТГ виявляються не тільки в остеобластах, але також в остеоцитах [26], і що під впливом ПТГ підсилюється протеолітична активність цих клітин (за рахунок продукування металопротеїназ – колагеназ та желатиназ), в результаті чого навколо клітин руйнуються компоненти

кісткового матриксу [170, 177]. Саме цим можна пояснити наявність у кістковій тканині дослідних щурів ділянок з ознаками остеоцитарного остеолізису (*син.* періостеоцитарний остеолізис), про що свідчать розширені лакуни з нерівними та нечіткими контурами навколо остеоцитів.

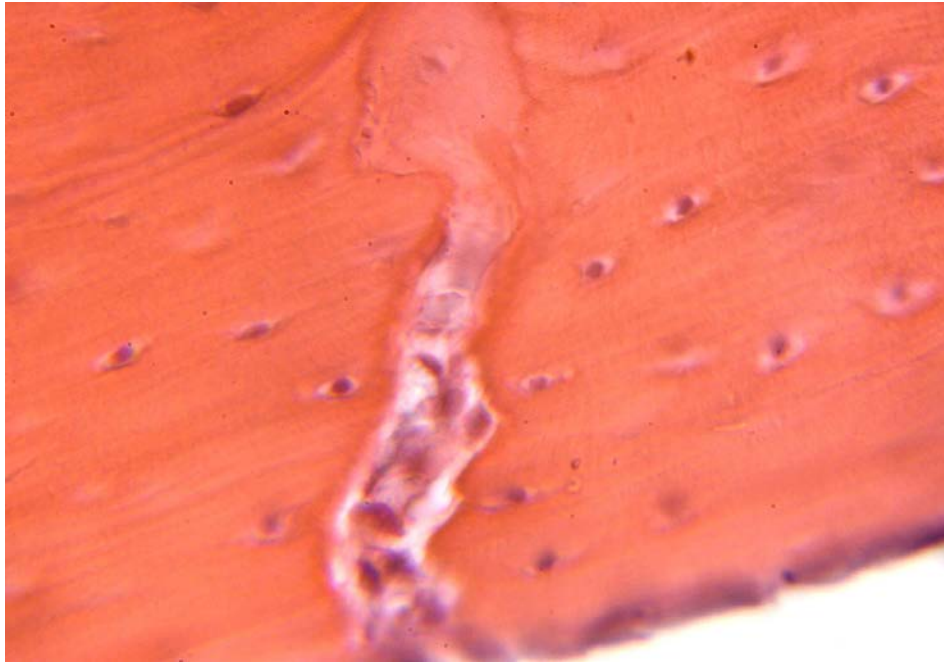


Рис. 3.11. Судинний канал з ознаками периканалікулярного остеолізису. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.50[×].

У компактній кістці дослідних щурів виявляються осередки деструкції, які заповненні пухкою сполучною тканиною або грубоволокнистою кістковою тканиною (рис. 3.12), що свідчить про репаративні процеси.

Морфометричний аналіз. За результатами морфометричного дослідження встановлено, що в умовах низькокальцієвої дієти протягом одного місяця в цілому площа губчастої та компактної кістки щурів менша, ніж у щурів контрольної групи, але виявляються особливості залежно від статі тварин. Так, у самців дослідної групи коефіцієнт відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярних просторів достовірно в 1,35 раза

менший за відповідний коефіцієнт у самців контрольної групи, а коефіцієнт відношення площі компактної кістки до площі кістковомозкової порожнини в 1,31 раза менший (рис. 3.13).

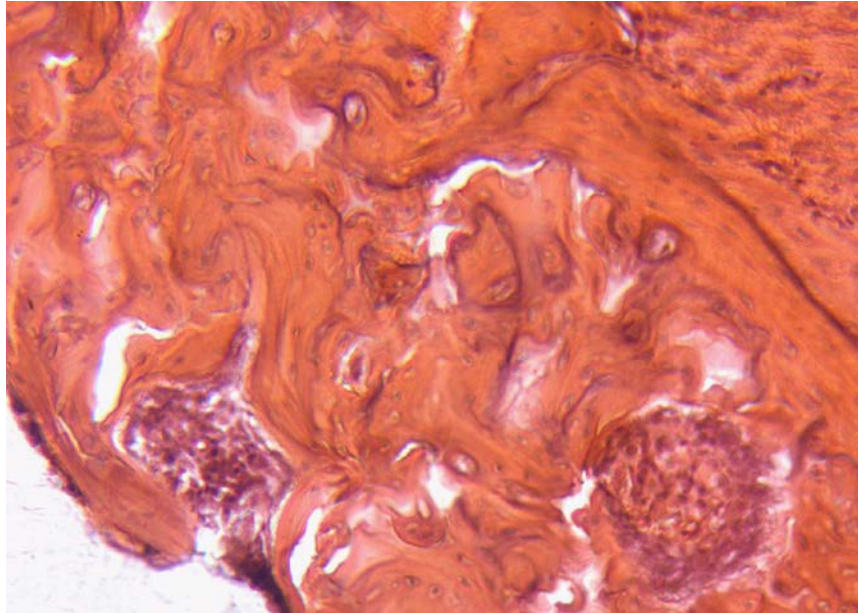
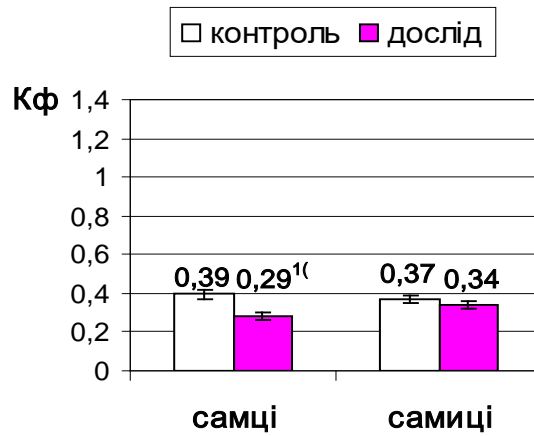


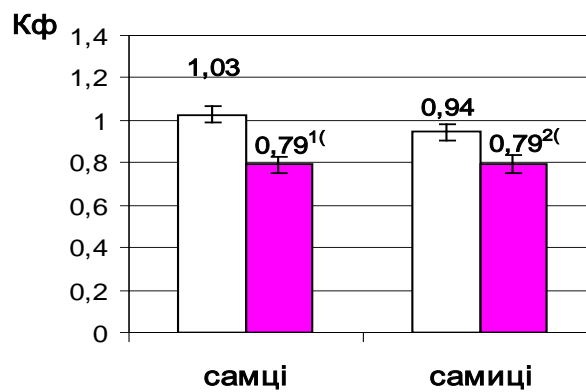
Рис. 3.12. Тріщини, ділянки лізису, фіброзна тканина в осередках деструкції компактної кістки. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 1 місяць низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

У самиць відповідні коефіцієнти менші у 1,09 та 1,19 раза. Це свідчить, що в умовах аліментарного дефіциту кальцію у самців спостерігається більша інтенсивність «втрати кістки», ніж у самиць, а у самиць – більша інтенсивність «втрати» компактної кістки, ніж губчастої.

При морфометричному дослідженні загальної ширини компактної кістки діафіза на дорсальній та плантарній ділянках (де найбільш чітко виявляються межі всіх шарів кортексу щурів) визначена достовірна різниця між вказаними показниками у самців та самиць, але не встановлено достовірної різниці між показниками у щурів дослідної та контрольної груп (табл. 3.1).



а



б

Рис. 3.13. Коефіцієнти (Кф) відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярного простору в епіфізі (а) та площі компактної кістки до площі кістковомозкової порожнини в діафізі (б) стегнової кістки щурів після їх утримання на низькокальцієвій дієті протягом 1 місяця:

1)- $P < 0,001$;

2)- $P < 0,05$.

Хоча у самців дослідної групи спостерігається достовірно менша в 1,41 раза ширина шару зовнішніх генеральних пластинок, ніж у самців контрольної групи, але водночас визначається в 1,33 раза більша ширина внутрішніх генеральних пластинок, тому загальна ширина кортексу дослідних щурів-самців не відрізняється від контрольних тварин. Вплив аліментарного дефіциту кальцію достовірно не позначився на показниках

ширини шарів кортексу у самиць. Ці результати у певній мірі підтверджують, що у самиць дослідної групи зміни у кістковій тканині в цілому менш виражені, ніж у самців.

Таблиця 3.1

Морфометричні показники ширини зон компактної кістки у щурів після низькокальцієвої дієти протягом 1 місяця ($M \pm m$, мкм)

Зони	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Зовнішні генеральні пластинки	59,3 \pm 3,8	42,2 \pm 2,5 $P_1 < 0,001$	48,3 \pm 3,1 $P_2 < 0,05$	45,9 \pm 2,5
Внутрішні генеральні пластинки	51,4 \pm 2,9	68,4 \pm 2,8 $P_1 < 0,001$	61,5 \pm 2,8 $P_2 < 0,05$	62,7 \pm 3,1
Остеонний шар	191,4 \pm 3,9	200,0 \pm 4,1	172,4 \pm 4,2 $P_2 < 0,001$	171,2 \pm 4,8 $P_2 < 0,001$
Загальна ширина кортексу	302,1 \pm 3,9	310,6 \pm 5,0	282,2 \pm 4,6 $P_2 < 0,01$	279,8 \pm 5,8 $P_2 < 0,001$

Примітки:

1. P_1 - достовірна різниця порівняно з контрольною групою;
2. P_2 - достовірна різниця порівняно з самцями тієї ж групи.

В умовах низькокальцієвої дієти у щурів обох статей діаметри остеонів достовірно менші, ніж у контрольній групі (табл. 3.2), що свідчить про знижену інтенсивність процесу кісткоутворення у дослідних тварин порівняно з контрольними тваринами.

Розміри діаметрів центральних каналів використовують як показник інтенсивності процесів резорбції, бо при підсиленні резорбційних процесів їх

діаметри збільшуються. В даному експерименті у тварин з аліментарним дефіцитом кальцію за всіма наведеними вище ознаками спостерігається активізація процесу кісткової резорбції, але ми не визначили достовірних змін діаметрів центральних каналів остеонів між контрольними та дослідними тваринами (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Морфометричні показники остеонних структур компактної кістки щурів після низькокальцієвої дієти протягом 1 місяця ($M \pm m$, мкм)

Показники	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Діаметр остеонів	38,2 \pm 1,2	34,1 \pm 1,4 $P_1 < 0,05$	40,1 \pm 1,4	35,1 \pm 1,1 $P_1 < 0,01$
Діаметр центральних каналів остеонів	6,9 \pm 0,3	7,1 \pm 0,2	7,1 \pm 0,2	6,7 \pm 0,3

Примітка. P_1 - достовірна різниця порівняно з контрольною групою.

Таким чином, виявлені зміни в структурі губчастої та компактної кістки щурів обох груп дослідження свідчать про активний перебіг процесів кісткової перебудови (*син.* ремоделювання), але в умовах аліментарного дефіциту кальцію протягом 1 місяця у щурів процеси кісткової резорбції переважають над процесами кісткоутворення. Морфологічно виявляються ознаки декількох форм резорбційних процесів кісткової тканини, а саме: остеокластична (*син.* лакуарна) резорбція, остеоцитарний (*син.* періоцеоцитарний) остеолізис, пазушна резорбція (*син.* «рідка кістка»), васкулярна (*син.* каналікулярна) резорбція та периканалікулярний остеолізис.

Виявлені у дослідженні відмінності гістоморфометричних показників між самцями та самицями ще раз підтверджують, що швидкість та механізми

«втрати» кісткової тканини залежать від статі, а отже значною мірою визначаються активністю статевих гормонів.

3.2. Структурна організація губчастої та компактної кістки після 5-місячної низькокальцієвої дієти

Губчаста кістка. При мікроскопічному дослідженні у губчастій кістці самців і самиць, яких утримували на низькокальцієвій дієті, визначаються структурні зміни у вигляді потоншених трабекул, збільшеної площі кістковомозкових просторів порівняно з кісткою у тварин контрольної групи. У кісткових трабекулах спостерігаються мікротріщини та мікропереломи, значні за розмірами ділянки деструкції та лізису, низька щільність остеоцитів, значна кількість остеоцитарних лакун без клітин. На відміну від тварин контрольної групи остеобласти та ділянки остеоїда на поверхні кісткових трабекул дослідних тварин спостерігаються лише подекуди.

При ультраструктурному дослідженні в трабекулах губчастої кістки дослідних щурів у розширених лакунах, краї яких мають нерівномірні контури, визначаються остеоцити з гіперхромним ядром та вузьким шаром цитоплазми (рис. 3.14). У кістковому матриксі навколо клітинних лакун спостерігаються розширені каналці цитоплазматичних відростків остеоцитів. На поверхні кісткових трабекул виявляються остеобласти переважно у стані «спокою». Біля поверхні деяких ділянок трабекул серед ККМ спостерігаються багатоядерні клітини та моноядерні макрофагоподібні клітини, присутність яких дає підстави визначити їх як попередників остеокластів та засвідчує про процес формування остеокластів.

Компактна кістка. У дослідних самців та самиць кортекс місцями потоншений, а його шари перетинають судинні канали, які відкриті до кістковомозкової порожнини або кістковомозкових просторів, утворених за рахунок спонгізації. Деякі канали мають значні розширення та нерівномірні

контури країв, що свідчить про резорбцію кісткової тканини за периканалікулярним типом (рис. 3.15).

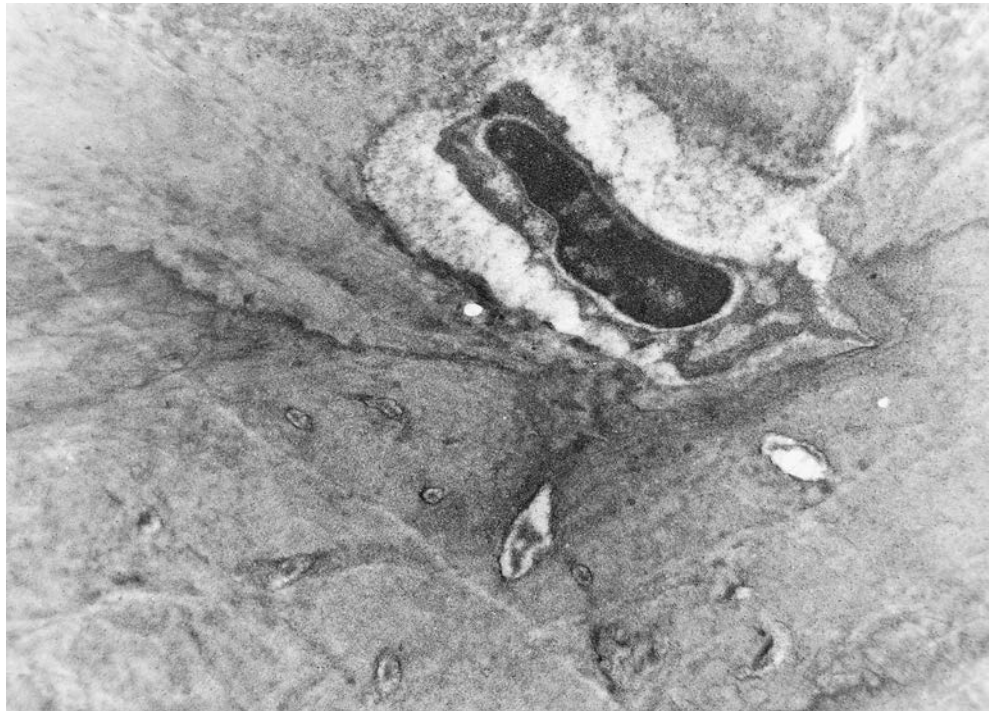


Рис. 3.14. Остеоцит у розширеній лакуні. Ділянка губчастої кістки метафіза щура-самиці. Дослід, 5 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×9500.

У всіх щурів остеони представлені, як правило, однією або двома генераціями концентричних кісткових пластинок, і дуже рідко спостерігаються остеони з трьома концентричними пластинками. Водночас у дослідних щурів більшість остеонів має гіперкальцифіковане кільце у вигляді базофільного забарвлення навколо центрального каналу остеона, що є ознакою стану зрілості та функціонального спокою остеону [9, 29]. В остеонному шарі щурів дослідної групи спостерігаються численні ділянки остеолізу за типом «рідкої кістки», низька щільність остеонів та перевага вставних кісткових пластинок (рис. 3.16), а також «запустілі» канали остеонів.

У всіх шарах кортексу дослідних щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, спостерігаються низька щільність остеоцитів та

ділянки без клітин. Більшість остеоцитів мають гіперхромні ядра (рис. 3.17). При ультраструктурному дослідженні навколо остеоцитів виявляється розширена лакуна з нерівномірними контурами країв, що є ознаками періостеоцитарного остеолізу (рис. 3.18).

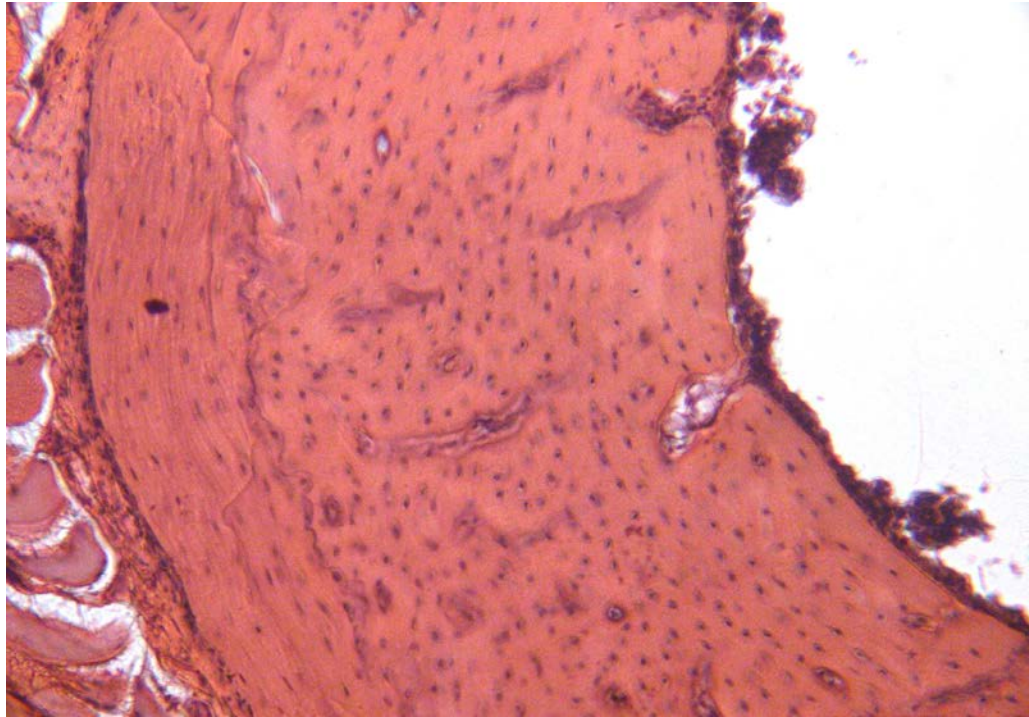


Рис. 3.15. Висока щільність проривних судинних каналів з ознаками периканалікулярної резорбції. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 5 місяців низькокальцієвої дієти. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

Морфометричний аналіз. За результатами морфометричного аналізу визначено, що у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію площа губчастої кістки, і відповідно, коефіцієнт відношення площі губчастої кістки до площі кістковомозкових просторів у самців менше в 1,47 раза, у самиць - в 1,33 раза, ніж у тварин контрольної групи (рис. 3.19 а). Це свідчить, що в умовах низькокальцієвої дієти протягом 5 місяців «втрата» губчастої кістки у самців відбувається швидше, ніж у самиць.

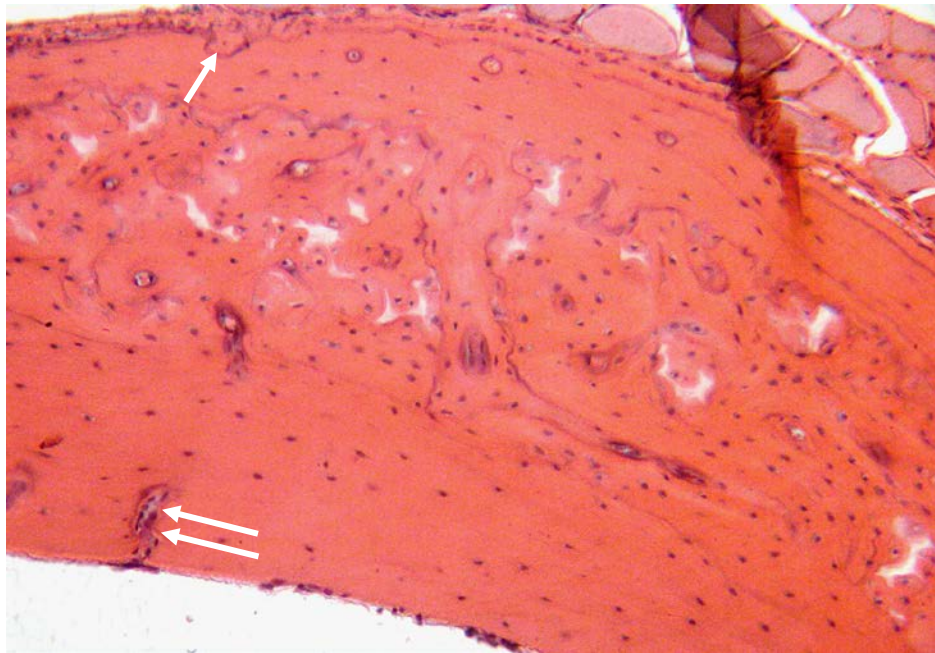


Рис. 3.16. Ділянки лізису в остеонному шарі компакної кістки. Гаушипова лакуна (стрілка) заглиблена у зону зовнішніх генеральних пластинок. Проривний судинний канал з ознаками периканалікулярної резорбції (дві стрілки). Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 5 місяців низькокальцієвої дієти. Гематоксилін та еозин. Ок.10[×], об.12,5[×].

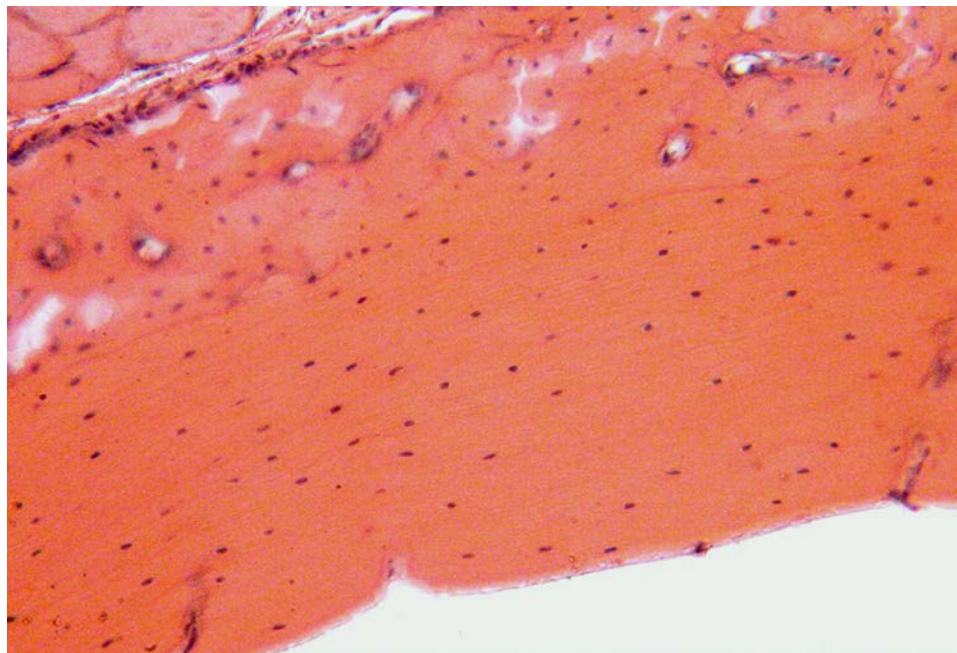


Рис. 3.17. Потовщений шар внутрішніх генеральних пластинок, що містить зони без клітин та остеоцити з гіперхромними ядрами. Діафіз стегнової кістки щура-самиці. Дослід, 5 місяців низькокальцієвої дієти. Гематоксилін та еозин. Ок.10[×], об.25[×].

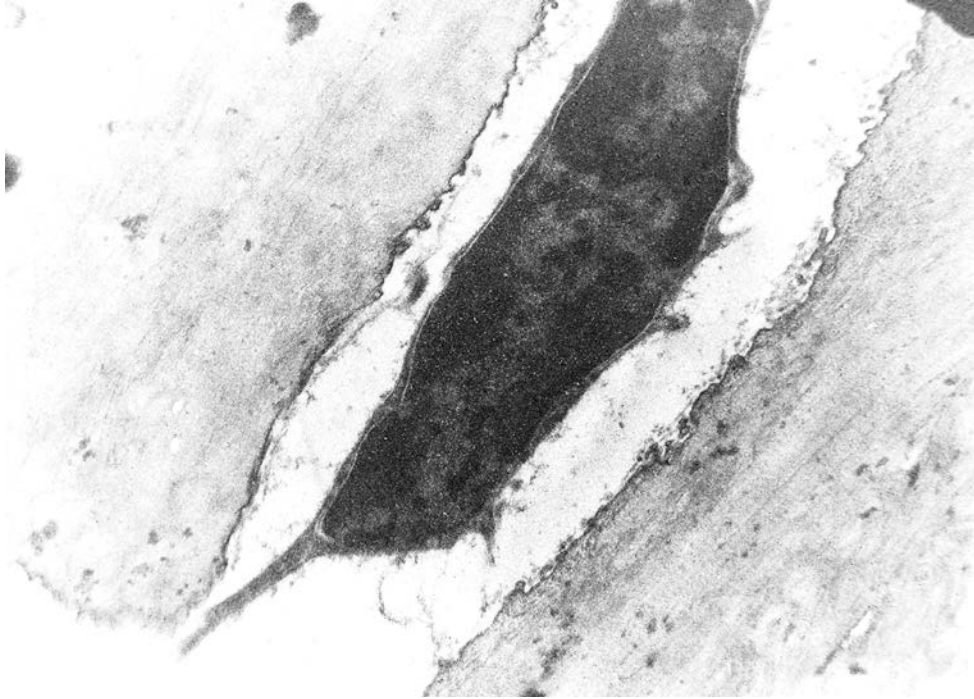
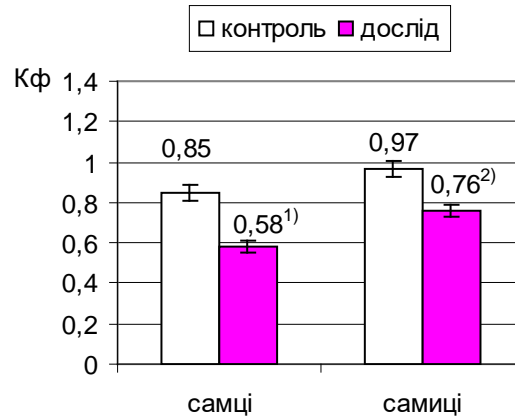


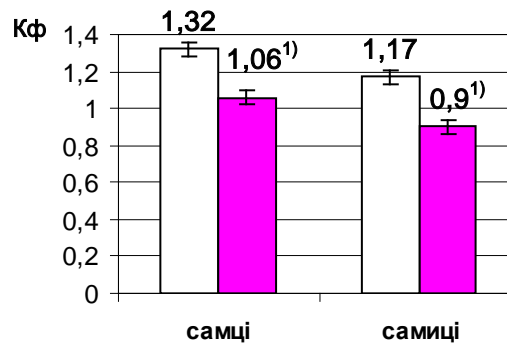
Рис. 3.18. Гетерохроматинізоване ядро та вузький шар цитоплазми остеокита, який знаходиться у розширеній лакуні з нерівномірними краями. Ділянка компакної кістки діафіза щура-самиці. Контроль, 5 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36×10400 .

Коефіцієнти відношення площі компакної кістки до площі кістковомозкової порожнини свідчать, що у всіх дослідних щурів спостерігається «втрата» компакної кістки: її площа достовірно менша у самців - в 1,25 раза, у самиць – в 1,27 раза порівняно з відповідними показниками у щурів контрольних груп (рис. 3.19 б).

Результати морфометричних досліджень ширини шарів кортексу діафіза показали, що у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію ширина остеонного шару достовірно менша, ніж у контрольних тварин, а саме: у самців – в 1,31 раза, у самиць – в 1,19 раза. Як наслідок, загальна ширина кортексу у самців дослідної групи менше в 1,21 раза порівняно з самцями контрольної групи, тоді як у самиць не виявлена статистично достовірна різниця (табл. 3.3).



а



б

Рис.3.19. Коефіцієнти (Кф) відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярного простору в епіфізі (а) та площі компактної кістки до площі кістковомозкового каналу в діафізі (б) стегнової кістки щурів після їх утримання на низькокальцієвій дієті протягом 5 місяців:

1) - $P < 0,001$;

2) - $P < 0,05$.

Дослідження діаметрів остеонів і центральних каналів остеонів визначило, що аліментарний дефіцит кальцію протягом 5 місяців не викликав достовірних змін цих параметрів у самиць, тоді як у дослідних самців діаметри центральних остеонних каналів стали більшими у 1,1 раза, а діаметри остеонів – у 1,2 раза порівняно з аналогічними показниками у самців контрольної групи (табл. 3.4).

**Морфометричні показники ширини зон компакної кістки у щурів
після низькокальцієвої дієти протягом 5 місяців ($M \pm m$, мкм)**

Зони	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Зовнішні генеральні пластинки	72,9±5,5	63,7 ±7,2	59,3±4,2 P ₂ <0,05	62,0±10,2
Внутрішні генеральні пластинки	120,1±8,0	111,3±8,5	106,0±7,0	118,5±9,9
Остеонний шар	262,9±8,9	201,3±10,4 P ₁ <0,01	199,3±9,5 P ₂ <0,01	167,7±8,5 P ₁ <0,05, P ₂ <0,05
Загальна ширина кортексу	455,9±5,1	376,3±9,7 P ₁ <0,01	364,6±5,8 P ₂ <0,01	348,2±6,3 P ₂ <0,05

Примітки:

1. P₁ - достовірна різниця порівняно з контрольною групою;
2. P₂ - достовірна різниця порівняно з самцями тієї ж групи.

Аналізуючи отримані морфометричні дані щодо діаметрів остеонних структур, що наведені у табл. 3.4, можна зробити декілька висновків. По-перше, не встановлена достовірна різниця обох досліджуваних показників між контрольними самцями та самицями, як не було її встановлено і у попередньому досліді, коли щури знаходились на низькокальцієвій дієті протягом 1 місяця. Отже, розміри діаметрів остеонів та їх каналів є видовою ознакою і за нормальних умов не визначається статтю щура.

Морфометричні показники остеонних структур компактної кістки у щурів після низькокальцієвої дієти протягом 5 місяців ($M \pm m$, мкм)

Показники	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Діаметр остеонів	26,5 ±1,1	31,2 ±1,0 P ₁ <0,01	29,4 ±1,3	28,1 ±1,0 P ₂ <0,05
Діаметр центральних каналів остеонів	5,9 ±0,2	6,5 ±0,3 P ₁ <0,05	5,9 ±0,3	6,0 ±0,2 P ₂ <0,05

Примітки:

1. P₁ - достовірна різниця порівняно з контрольною групою;
2. P₂ - достовірна різниця порівняно з самцями тієї ж групи.

По-друге, в умовах низькокальцієвої дієти ці показники виявили достовірну різницю залежно від статі (у самців збільшились, у самиць не змінилися), отже у самиць спостерігається більша, ніж у самців, «захищеність» остеонних структур від впливу цього негативного фактора, що можна пояснити «антирезорбтивною дією» естрогенів.

По-третє, збільшення діаметрів центральних каналів остеонів у дослідних самців свідчить про активність процесів кісткової резорбції. Важче пояснити збільшення діаметрів остеонів в умовах аліментарного дефіциту кальцію, тому що воно свідчить про збільшення інтенсивності кісткоутворення в остеонах, якому суперечить виявлена активізація резорбції каналів остеонів. Можливо такий результат пов'язаний з тим, що у дослідних тварин спостерігались переважно зрілі остеони, ніж остеони у стані формування.

Таким чином, при аліментарному дефіциті кальцію протягом 5 місяців у кістковій тканині щурів обох статей спостерігається перевага резорбційних процесів над процесами кісткоутворення. Відмічаються всі типи кісткової резорбції, які виявлені у щурів після утримання на низькокальцієвій дієті протягом 1 місяця (див. вище). За морфометричною оцінкою у дослідних самців і самиць визначається менша площа як губчастої, так і компактної кістки, а також менша ширина остеонного шару кортексу. Кісткова резорбція у самців виражена у більшому ступені, ніж у самиць.

3.3. Структурна організація губчастої та компактної кістки після 11-місячної низькокальцієвої дієти

Губчаста кістка. У всіх тварин дослідної групи (як самців, так і самиць) губчаста кістка представлена розрідженою сіткою кісткових трабекул. Більшість трабекул мають ділянки різкого потоншення та осередки деструкції. Також виявляються трабекули з відшаруваннями поверхневих кісткових пластин, мікротріщинами та некротичними кістковими фрагментами в міжламкових зонах. На поверхні трабекул спостерігаються резорбційні (гаушипові) лакун, але остеокласти визначаються дуже рідко. Порівняно зі щурами контрольної групи кісткові трабекули дослідних тварин характеризуються низькою щільністю остеоцитів та збільшеною кількістю остеоцитарних лакун, що мають клітини з пікнотичними ядрами, або “порожніх” лакун. У кістковому мозку визначаються ознаки жирової дистрофії - підвищена щільність адипоцитів переважно крупних розмірів.

При електронномікроскопічному дослідженні у дослідних щурів виявляються кісткові трабекули, вкриті шаром переважно спочиваючих остеобластів подовженої форми з досить гетерохроматинізованим ядром та електронно-щільною цитоплазмою, іноді спостерігаються “оголені” ділянки трабекул. Поблизу поверхні окремих трабекул визначаються преостеобласти,

макрофаги крупних розмірів з численними осміофільними вторинними лізосомами та дрібні мононуклеарні фагоцити з гіперхромним ядром.

На поверхні кісткових трабекул нерідко спостерігаються «відкриті» лакуни остеоцитів (рис. 3.20), біля деяких з них зосереджені сегментноядерні нейтрофіли, які, імовірно, беруть участь у фагоцитозі фрагментів деструкції остеоцитів. Водночас у тварин контрольної групи біля поверхні кісткових трабекул визначається значно більше ділянок з преостеобластами (рис. 3.21).

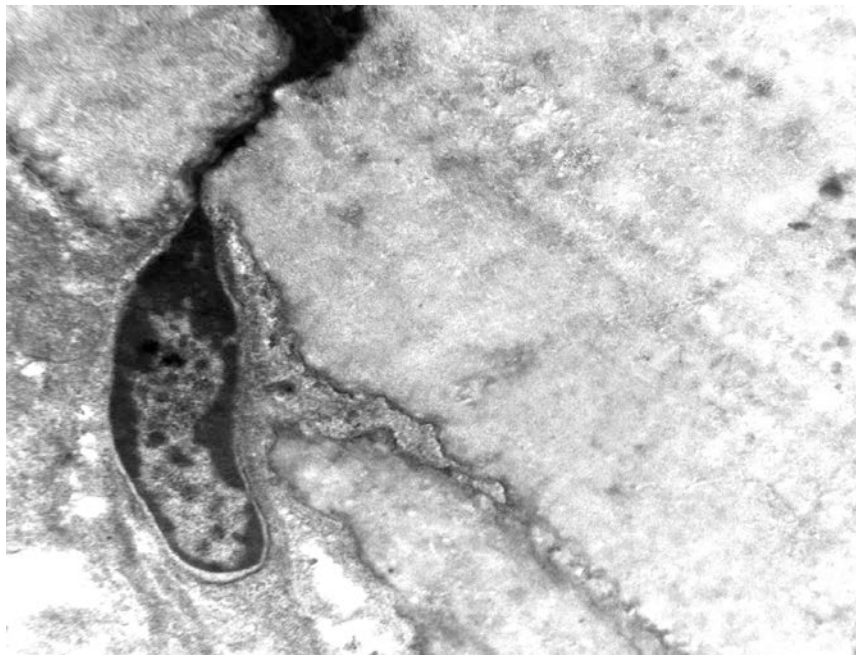


Рис. 3.20. «Відкрита» лакуна з деструктивним остеоцитом на поверхні трабекули. Ділянка губчастої кістки метафіза щура-самиці. Дослід, 11 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×13300.

Кістковий матрикс трабекулярної кістки дослідних щурів має нерівномірну мінеральну щільність, численні (різної ширини та хаотичного розташування) осміофільні лінії цементації, біля яких спостерігається формування деструктивних щілин. Відмічені крупні осередки деструкції кісткового матриксу у вигляді тканинного детриту (рис. 3.22). Ділянки мінералізованого кісткового матриксу з високою щільністю кісткових

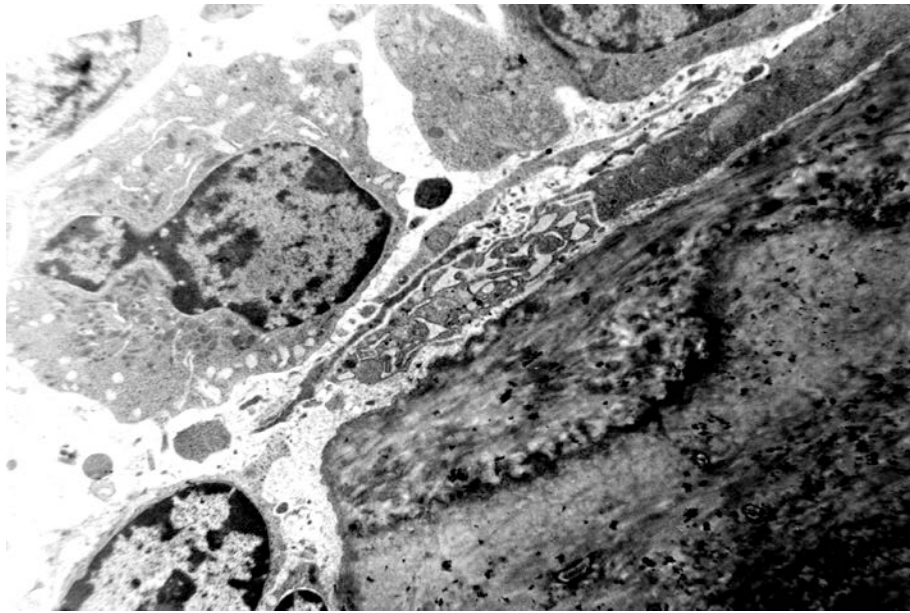


Рис. 3.21. Преостеобласт кубоїдної форми з ексцентрично розташованим ядром біля спочиваючого остеобласта. Ділянка губчастої кістки метафіза щура-самиці. Контроль, 11 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. $36. \times 5700$.

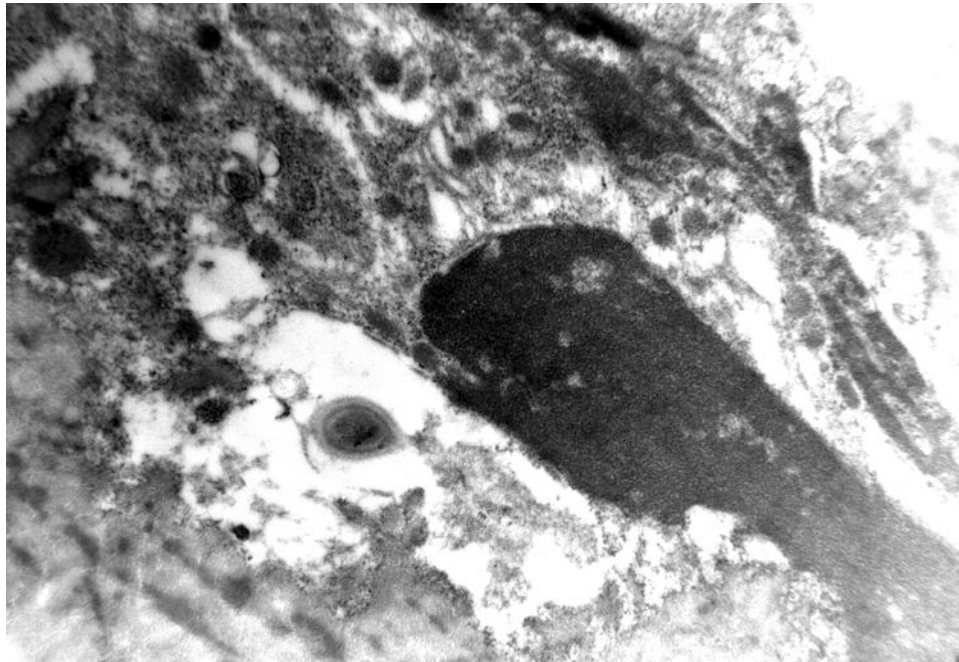


Рис. 3.22. Осередок деструкції кісткового матриксу у вигляді тканинного детриту. Ділянка губчастої кістки метафіза щура-самиці. Дослід, 11 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. $36. \times 6500$.

каналців межують з полями слабо мінералізованого матриксу, який має низьку електронну щільність та містить матриксні везикули.

Компактна кістка. У компактній кістці дослідних щурів обох статей порівняно з тваринами контрольної групи виявляється низька щільність остеоцитів. Більшість остеоцитів має розширені лакуни, спостерігаються численні лакуни без остеоцитів. В остеонному шарі визначаються численні резорбційні порожнини різних розмірів. Остеони представлені переважно однією, інколи двома, генераціями концентричних кісткових пластинок. Остеонів мало, значну територію остеонного шару займають вставні кісткові пластинки. Шари кортексу перетинають проривні судинні канали, частина з яких повністю запустила, а інші містять детрит. На окремих ділянках кортексу шар внутрішніх генеральних пластинок практично відсутній.

У компактній кістці самців і самиць, яких утримували на низькокальцієвій дієті, визначаються розширені остеоцитарні лакуни з нерівномірними краями (рис. 3.23) та великі за розмірами судинні канали, які трансформуються у порожнини деструкції, що свідчить про активізацію резорбційних процесів переважно за периканалікулярним типом резорбції та періостеоцитарним остеолізисом. На ділянках кісткового матриксу з різною мінеральною щільністю спостерігаються лакуни з рештками клітин у вигляді детриту. У мінералізованому матриксі щурів контрольної групи, на відміну від дослідної, відмічається більша щільність каналців цитоплазматичних відростків.

Морфометричний аналіз. Результати морфометричного дослідження свідчать, що в умовах тривалого аліментарного дефіциту кальцію у самців площа губчастої кістки менша в 1,11 раза, ніж у контролі. У самиць за цим показником достовірних змін не виявлено (рис. 3.24 а).

Площа компактної кістки, навпаки, у самиць менша в 1,12 раза порівняно з контролем, у самців - без достовірних змін, але в цілому визначено, що площа компактної кістки у самиць більша, ніж у самців, як у

контрольній (в 1,5 раза), так і в дослідній (в 1,3 раза) групах (рис. 3.24 б). Все це свідчить, що у щурів 12-місячного віку після 11-місячного аліментарного дефіциту кальцію виявляється помірна резорбція кісткової тканини, а також про вплив на її перебіг статевих гормонів, тому що у самців та самиць спостерігається різна інтенсивність «втрати» губчастої та компактної кістки.

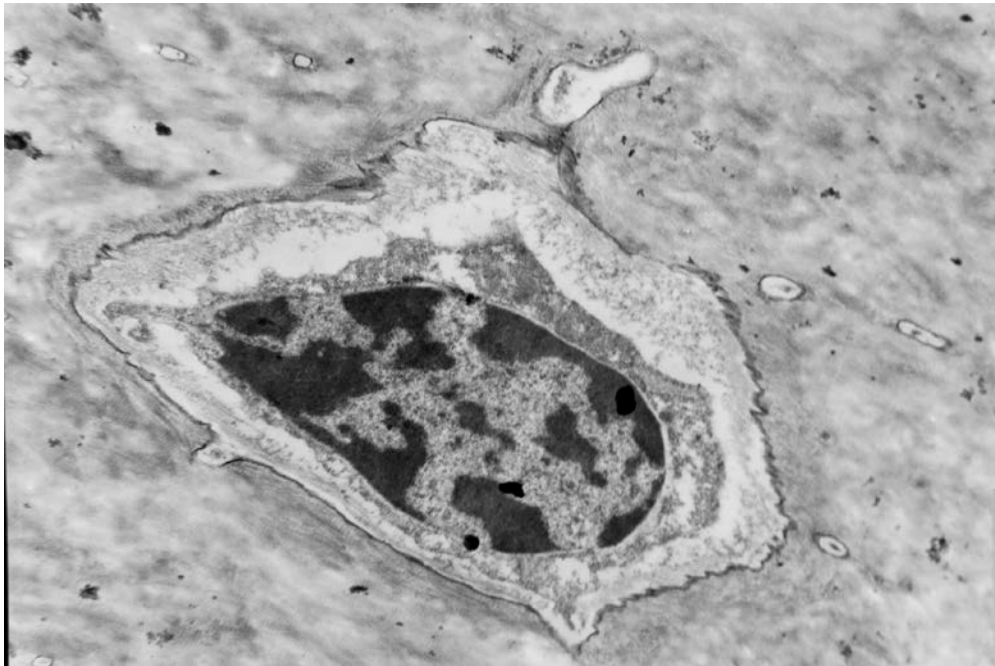
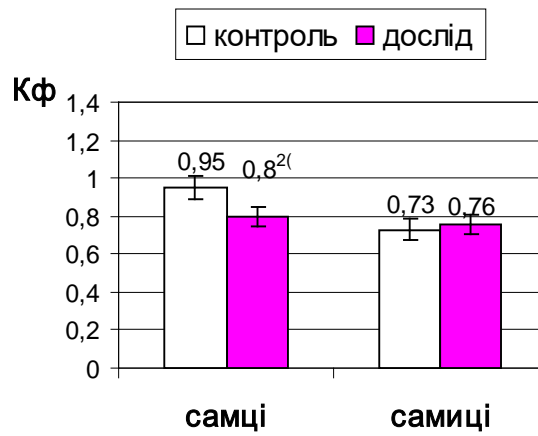


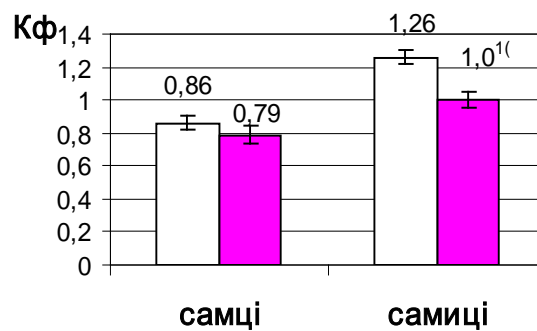
Рис. 3.23. «Зигзагоподібні» краї лакуни, в якій розташований остеоцит з вузьким шаром цитоплазми та ділянками цитоплазматичної деструкції. Ділянка компактної кістки діяфіза щура-самиці. Дослід, 11 місяців низькокальцієвої дієти. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36.×9500.

Результати морфометричного дослідження ширини шарів кортексу виявили, що після 11-місячної низькокальцієвої дієти у всіх щурів дослідної групи достовірно менша ширина шару зовнішніх генеральних пластинок порівняно з контрольними тваринами, а саме: у самців – в 1,61 раза, у самиць – в 1,74 раза (табл. 3.5). Це в результаті позначилось на загальній ширині кортексу: у дослідних самців вона менша в 1,15 раза, у дослідних самиць – менша в 1,16 раза порівняно з тваринами контрольної групи. Можна вважати,

що у тварин даної групи дослідження загальна «втрата» кісткової тканини пов'язана з низьким періостальним кісткоутворенням.



а



б

Рис.3.24. Коефіцієнти (Кф) відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярних просторів в епіфізі (а) та площі компактної кістки до площі кістковомозкової порожнини в діяфізі (б) стегнової кістки щурів після їх утримання на низькокальцієвій дієті протягом 11 місяців:

1)- $P < 0,001$;

2)- $P < 0,05$.

Морфометричне дослідження діаметрів остеонів та їх центральних каналів не виявило статистичної достовірності впливу тривалого аліментарного дефіциту кальцію на параметри цих показників, а також їхньої залежності від статі щурів (табл. 3.6).

Таблиця 3.5

Морфометричні показники ширини зон компактної кістки у щурів після низькокальцієвої дієти протягом 11 місяців ($M \pm m$, мкм)

Зони	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Зовнішні генеральні пластинки	126,6 ±19,2	78,8 ±5,5 P ₁ <0,05	79,6 ±14,6	45,7±6,4 P ₁ <0,05 P ₂ <0,001
Внутрішні генеральні пластинки	76,4 ±6,0	75,4 ±8,9	68,7 ±4,3	64,6 ±7,9
Остеонний шар	194,9 ±10,6	190,5 ±11,9	194,3 ±12,7	186,6 ±10,2
Загальна ширина кортексу	397,9 ±14,6	344,7±12,7 P ₁ <0,01	342,6 ±13,2 P ₂ <0,01	296,9±13,7 P ₁ <0,05 P ₂ <0,05

Примітки:

1. P₁ - достовірна різниця порівняно з контрольною групою;
2. P₂ - достовірна різниця порівняно з самцями тієї ж групи.

Результати проведеного експериментального дослідження по вивченню впливу 11-місячної низькокальцієвої дієти на структурну організацію кісткової тканини встановили, що у щурів як контрольної, так і дослідної

груп спостерігається комплекс структурних змін у кістковій тканині. Вони свідчать про помірний перебіг процесу ремоделювання кістки з перевагою резорбції над кісткоутворенням, що може бути наслідком вікового зниження активності кісткоутворення, але у дослідних щурів резорбція більш виражена, ніж у контрольних тварин, тобто викликана впливом аліментарного дефіциту кальцію.

Таблиця 3.6

Морфометричні показники остеонних структур компактної кістки у щурів після низькокальцієвої дієти протягом 11 місяців ($M \pm m$, мкм)

Показники	Самці		Самиці	
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	контроль (n=5)	дослід (n=5)
Діаметр остеонів	35,4 \pm 2,9	30,3 \pm 1,4	34,0 \pm 2,4	35,0 \pm 2,4
Діаметр центральных каналів остеонів	7,0 \pm 0,6	6,8 \pm 0,4	7,7 \pm 0,6	6,9 \pm 0,7

Наше дослідження впливу низькокальцієвої дієти на масу тіла дослідних щурів встановило, що при 1- та 5-місячному аліментарному дефіциті кальцію цей показник і у самців, і у самиць достовірно не відрізнявся від контрольних показників, тоді як після 11-місячного - у самців дослідної групи середня маса тіла була в 1,13 раза менша, ніж у контрольних самців, утриманих на стандартному раціоні харчування (табл. 3.7).

Отже, в експерименті на 84 білих лабораторних щурах вивчений вплив аліментарного дефіциту кальцію (0,03 %) впродовж 1, 5, 11 місяців на структуру кісткової тканини. Гістологічне, ультраструктурне та

Таблиця 3.7

Маса тіла щурів на різних термінах моделювання аліментарного дефіциту кальцію відповідно до вікової групи (M±m, г)

Вік щурів, вікова група*	Тривалість низько-кальцієвої дієти	n	Самці		Самиці	
			контроль	дослід	контроль	дослід
1 місяць, інфантильні	---	21	57,1±1,8	58,1±1,9	54,3±1,8	56,2±1,6
2 місяці, ювенільні	1 місяць	7	199,0±12,3	212,1±9,2	145,0±7,9	140,0±7,9
6 місяців, молоді	5 місяців	7	364,7±11,6	341,7±3,7	256,7±10,5	247,4±3,0
12 місяців, зрілі	11 місяців	7	477,1±14,3	421,4±14,5 P<0,05	321,3±7,19	327,1±5,2

Примітка. *- вікові групи щурів наведені за класифікацією И.П.Западнюк и соавт. (1983).

морфометричне дослідження губчастої та компактної речовини стегнової кістки щурів виявило, що на всіх досліджених термінах низькокальцієвої дієти у дослідних тварин обох статей процеси кісткової резорбції переважають над процесами кісткоутворення. При цьому результати морфометричного аналізу свідчать про різну швидкість «втрати» кісткової тканини у самців та самиць, і підтверджують дані, що естрогени відіграють домінуючу роль у “захисті” губчастої кістки, а андрогени – компактної кістки [62].

Враховуючи отримані нами результати та дані літератури про різні у самців та самиць темпи розвитку та ступінь прояву структурних змін губчастої кістки в умовах низькокальцієвої дієти (в нашому експерименті

вони найбільш виражені у самців після 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію), подальші наші дослідження з вивчення впливу цього фактора на репаративний остеогенез у змодельованому дефекті метафіза та на остеогенні властивості клітин кісткового мозку були проведені на щурах-самцях, після їх утримання на низькокальцієвій дієті протягом 5 місяців.

РОЗДІЛ 4

**СТАДІЙНО-ЧАСОВІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗУ ПРИ ВІДНОВЛЕННІ ЗМОДЕЛЬОВАНОГО ДЕФЕКТУ
У МЕТАФІЗИ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ, ЯКИХ УТРИМУВАЛИ
В УМОВАХ НИЗЬКОКАЛЬЦІЄВОЇ ДІЄТИ**

У даному розділі представлені дані комплексного морфологічного дослідження (світлооптична, електронна мікроскопія та гістоморфометрія) особливостей репаративного остеогенезу у щурів-самців, яких з 1-місячного віку утримували на низькокальцієвій дієті протягом 5 місяців, а також впродовж подальшого післяопераційного періоду. Особлива увага приділена дослідженню процесу остеорепарації на стадіях травматичного запалення, проліферації та диференціювання клітин регенерату, які тривають перші сім днів після ушкодження, відповідно до класифікації стадійності відновлення кісткового дефекту у щурів [28]:

- 1 стадія - ушкодження;
- 2 стадія (1-3 доба) - травматичне запалення, міграція клітин у ділянку дефекту, реорганізація гематоми;
- 3 стадія (2-7 доба) – проліферація, диференціювання клітин, початок формування тканинних структур регенерату;
- 4 стадія (5-14 доба) - диференціювання різних видів сполучних тканин, їх реорганізація, початок мінералізації;
- 5 стадія (13-21 доба) – мінералізація кісткової тканини, початок ремоделювання кісткового регенерату;
- 6 стадія (20-45 доба) – ремоделювання регенерату;
- 7 стадія - завершення процесу.

1 доба після травматичного ушкодження. При макроскопічному обстеженні оперованої стегнової кістки щурів контрольної і дослідної груп з обох боків метафіза чітко визначалась зона дефекту у вигляді округлих

порожнин, які заповнені масами темно-червоного кольору, а також ділянки крововиливу у тканини, що прилеглі до кісткового дефекту.

Гістологічне дослідження вмісту кісткового дефекту щурів обох груп виявило схожу загальну картину запального процесу. Значна площа центральної ділянки дефекту заповнена згустками крові та масами з фібринових тяжів, між якими розташовані ділянки плазмоподібної набрякової рідини, дрібні кісткові уламки, клітини запалення (лімфоцити, нейтрофіли, макрофаги) (рис. 4.1, 4.2).

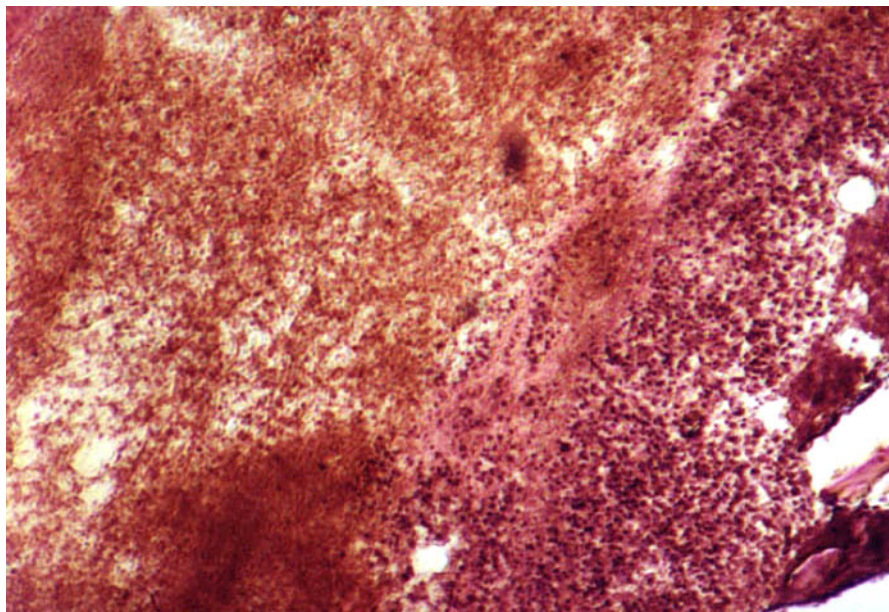
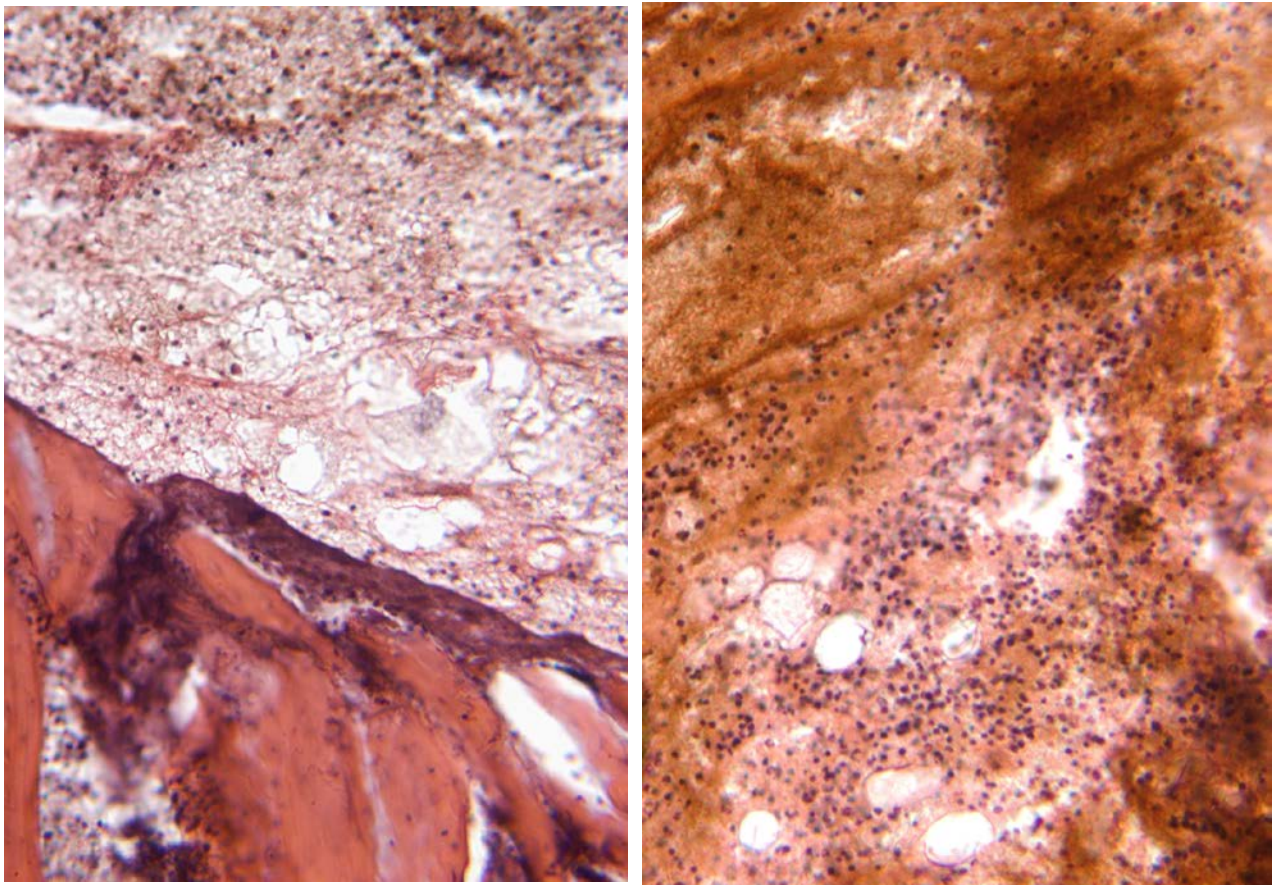


Рис. 4.1. Гематома (Г) з ділянками плазмоподібної набрякової рідини у центрі дефекту. Реорганізація гематоми у крайовій зоні дефекту. Дослід, 1 доба після операції. Гематоксилін та еозин. Ок.10[×], об.6,3[×].

Материнська кістка у краях дефекту має ділянки некрозу (рис. 4.2 а). Міжтрабекулярні простори, що прилягають до дефекту, містять згустки крові та уламки материнської кістки. На цих ділянках збільшена щільність фібробластів та макрофагів. Кровоносні судини кісткового мозку розширені.

Ультраструктурний аналіз клітинного складу вмісту кісткового дефекту у контрольних та дослідних щурів підтвердив наявність всіх типів клітин, які

визначені при гістологічному дослідженні. Це - велика кількість еритроцитів та нейтрофілів різного ступеню функціональної активності, а також макрофаги, лімфоцити, плазмоцити та МДСК.



а

б

Рис. 4.2. Клітини запалення та стільникоподібні порожнини (як прообрази синусоїдів) з широкими просвітами у кров'яному згустку, край якого межує з некротизованою ділянкою материнської кістки (а). Тяжі фібрину, скупчення еритроцитів, синусоїди різних розмірів у ділянці гематоми (б). Контроль, 1 доба після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Нейтрофіли, які розташовані у кров'яному згустку, мають ознаки руйнування та дегрануляції. У крайових відділах кісткового дефекту локалізовані переважно активні нейтрофіли, цитоплазма яких містить численні вакуолоподібні структури різної електронної щільності.

Макрофаги, які виявляються у ділянці кісткового дефекту тварин

контрольної та дослідної груп, належать переважно до фагоцитарного типу. Вони мають довгі цитоплазматичні відростки, у цитоплазмі відмічено скупчення щільних осміофільних фігур.

Поодинокі плазматичні клітини мають розвинену гранулярну ЕПС з упорядковано розташованими каналцями. Як відомо, плазмоцити – це антиген-стимульовані В-лімфоцити, які беруть участь у гуморальних імунологічних реакціях, а саме синтезують антитіла (Ig E) [20].

Якісний склад клітин запалення у тварин дослідної та контрольної груп був аналогічним, за винятком тканинних базофілів, які не спостерігались у досліді. При виконанні кількісного аналізу встановлено, що через 1 добу після операції у зоні дефекту стегнової кістки щурів і контрольної, і дослідної груп переважають нейтрофіли, лімфоцити та макрофаги (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Клітинний склад у дефекті метафіза стегнової кістки у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 1 добу після операції (M±m, %)

Типи клітин	Групи експерименту		P
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	
Нейтрофільні гранулоцити	32,4±4,6	43,1±5,5	>0,05
Лімфоцити	24,2±2,4	22,5±4,0	>0,05
Макрофаги	19,0±0,6	16,4±2,0	>0,05
Плазмоцити	10,5±2,0	14,3±3,3	>0,05
Тканинні базофіли	2,1±0,4	Не виявлені	----
МДСК	11,8±0,7	3,7±0,9	<0,001

Статистичний аналіз визначив, що у дослідних щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, кількість МДСК була достовірно меншою (в 3,2

раза) порівняно з тваринами контрольної групи. Щільність МДСК вища в крайових відділах дефектів, ніж у центральних ділянках. Ці дані свідчать, що стромальні клітини кісткового мозку беруть активну участь у формуванні клітинного пулу у ділянці регенерату.

2 доби після травматичного ушкодження. Макроскопічно було виявлено, що зони дефекту у тварин обох груп заповнені масами бурого кольору.

Гістологічний аналіз показав, що у щурів дослідної групи площа дефекту та прилеглих до нього міжтрабекулярних просторів зайнята переважно ділянками крововиливу зі скупченням еритроцитів серед фібринових волокон та уламків материнської кістки. Визначається велика кількість клітин запалення, насамперед дегранульованих нейтрофілів, якими інфільтрований вміст дефекту та прилеглих до дефекту ділянок. В той же час, запальна реакція має серозний характер і відповідає асептичному типу запалення.

При електронномікроскопічному дослідженні серед фрагментів гематоми виявляється формування «стільникоподібних» просвітів, як прообраз синусоїдних капілярів. У зоні дефекту щурів контрольної групи навколо ділянок крововиливу, набрякової рідини та уламків материнської кістки визначаються лімфоцити, нейтрофіли, макрофаги, а також клітини фібробластичного диферону, щільність яких більша порівняно з 1 добою після операції, а також порівняно зі щільністю клітин у дефектах щурів дослідної групи.

У крайових відділах дефекту біля материнської кістки спостерігається формування синусоїдів. Звертає увагу наявність у дефекті тромбоцитів. Як відомо за літературними даними, у тромбоцитах залежно від вмісту розрізняють 3 типи гранул (α , δ , λ) та мікропероксисоми. Гранули містять цілий ряд речовин, які визначають широкий спектр функцій тромбоцитів в умовах травматичного ушкодження та репаративній регенерації. У гранулах λ виявлені лізосомальні гідролітичні ферменти, котрі беруть участь у

розчиненні тромбу. Гранули δ містять АДФ, АТФ, P_i , Ca^{2+} , а також вазоактивні аміни (серотонін та гістамін), які збільшують проникливість стінок судин, що сприяє міграції клітин до осередку запалення. Найбільш широкий спектр речовин знаходиться в α -гранулах: фактори згортання крові, фібронектин, фібриноген, а також фактори росту (ФРТ, ТФР- β , ФРФ, ІЛ-1), які стимулюють хемотаксис лейкоцитів, макрофагів та фібробластів, проліферацію лімфоцитів, фібробластів, ендотеліальних клітин, міграцію остеобластів [19, 21]. Все це свідчить про важливість участі тромбоцитів у регуляції процесів травматичного запалення та ангіогенезу, який є запорукою нормального перебігу остеорепарації.

В ділянці дефекту у тварин дослідної групи виявляються макрофаги, будова яких свідчить про їх малоактивний стан (рис. 4.3), тоді як у щурів контрольної групи спостерігаються переважно макрофаги, що активно секретують (рис. 4.4) та фагоцитують. Відомо, що, окрім факторів, які синтезовані активованими Т-лімфоцитами і нейтрофілами, у ролі стимуляторів хемотаксису макрофагів можуть виступати фрагменти фібронектину та продукти розпаду колагенових волокон [125]. Макрофаги беруть участь у поєднанні ексудативної та проліферативної фаз запалення, тому зниження їх кількості та активності негативно впливає на бактерицидну функцію, детоксикацію та «очищення» ділянки ушкодження від продуктів розпаду клітин і матриксу. Водночас самі макрофаги є джерелом факторів росту (ФРТ, ФРФ, ТФР- β , ФНП- α та ін.), монокінів (відомо більше 40), які беруть участь у процесах проліферації та диференціації фібробластів, гранулоцитів, лімфоцитів, моноцитів та ін., тобто макрофаги виконують роль регуляторів запального процесу, які впливають на хемотаксис, забезпечуючи кооперацію клітин [17, 19, 49]. Саме незначною кількістю функціонально активних макрофагів, що виявлені у зоні дефекту тварин дослідної групи, можна пояснити присутність обширних територій клітинного та тканинного детриту.

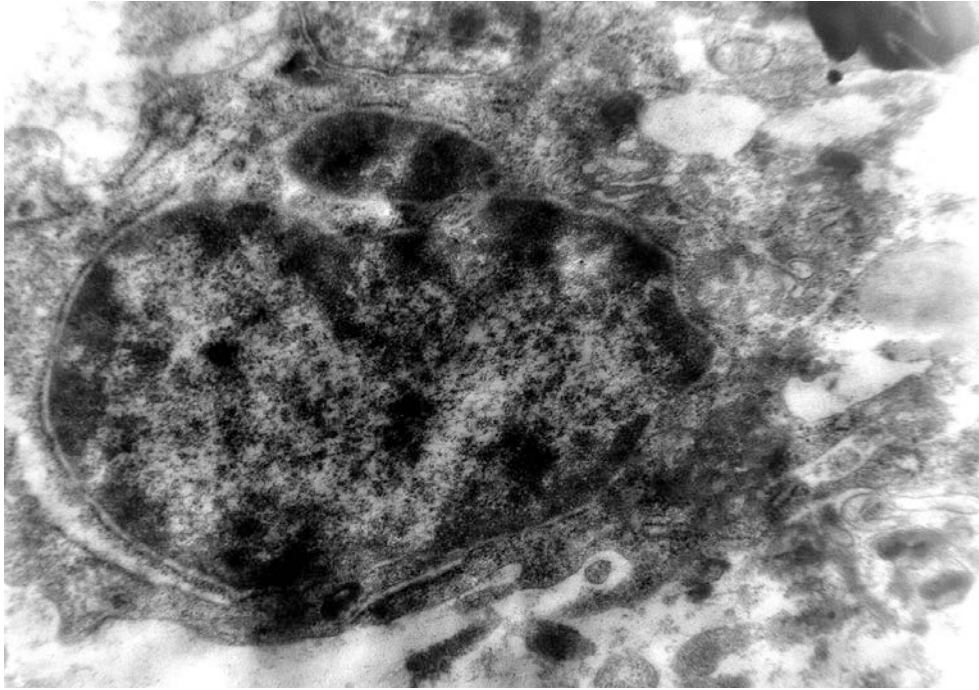


Рис. 4.3. Макрофаг з вузьким шаром цитоплазми. Дослід, 2 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×22800.

При дослідженні зони кісткового дефекту щурів контрольної і дослідної груп серед фібринових мас та скупчень еритроцитів виявляються поодинокі тканинні базофіли з короткими цитоплазматичними відростками, помірно розвинутою ЕПС, численними гранулами різної електронної щільності (рис. 4.5). Відомо, що тканинні базофіли на запальній стадії процесу остеорепації можуть виконувати декілька функцій. Важливою ланкою дії цих клітин вважають їх участь у стимулюванні локальних процесів ангіогенезу та кровообігу, що пов'язано із синтезом та секрецією біологічно активних речовин - гепарину, гістаміну та серотоніну.

Не менш важливою є катаболічна функція тканинних базофілів, яка здійснюється численними ферментами (триптаза, химаза, гексозамінідаза, пероксидаза та ін.) та спрямована на руйнування структурних компонентів міжклітинного матриксу (фібронектину, фібриногену, глікопротеїнів, протеогліканів, колагену та ін.). Тканинні базофіли також стимулюють

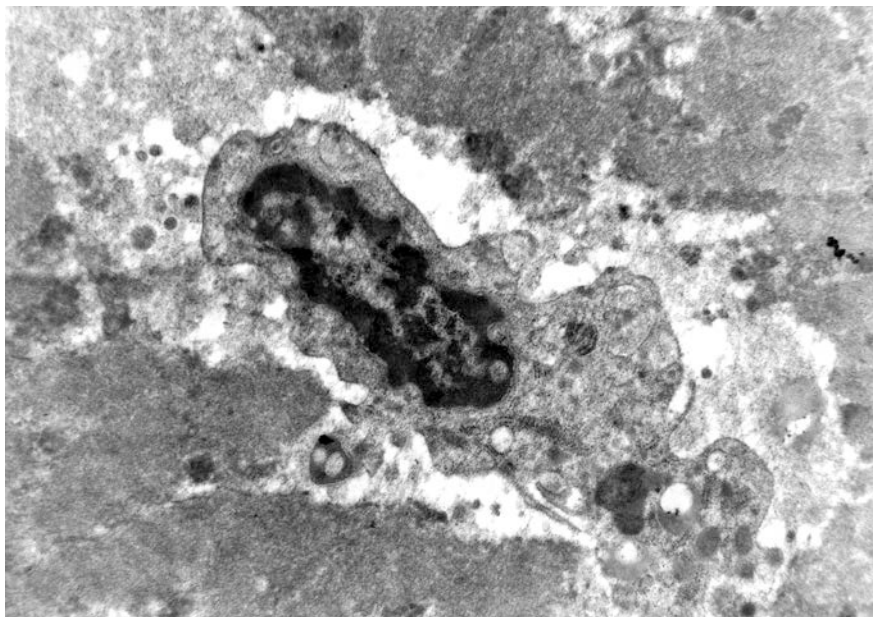


Рис. 4.4. Макрофаг секретуючого типу з вакуолями та профілями ЕПС у цитоплазмі, який розташований серед фрагментів кісткового матриксу. Контроль, 2 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×13000.

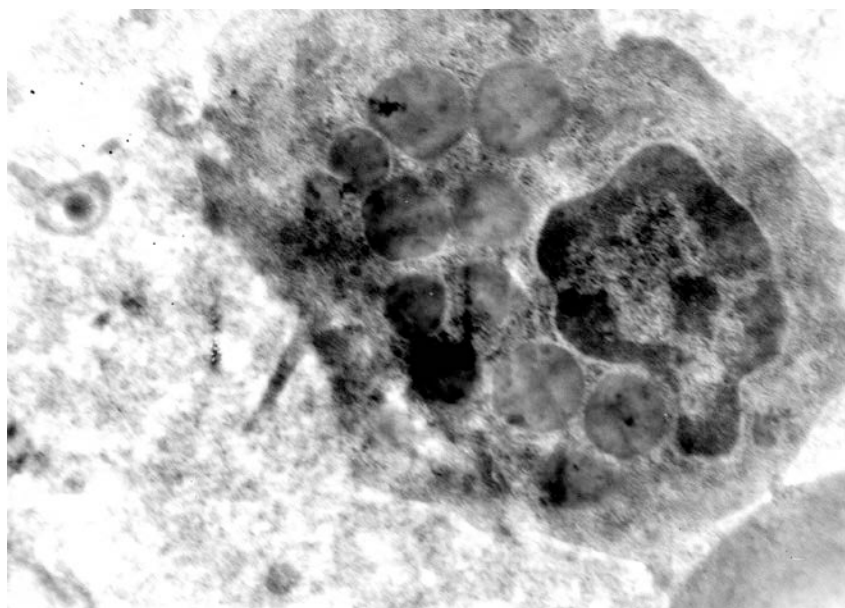


Рис. 4.5. Тканинний базофіл з перинуклеарним розташуванням гранул. Дослід, 2 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×20200.

хемотаксис нейтрофілів та еозинофілів за допомогою секреції факторів хемотаксису відповідних гранулоцитів. Активовані тканинні базофіли виробляють медіатори прозапалення (простагландини, лейкотрієни), які збільшують судинну проникливість та сприяють міграції клітин запалення до осередку запалення, виникненню набряку [19]. Все це свідчить, що тканинні базофіли входять до «ансамблю» клітин запалення, які визначають та регулюють перебіг репаративного остеогенезу на стадії травматичного запалення. Результати численних досліджень, що наведені в літературі, підтверджують існування між цими клітинними популяціями зворотного зв'язку, що регулює розгортання запальної реакції, при порушенні якої відбувається пролонгація процесу, що може набути хронічного характеру [14].

3 доби після травматичного ушкодження. При макроскопічному обстеженні оперованої стегнової кістки щурів і контрольної, і дослідної груп з обох боків метафізу чітко визначались зони дефекту у вигляді округлих порожнин, які заповнені бурими масами, а також ділянки крововиливу у тканинах, прилеглих до дефекту.

При гістологічному дослідженні у зоні кісткового дефекту щурів обох груп виявляються ділянки грануляційної тканини, залишки кров'яного згустку та фібринових мас, уламки материнської кістки, клітини запалення (нейтрофіли, лімфоцити, макрофаги, поодинокі плазмоцити та тканинні базофіли), МДСК, а також фібробласти на різних стадіях диференціювання та функціональної активності. Грануляційна тканина сформувалась переважно біля країв дефекту. У ній виявляються кровоносні судини з вузькими просвітами. Відомо, що ріст мікросудин у грануляційній тканині відбувається синхронно з проліферацією фібробластів [17]. У зв'язку з тим, що при зниженні кількості фібробластів у клітинному складі регенерату порушується процес ангиогенезу, то у подальшому це може відбитись на формуванні тканин регенерату.

Відмітною особливістю зони травматичного ушкодження дослідних щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, є менша кількість клітин фібробластичного диферону та більша кількість клітин запалення з перевагою нейтрофілів у грануляційній тканині, ніж у тварин контрольної групи. Водночас спостерігаються ділянки, значна площа яких зайнята уламками материнської кістки та згустками крові зі зменшеною кількістю як клітин запалення, так і фіброblastів (рис. 4.6). За даними літератури відомо, що проліферація фіброblastів гальмується як в умовах значно збільшеної кількості нейтрофілів (наприклад, при гнійному запаленні), так і в умовах їх невеликої кількості (наприклад, при лазерній обробці рани) [17].

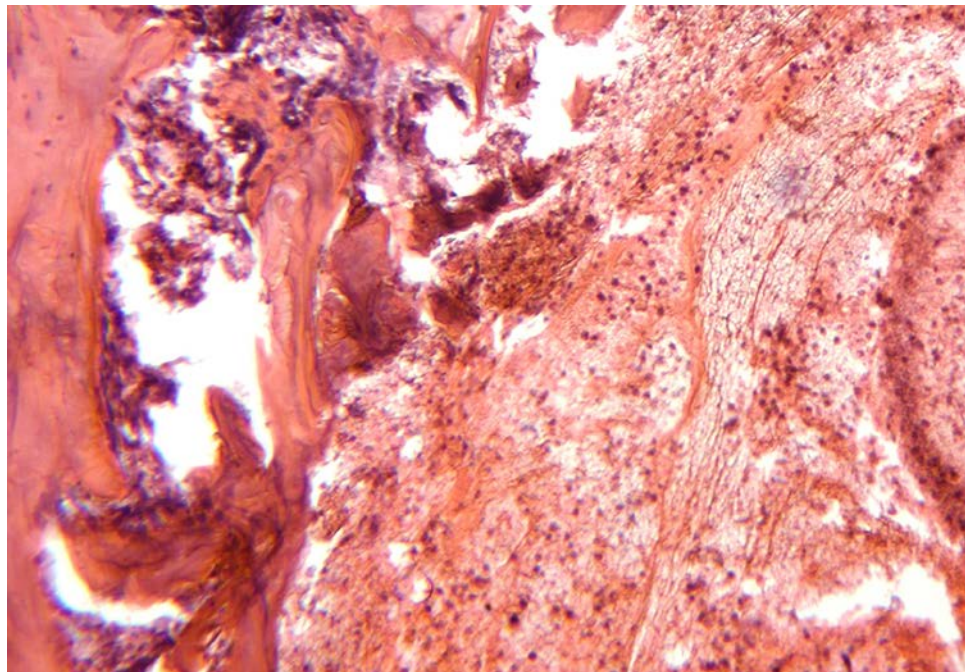


Рис. 4.6. Уламки материнської кістки у крайовому відділі дефекту, тяжі фібрину та низька щільність клітин у ділянці гематоми. Дослід, 3 доби після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

При електронномікроскопічному дослідженні вмісту дефектів контрольних щурів виявляються молоді фіброblastи з крупним подовженим ядром, яке має 1-2 ядерця та еухромний каріовміст, що свідчить про активність процесів транскрипції. Ядро цих клітин оточено вузьким шаром

цитоплазми, котра містить малорозвинуті мембранні органоїди, але у ЕПС визначаються ділянки розширення каналців з накопиченими продуктами метаболізму (рис. 4.7). У цитоплазмі інших молодих фібробластів спостерігається більш розвинута система мембранних органоїдів (рис. 4.8).

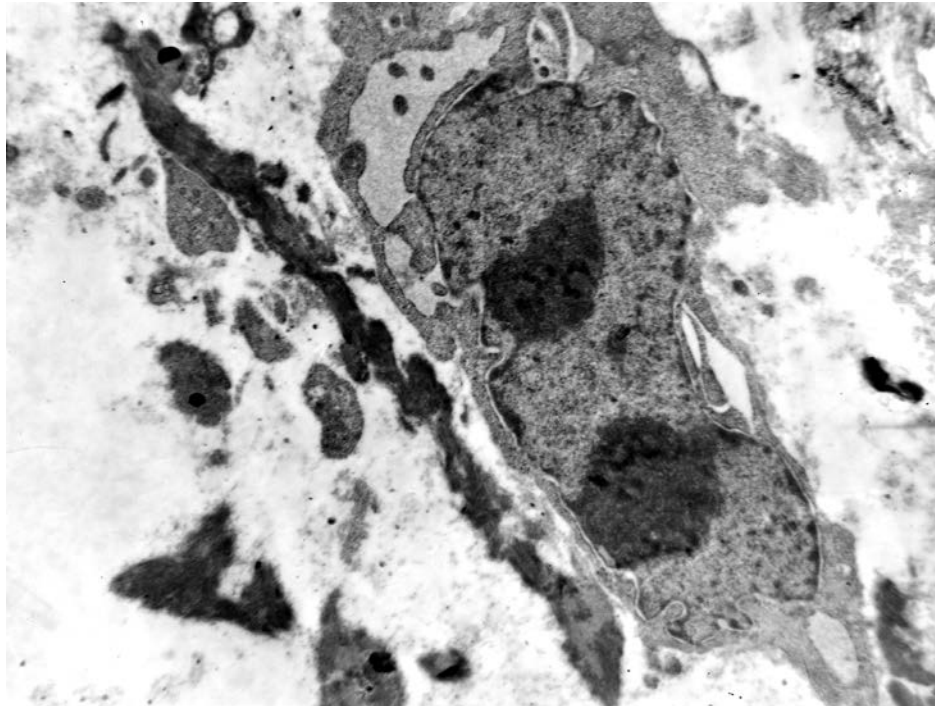


Рис. 4.7. Молодий фібробласт поряд із фібриновим тяжем. Еухромне ядро містить два крупних ядерця. Контроль, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×9700.

Зрілі фібробласти мають велику кількість полісом, розвинуту гранулярну ЕПС, каналця якої місцями розширені, секреторні пухирці містять накопичені продукти біосинтезу (рис. 4.9).

У щурів обох груп на окремих ділянках кісткового дефекту спостерігаються скупчення фібробластів. Ці клітини містять крупне ядро з ядерцями, ЕПС з розширеними каналцями, волокнисті структури в позаклітинному матриксі, що свідчить про інтенсивність біосинтетичних процесів у цих клітинах та їх функціональну активність (рис. 4.10).

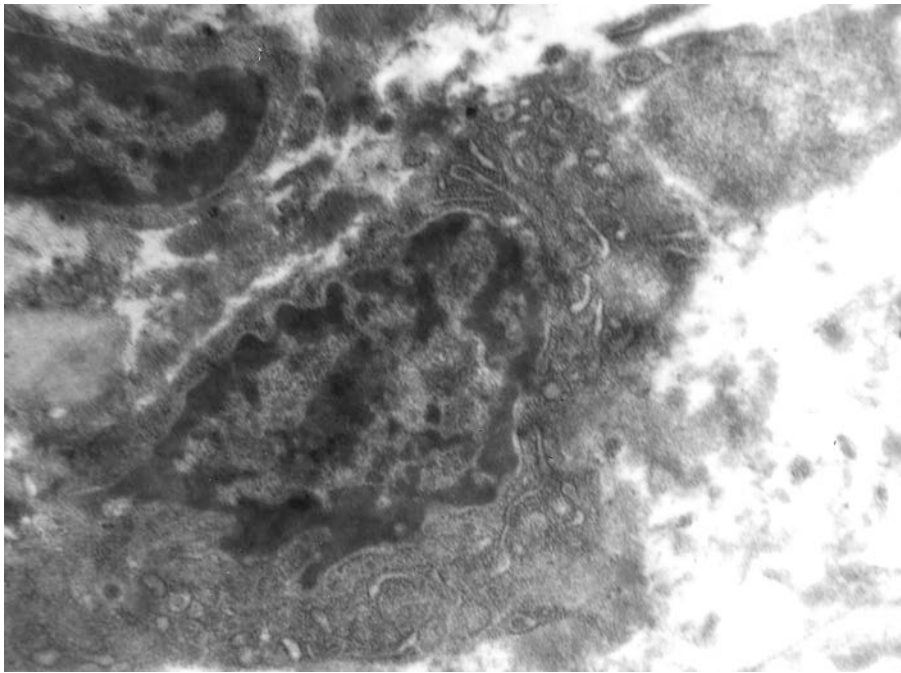


Рис. 4.8. Молодий фібробласт із каналцями гранулярної ЕПС. Дослід, 3 доби після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×20300.

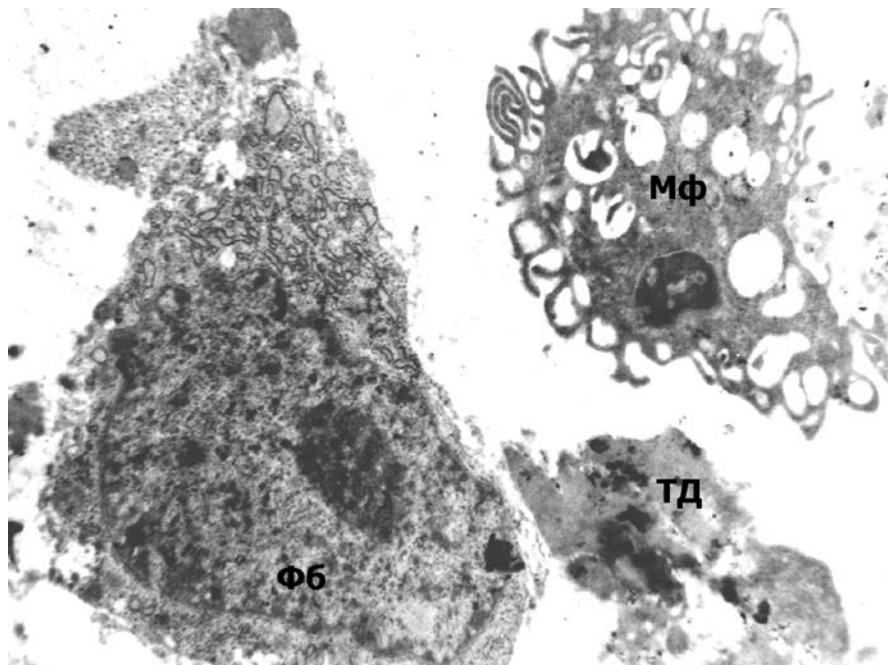


Рис. 4.9. Активний фібробласт (Фб) поряд із макрофагом (Мф) та тканинним детритом (ТД). Контроль, 3 доби після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом: Зб.×10200

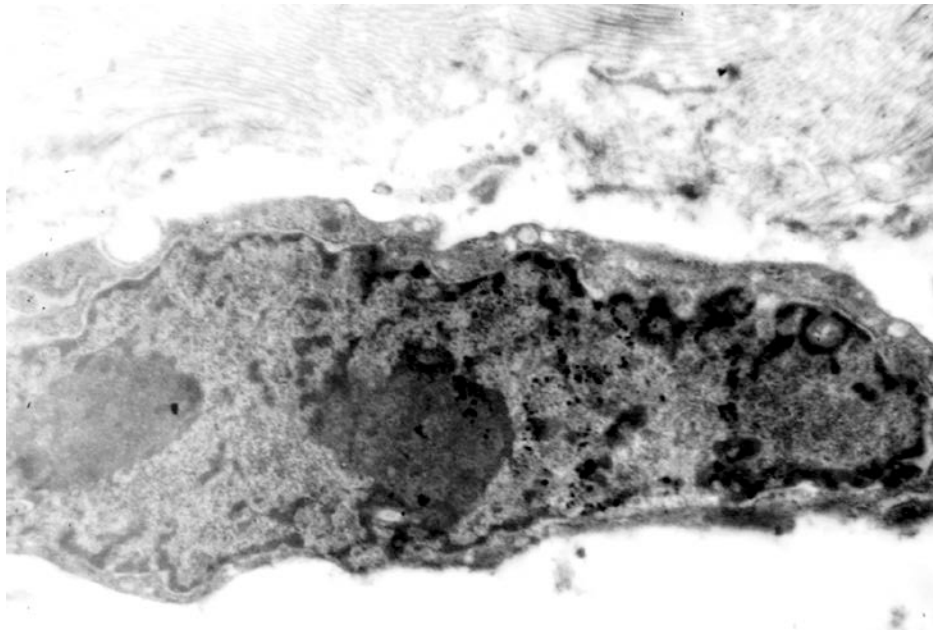


Рис. 4.10. Фібробласт з крупним ядром, яке містить 2 ядерця. Волокнисті структури позаклітинного матриксу біля фібробласта. Дослід, 3 доби після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×6100.

У ділянках, прилеглих до материнської кістки, та біля уламків кістки, що знаходяться у дефекті, спостерігаються остеокласти з 3-5 ядрами (рис. 4.11). У тварин дослідної та контрольної груп вони відрізняються функціональною активністю. У цитоплазмі остеокластів тварин дослідної групи виявляється висока щільність лізосом. Гофрована облямівка пронизує крайові поверхні фрагментів материнської кістки, що призводить до формування осередків резорбції. Також виявляються полінуклеарні макрофаги у вигляді неактивних остеокластоподібних багатоядерних клітин з ядрами, які локалізовані переважно у центрі. Ці клітини можна вважати за молоді остеокласти [54, 73].

У дефекті тварин контрольної групи щільність остеокластів нижча, ніж у щурів дослідної групи. Можливо, дефіцит кальцію в організмі тварин стимулює процеси кісткової резорбції для поповнення пулу кальцію в організмі. Поряд з формуванням остеокластів має місце апоптоз остеокластів, які, певно, виконали функцію резорбції. Таких остеокластів більше в тварин

контрольної групи, ніж у дослідних щурів, і свідчить, що у них активно перебігає «очищення» зони дефекту від кісткових уламків та/або некротизованих поверхонь материнської кістки.

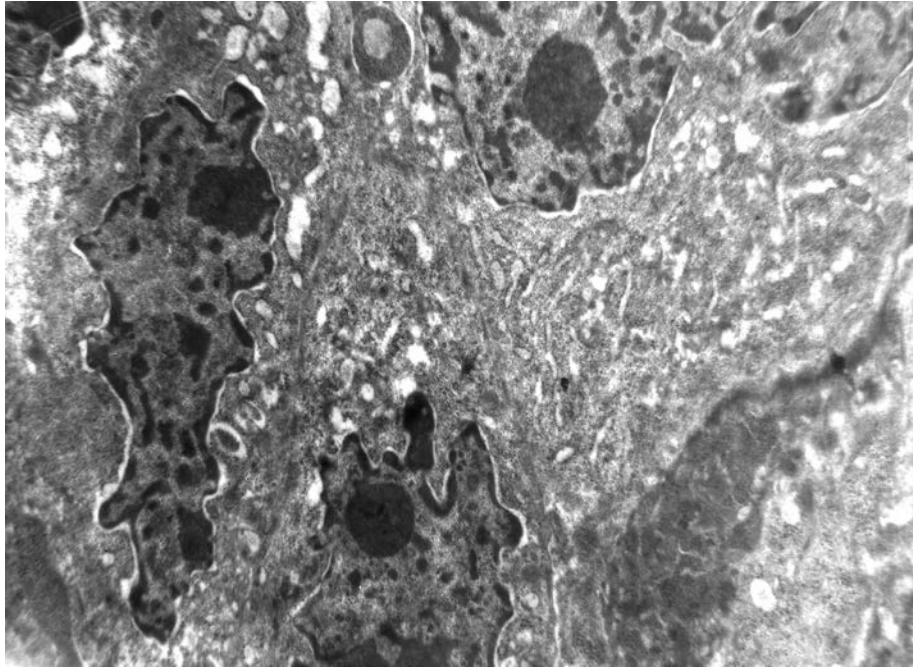


Рис. 4.11. Фрагмент остеокласта з трьома ядрами (Я), які містять ядерце. Дослід, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36.×9800.

Виражені відмінності між дослідом та контролем були встановлені при ультраструктурному аналізі макрофагальної ланки регенерації. У контрольних тварин спостерігається активне функціонування макрофагів, про що свідчить наявність у їх цитоплазмі фагоцитованих еритроцитів (рис. 4.12) та фагосом з електронно-щільним вмістом (рис. 4.13).

Макрофаги розташовуються у вигляді скупчень, мають велику кількість цитоплазматичних відростків (рис. 4.14). Активні макрофаги секретують, окрім факторів та медіаторів, що були названі вище, такі ліпідні медіатори запалення як простагландин ПГЕ₂ та лейкотрієни. На сьогоднішній день експериментальними дослідженнями доведено, що простагландин ПГЕ₂ не тільки стимулює вазодилатацію та підвищення проникливості судин, але й

сприяє остеобластичній диференціації клітин шляхом активації специфічних генів (*cbfa1* та *osterix*) [123]. Цей факт ще раз підтверджує важливість процесів регуляції запальних реакцій при остеорепарації для подальшої диференціації клітин в остеобластичному напрямку, і значення у цій регуляції макрофагів.

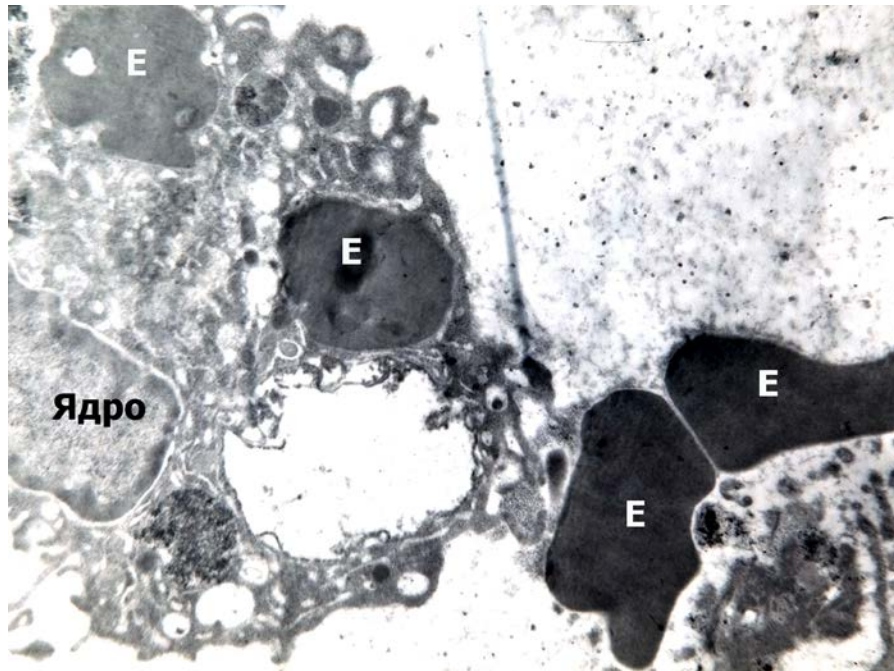


Рис. 4.12. Макрофаг. Фагоцитоз еритроцитів. Контроль, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36×10400 .

В регенераті дослідних тварин виявляється низька щільність макрофагів, будова яких свідчить про меншу активність функціонування, ніж у щурів контрольної групи. Переважали макрофаги з вузьким шаром цитоплазми і помірною кількістю вакуолей у ній (рис. 4.15). Спостерігаються також макрофаги з гетерогенними лізосомами та помірною кількістю мікрровиростів цитоплазми (рис. 4.16).

Звертає на себе увагу наявність у кістковому дефекті щурів дослідної групи поодиноких еозинофілів. Деякі з цих клітин розташовані безпосередньо біля ділянок кісткового детриту, до якого простягаються

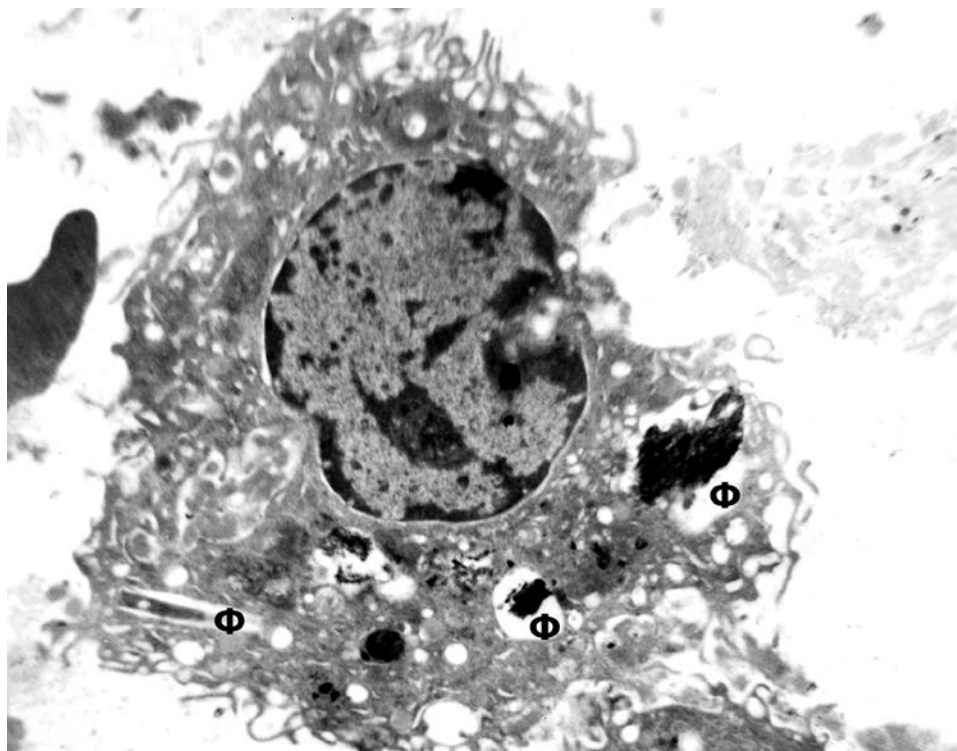


Рис. 4.13. Макрофаг фагоцитуючого типу з фагосомами (Φ), численними вакуолями та мікрровиростами цитоплазми. Контроль, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×5900.

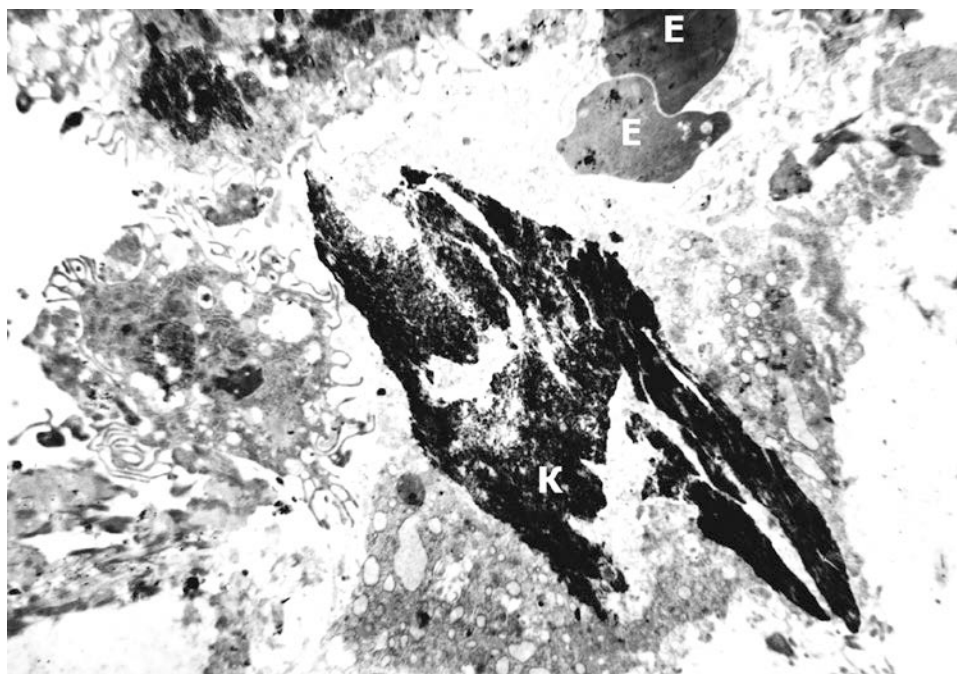


Рис. 4.14. Макрофаги біля кісткового уламка (К) та еритроцитів (Е). Контроль, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×6300.

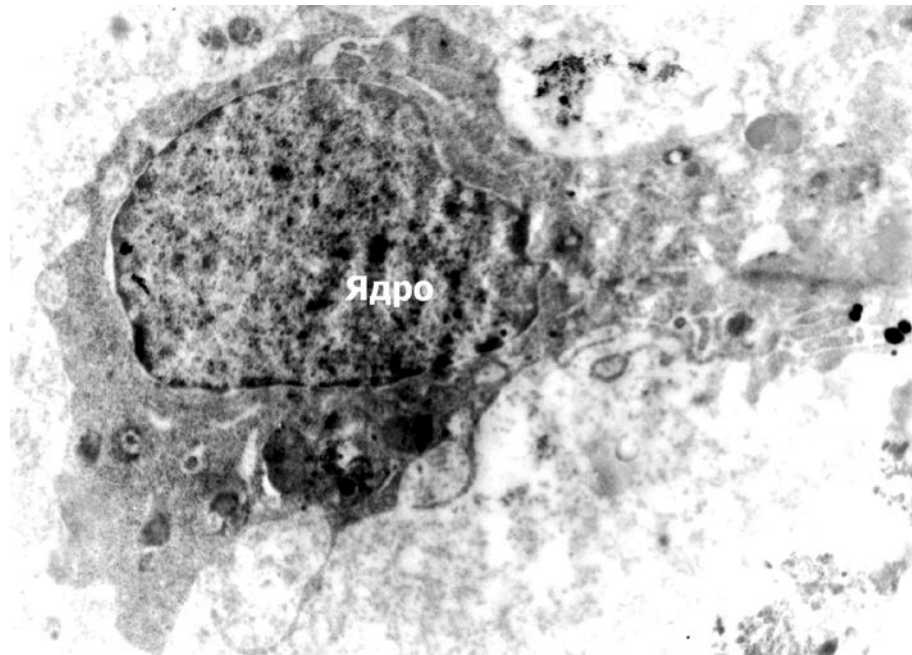


Рис. 4.15. Макрофаг з вузьким шаром цитоплазми та помірною кількістю вакуолей. Дослід, 3 доби після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. 36×9800 .

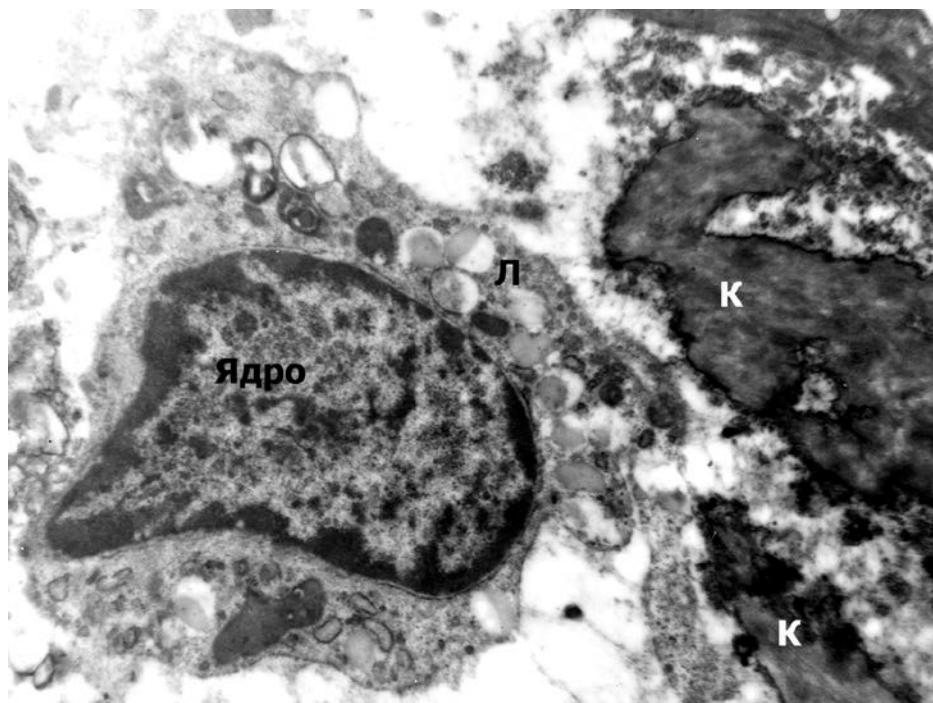


Рис. 4.16. Скупчення гетерогенних лізосом (Л) у цитоплазмі макрофага, розташованого біля кісткових уламків (К). Дослід, 3 доби після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. 36×9200 .

короткі цитоплазматичні відростки цих клітини. Спостерігається скупчення гранул у цій зоні цитоплазми (рис. 4.17). Як відомо, при активації еозинофілів підсилюється синтез рецепторів імуноглобулінів (IgG, IgM, IgE) декількох компонентів комплементу, ліпідних медіаторів запалення (лейкотрієна, фактора активації тромбоцитів). Еозинофіли демонструють хемотаксичну реакцію у відповідь на дію багатьох індукторів, які виробляють тканинні базофіли (гістамін, фактор активації тромбоцитів), лімфоцити (ІЛ-2), макрофаги, ендотелій судин, організми-паразити, а також

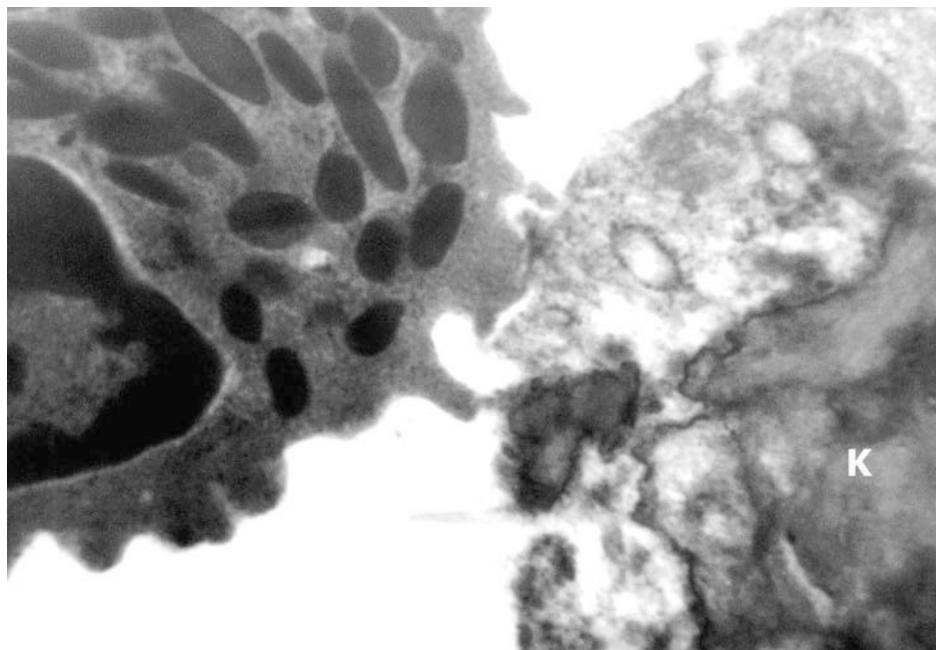


Рис. 4.17. Еозинофільний гранулоцит біля кісткової тканини (К). Дослід, 3 доби після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36.×28000.

ушкоджені тканини. Еозинофіли здатні до фагоцитозу, але їх головна функція – це захоплення та перетравлення імунних комплексів. Особливістю еозинофілів є те, що, вони належать до клітин запалення і водночас виконують функцію фактора, який припиняє запальний процес, протидіючи розповсюдженню набряку та локалізуючи запальну реакцію. Вони здійснюють секрецію антимедіаторних ферментів, які нейтралізують

медіатори запалення, а саме: гістаміназа руйнує гістамін, простагландиндегідрогеназа – простагландин, арилсульфатаза – лейкотрієн, карбоксилпептидаза – кініни та ін. [19]. При репаративному остеогенезі в умовах асептичного запалення роль антигенів виконують кісткові уламки та некротизовані ділянки кісткової тканини, в яких відбувається зміна антигенних властивостей та які підлягають аутолізу, подібно пухлинним клітинам [17].

У дослідженнях В.И.Шевцова та Ю.М.Ирьянова [95] виявлена присутність у зоні кісткового дефекту імунних комплексів, зв'язаних з кристалами кальцію, що може бути поясненням участі еозинофілів у запальних процесах при репаративному остеогенезі. Крім цього, враховуючи те, що еозинофіли, як і макрофаги, синтезують колагеназу та беруть участь у колагенолізі, можна також припустити, що еозинофіли беруть участь у ферментативному руйнуванні тканинного детриту зони кісткового ушкодження. Так, в умовах аліментарного дефіциту кальцію у щурів у зоні дефекту спостерігається при зниженні активності макрофагів активне функціонування не тільки нейтрофілів, але й еозинофілів як джерел ферментів катаболізму.

Морфометричний аналіз клітинного складу у зоні кісткового дефекту через 3 доби після травматичного ушкодження визначив у тварин з аліментарним дефіцитом кальцію достовірну більшу кількість нейтрофілів (в 2,9 раза), МДСК (в 2,8 раза), та меншу кількість макрофагів (в 1,9 раза), тканинних базофілів (в 2,1 раза), фібробластів (в 6,1 раза) порівняно з відповідними показниками у контрольних щурів (табл. 4.2).

Динаміку кількісних змін клітинного складу у зоні кісткового дефекту між першою та третьою добою після операції можна проаналізувати з гістограм, які представлені на рис. 4.18 та 4.19. Так, у щурів контрольної групи через 3 доби достовірно знижується кількість нейтрофілів та лімфоцитів відповідно у 1,9 та 1,3 раза. В регенераті зростає щільність фібробластів та зменшується МДСК в 3 рази (див. рис. 4.18). Наведені дані

свідчать про перехід репаративного процесу від запальної стадії до проліферативної.

Таблиця 4.2

Клітинний склад у дефекті метафіза стегнової кістки щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 3 доби після операції (M±m, %)

Типи клітин	Групи експерименту		P
	контроль (n=5)	дослід (n=5)	
Нейтрофільні гранулоцити	16,7±1,1	48,1±7,2	<0,001
Лімфоцити	18,4±0,5	15,7±3,5	>0,05
Макрофаги	20,7±2,4	10,8±0,9	<0,001
Плазмоцити	8,6±0,8	7,0±1,4	>0,05
Тканинні базофіли	6,2±1,2	2,9±0,6	<0,05
Фібробласти	25,4±2,1	4,2±0,5	<0,001
МДСК	4,0±0,6	11,3±1,6	<0,001

У регенераті дослідних тварин, яких утримували на низькокальцієвій дієті, через 3 доби після операції залишається високим відсоток нейтрофілів, лімфоцитів, тоді як кількість макрофагів менша в 1,5 раза та є в 1,9 раза меншою за аналогічний показник у контролі. Спостерігається низька щільність фібробластів та МДСК (див. рис. 4.19). Наведені дані свідчать, у зоні травматичного ушкодження кістки виявляються ознаки фази запалення зі слабо вираженою проліферацією клітин.

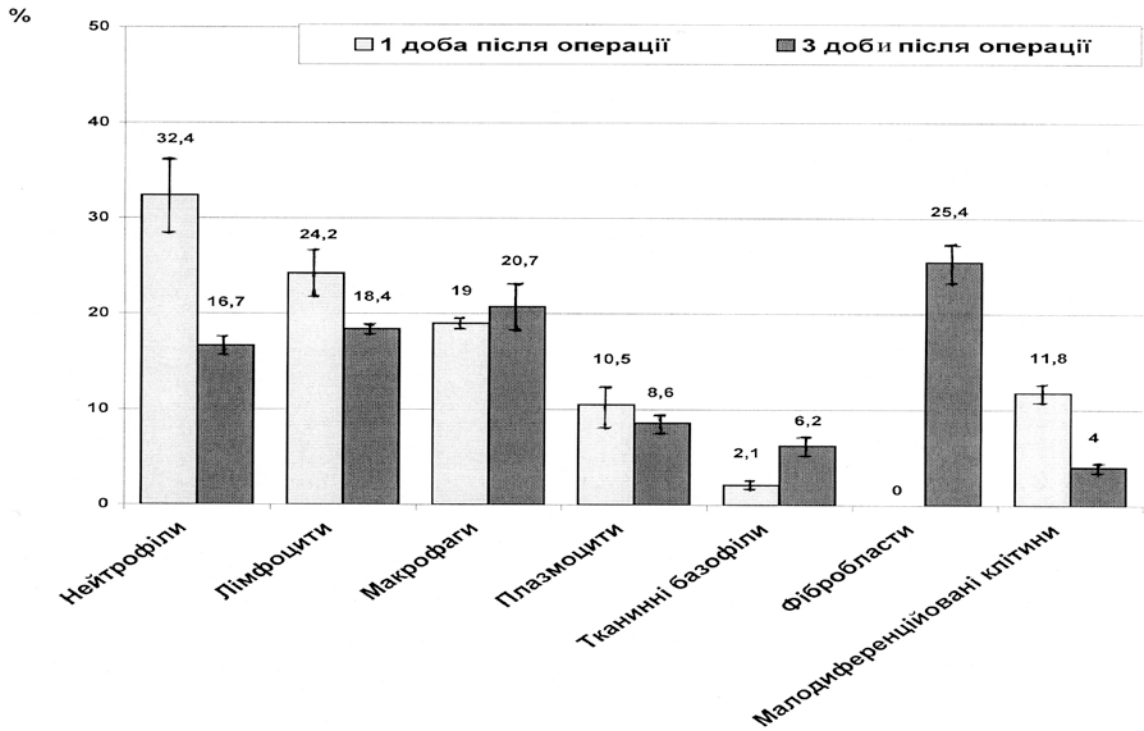


Рис. 4.18. Гістограма клітинного складу в кістковому регенераті щурів контрольної групи (стандартна дієта) через 1 та 3 доби після операції.

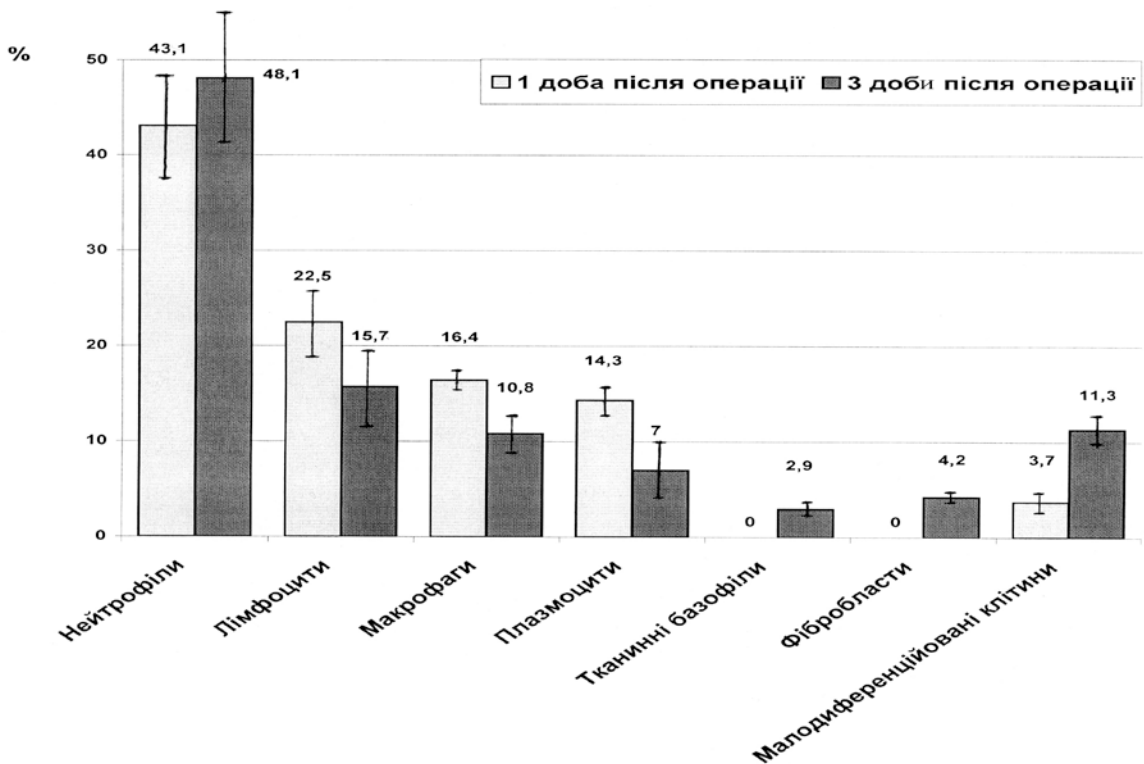


Рис. 4.19. Гістограма клітинного складу в кістковому регенераті щурів дослідної групи (низькокальцієва дієта) через 1 та 3 доби після операції.

4 доби після травматичного ушкодження. Макроскопічно зона дефекту чітко визначається у вигляді впадин з обох боків дистального метафізу стегнової кістки. По зовнішній поверхні ці впадини вкриті шаром сполучної тканини.

При гістологічному аналізі у дослідних щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, у зоні дефекту переважає грануляційна тканина з низькою щільністю клітин та залишки гематоми (рис. 4.20), тоді як у тварин контрольної групи більшу територію дефекту займає фіброретикулярна тканина.

У тварин обох груп на цей термін та на подальших термінах дослідження виявляються ознаки реактивної перебудови періосту, прилеглого до зони дефекту, та формування періостального регенерату. Періост потовщений та представлений колагеноволоконистою тканиною з високою щільністю фібробластів.

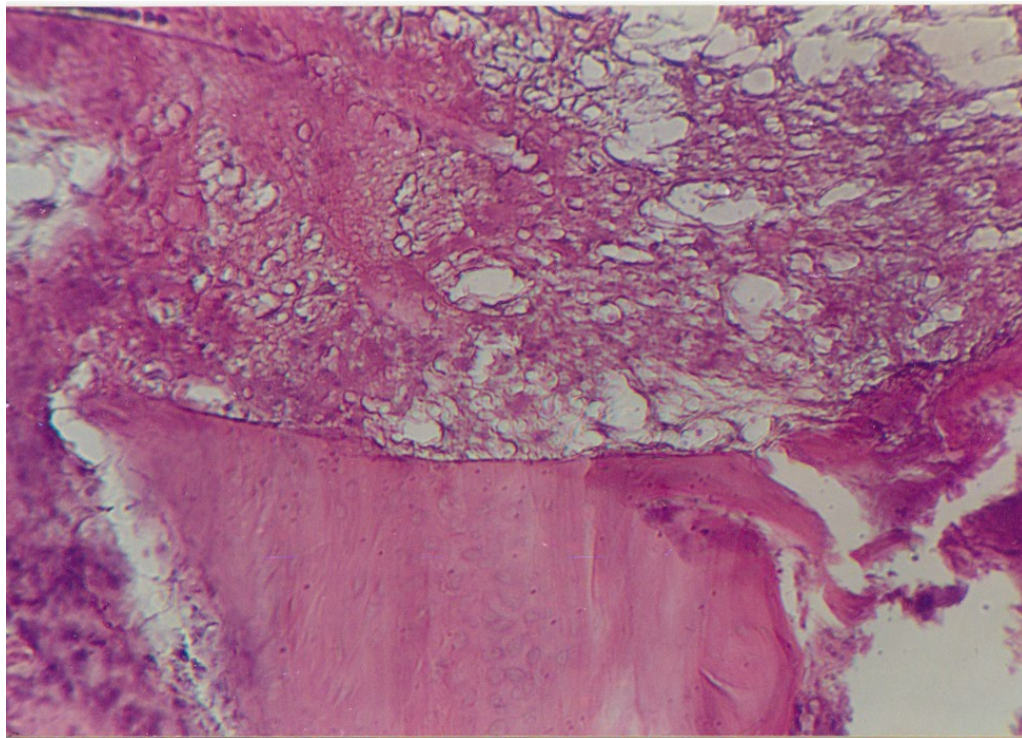


Рис. 4.20. Ділянки грануляційної тканин у крайовому відділі дефекту. Дослід, 4 доби після операції. Забарвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

5 днів після травматичного ушкодження. Макроскопічно відмічається розростання колагеноволоконистої тканини над зоною дефекту та на відстані від неї.

У щурів контрольної групи в регенераті переважає фіброретикулярна тканина з високою щільністю клітин фібробластичного диферону, а також виявляються ділянки формування остеоїду. Зона дефекту у дослідних щурів у крайових ділянках виповнена грануляційною тканиною, а в центральних ділянках - фіброретикулярною тканиною, якою оточені залишки гематоми (скупчення фібринових мас) та кісткові уламки (рис. 4.21).

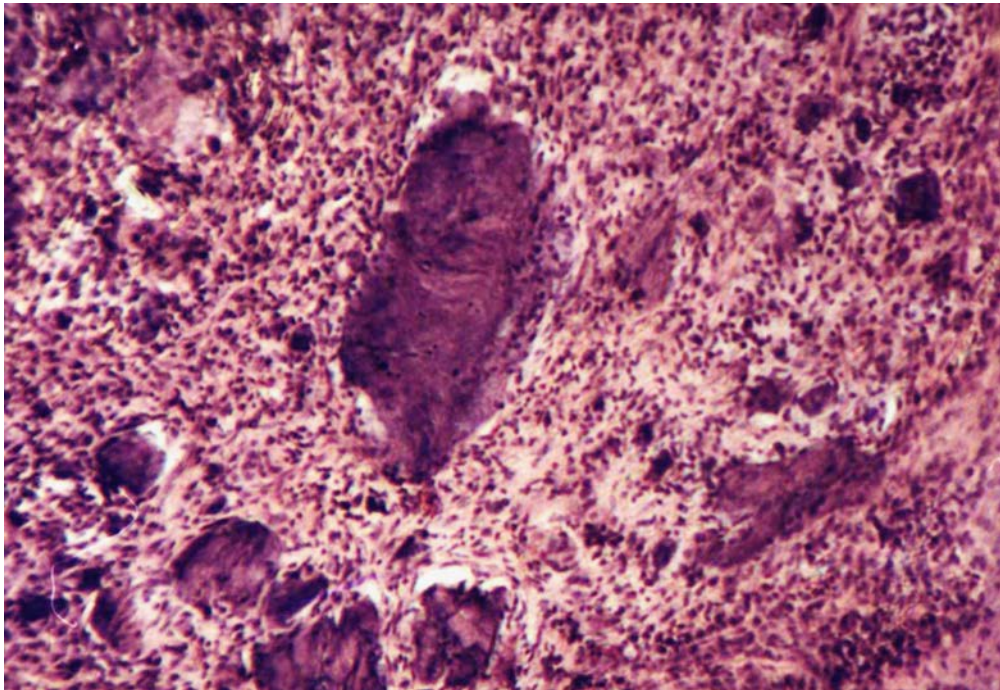


Рис. 4.21. Фрагменти тканинного детриту та кісткові уламки у фіброретикулярній тканині. Дослід, 5 днів після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

При морфометричному дослідженні площі тканин, сформованих у зоні кісткового дефекту через 5 днів після операції, визначено, що у щурів контрольної групи переважає фіброретикулярна тканина (40,8%). У щурів з аліментарним дефіцитом кальцію переважає грануляційна тканина (47,8%), а площі фіброретикулярної тканини та новоутвореної кісткової тканини менші відповідно в 1,43 та 2,88 рази, ніж у тварин контрольної групи (табл. 4.3).

**Площі тканин регенерату у метафізарному дефекті стегнової кістки
щурів з аліментарним дефіцитом кальцію на різні терміни
остеорепації (M±m, %)**

Групи експерименту	Типи тканин	Терміни дослідження				
		5 доба (n=5)	7 доба (n=5)	14 доба (n=5)	21 доба (n=5)	28 доба (n=5)
Контроль	грануляційна тканина	29,6±2,0	18,7±2,3 P ₂ <0,001	12,9±4,1	2,4±0,5 P ₂ <0,05	–
	фіброретикулярна тканина	40,8±2,6	52,4±3,1 P ₂ <0,01	39,6±2,7 P ₂ <0,01	27,8±3,0 P ₂ <0,01	15,7±1,2 P ₂ <0,001
	грубоволокниста кісткова тканина та остеоїд	18,4±3,7	23,8±2,8	36,7±1,4 P ₂ <0,001	38,0±2,1	27,4±1,6 P ₂ <0,001
	пластинчаста кісткова тканина	–	–	2,8±0,5	13,1±2,4 P ₂ <0,001	22,7±2,1 P ₂ <0,01
	уламки материнської кістки та детрит	11,2±2,3	5,1±1,4 P ₂ <0,05	3,8±0,4	–	–
	кістковий мозок	–	–	4,2±1,1	18,7±3,7 P ₂ <0,001	34,2±2,5 P ₂ <0,001
Дослід	грануляційна тканина	47,8±3,5 P ₁ <0,001	42,3±1,4 P ₁ <0,001	29,3±0,9 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001	3,2±0,7 P ₂ <0,001	–
	фіброретикулярна тканина	28,5±2,9 P ₁ <0,01	33,9±1,2 P ₁ <0,001	44,2±2,5 P ₂ <0,001	43,0±2,2 P ₁ <0,001	29,2±1,4 P ₁ <0,001 P ₂ <0,001
	грубоволокниста кісткова тканина та остеоїд	6,4±1,9 P ₁ <0,01	8,4±2,3 P ₁ <0,001	18,5±3,6 P ₁ <0,001 P ₂ <0,05	29,2±1,7 P ₁ <0,01 P ₂ <0,01	37,5±3,3 P ₁ <0,01 P ₂ <0,05
	пластинчаста кісткова тканина	–	–	–	7,5±2,8 P ₁ <0,05	12,0±4,2 P ₁ <0,05
	уламки материнської кістки та детрит	17,3±2,5	15,4±3,5 P ₁ <0,01	8,0±2,4	2,8±0,7 P ₂ <0,05	–
	кістковий мозок	–	–	–	14,3±2,9	21,3±3,1 P ₁ <0,01

Примітки:

1. P₁ – порівняно з контрольною групою;
2. P₂ – порівняно з попереднім терміном дослідження.

6 дів після травматичного ушкодження. Макроскопічно визначається потовщення метафіза навколо зони дефекту, який вкритий сполучною тканиною.

Відмінностей у морфологічній картині дефекту щурів від описаної на 5 добу відповідно для контрольної та дослідної груп не знайдено. В дефекті дослідних тварин спостерігається значна територія фіброретикулярної тканини (рис. 4.22).

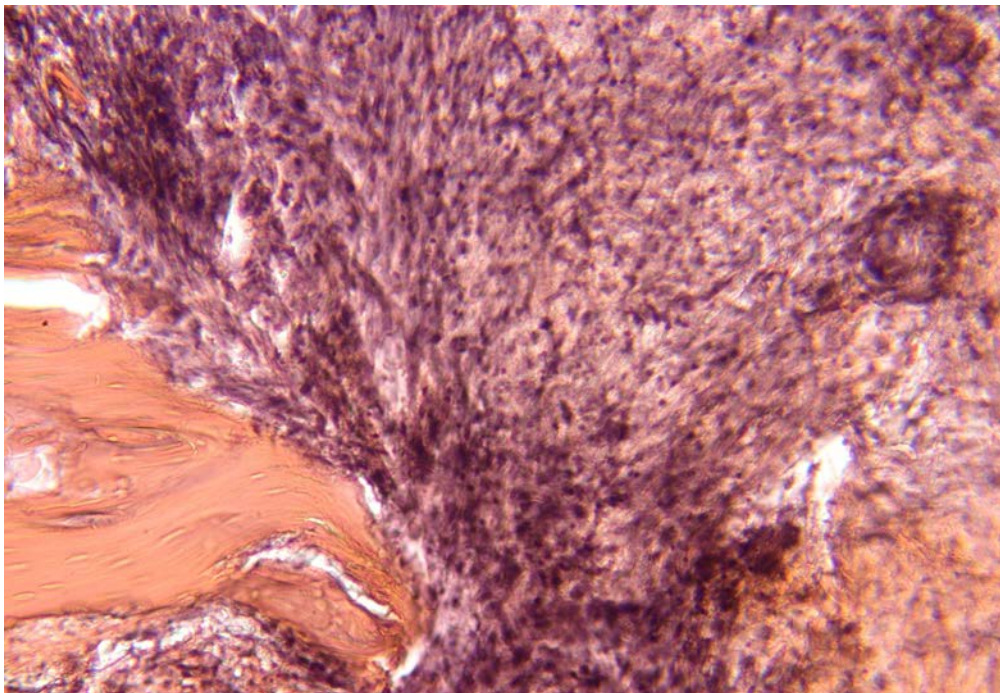


Рис. 4.22. Фіброретикулярна тканина у крайовій ділянці дефекту. Дослід, 6 дів після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

При електронномікроскопічному дослідженні вмісту кісткових дефектів дослідних тварин визначаються капіляри, біля яких розташовані макрофаги з великою кількістю вторинних лізосом (рис. 4.23 а), зрілі фібробласти з еухромним ядром і розширеними каналцями ЕПС (рис. 4.23 б), волокнисті структури у міжклітинному матриксі (рис. 4.24), що свідчить про активний функціональний стан цих клітин. У клітинному складі

грануляційної тканини також виявляються нейтрофіли (рис. 4.25), еритроцити, МДСК (рис. 4.26), поодинокі остеобласти (рис. 4.27).

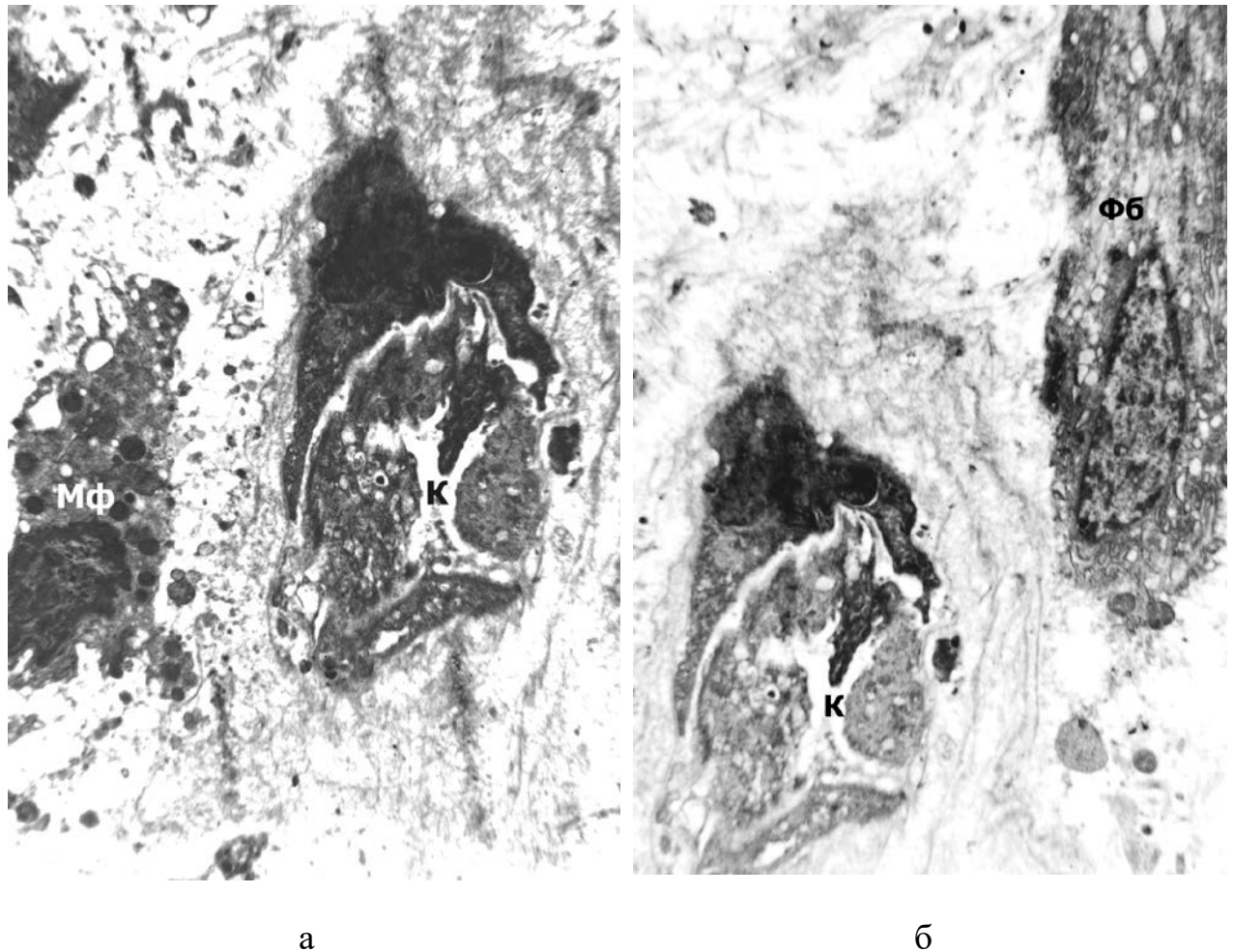


Рис. 4.23. Макрофаг (Мф) та фібробласт (Фб) біля капіляра (К). Ділянка грануляційної тканини у зоні кісткового дефекту. Дослід, 6 діб після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом: а) зб.×6700; б) зб.×6800.

У кістковому дефекті дослідних щурів зустрічаються також зрілі фібробласти подовженої форми, біля яких виявляються як неупорядковано орієнтовані колагенові волокна, так і колагенові волокна, що формують щільно розташовані паралельні тяжі (рис. 4.28). Відмічені ділянки скупчення остеобластів, у цитоплазмі яких присутня велика кількість пухирців значних розмірів, що утворились в результаті накопичення продуктів синтезу у цистернах ЕПС (рис. 4.29). Ці ультраструктурні особливості остеобластів

кісткового регенерату щурів з аліментарним дефіцитом кальцію свідчать про затримку процесів екзоцитозу продуктів синтезу у цих клітинах.

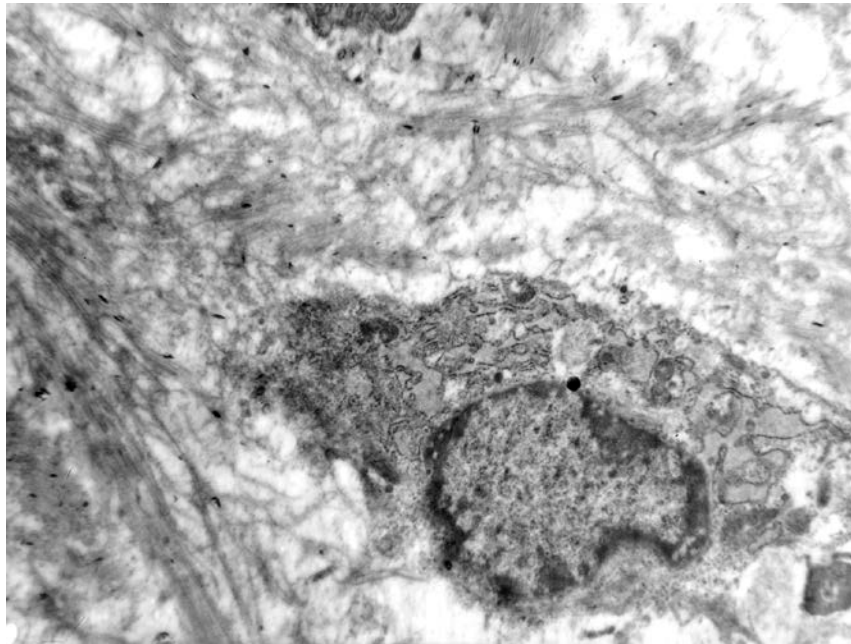


Рис. 4.24. Фібробласт, біля якого позаклітинний матрикс містить волокнисті структури. Дослід, 6 дів після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×10100.

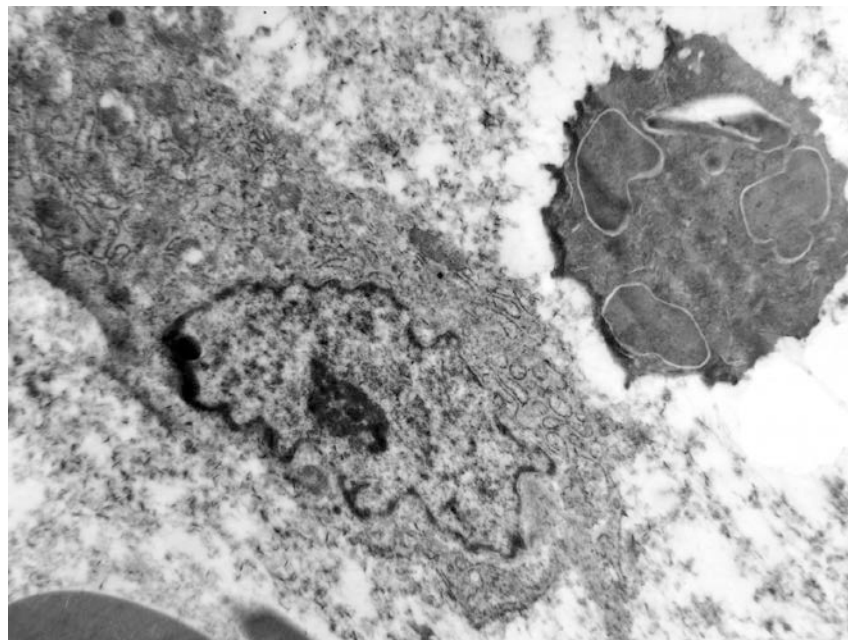


Рис. 4.25. Зрілий фібробласт та нейтрофіл з фагосоною, які знаходяться у грануляційній тканині. Дослід, 6 дів після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×10100.

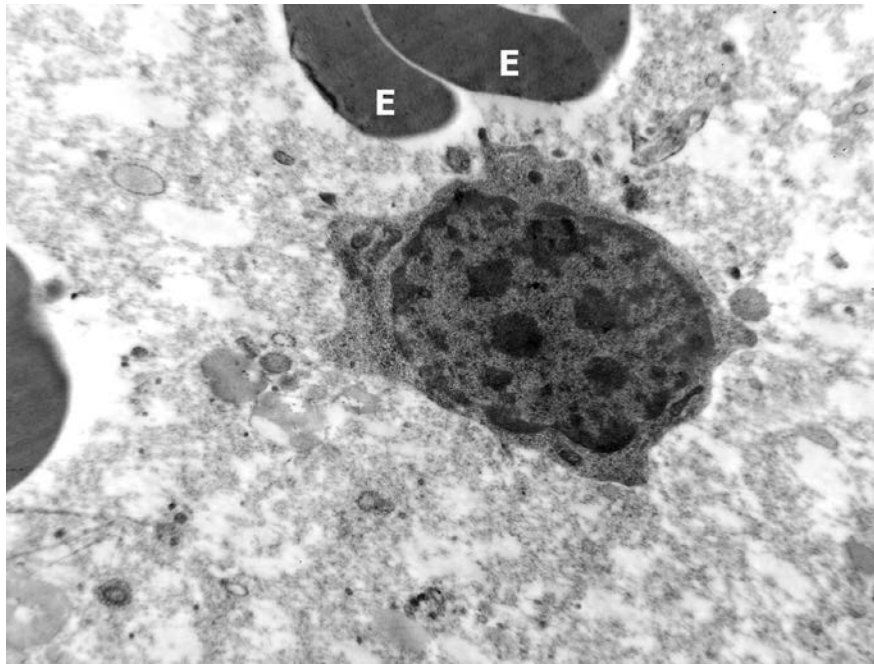


Рис. 4.26. Малодиференційована сполучнотканинна клітина та еритроцити (E) у грануляційній тканині. Дослід, 6 діб після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×10300.

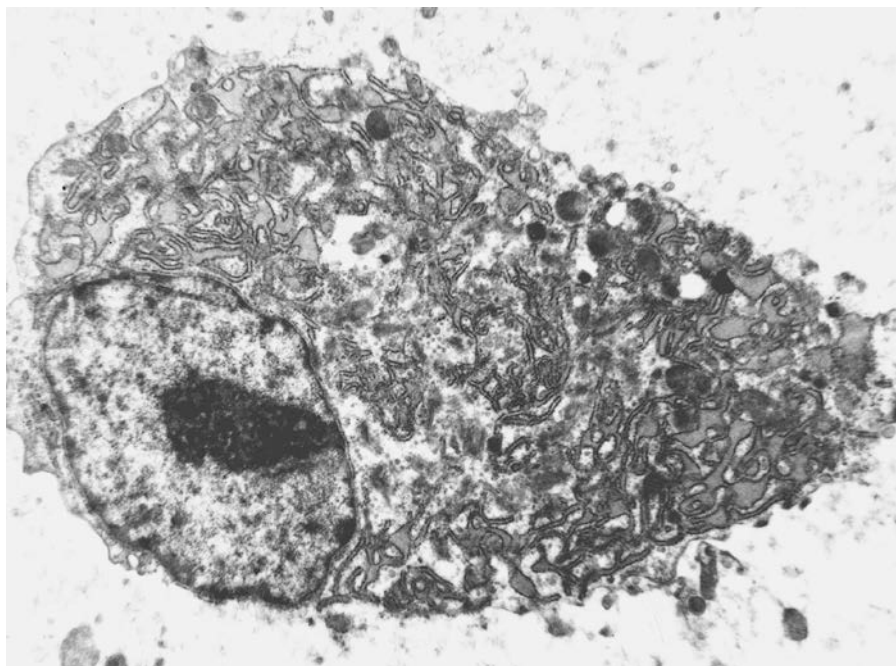


Рис. 4.27. Остеобласт у грануляційній тканині. Ексцентрично розташоване еухромне ядро з крупним ядерцем, розвинута гранулярна ЕПС у цитоплазмі. Дослід, 6 діб після операції. TEM, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×10400.

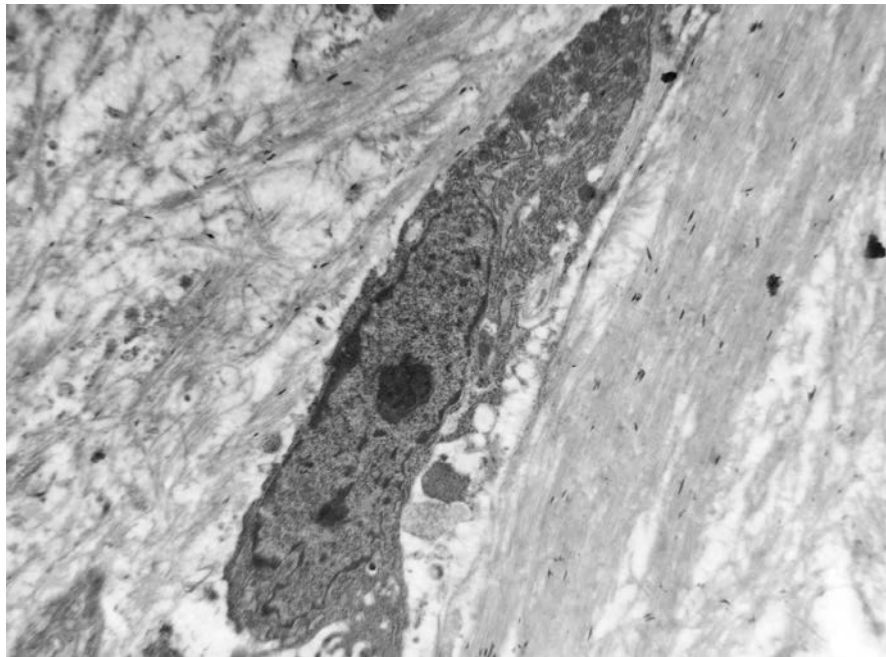


Рис. 4.28. Фібробласт серед колагенових волокон різного ступеню упорядкованості. Дослід, 6 діб після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. 36×6900 .

7 діб після травматичного ушкодження. У щурів контрольної групи регенерат кісткового дефекту представлений переважно фіброретикулярною тканиною, ділянками новоутворених остеоїду та грубоволокнистих трабекул, які зосереджені по краю дефекту (рис. 4.30). За морфометричною оцінкою площа фіброретикулярної тканини перевищує площу новоутвореної кісткової тканини в 2,2 раза (табл. 4.3). Також виявляються невеликі ділянки грануляційної тканини.

Зона дефекту дослідних тварин виповнена переважно фіброретикулярною тканиною з ділянками остеоїду (рис. 4.31). Відмічаються також ділянки остеоїда та новоутворені грубоволокнисті трабекули, які займають у 2,8 раза меншу площу, ніж у тварин контрольної групи (див. табл. 4.3). При цьому у дефектах дослідних щурів спостерігаються залишки кров'яного згустку, що перебудовується, які при морфометричному дослідженні ми оцінювали за тканинний детрит разом з уламками материнської кістки. Їхня площа була в 3 рази більша, ніж у тварин контрольної групи.

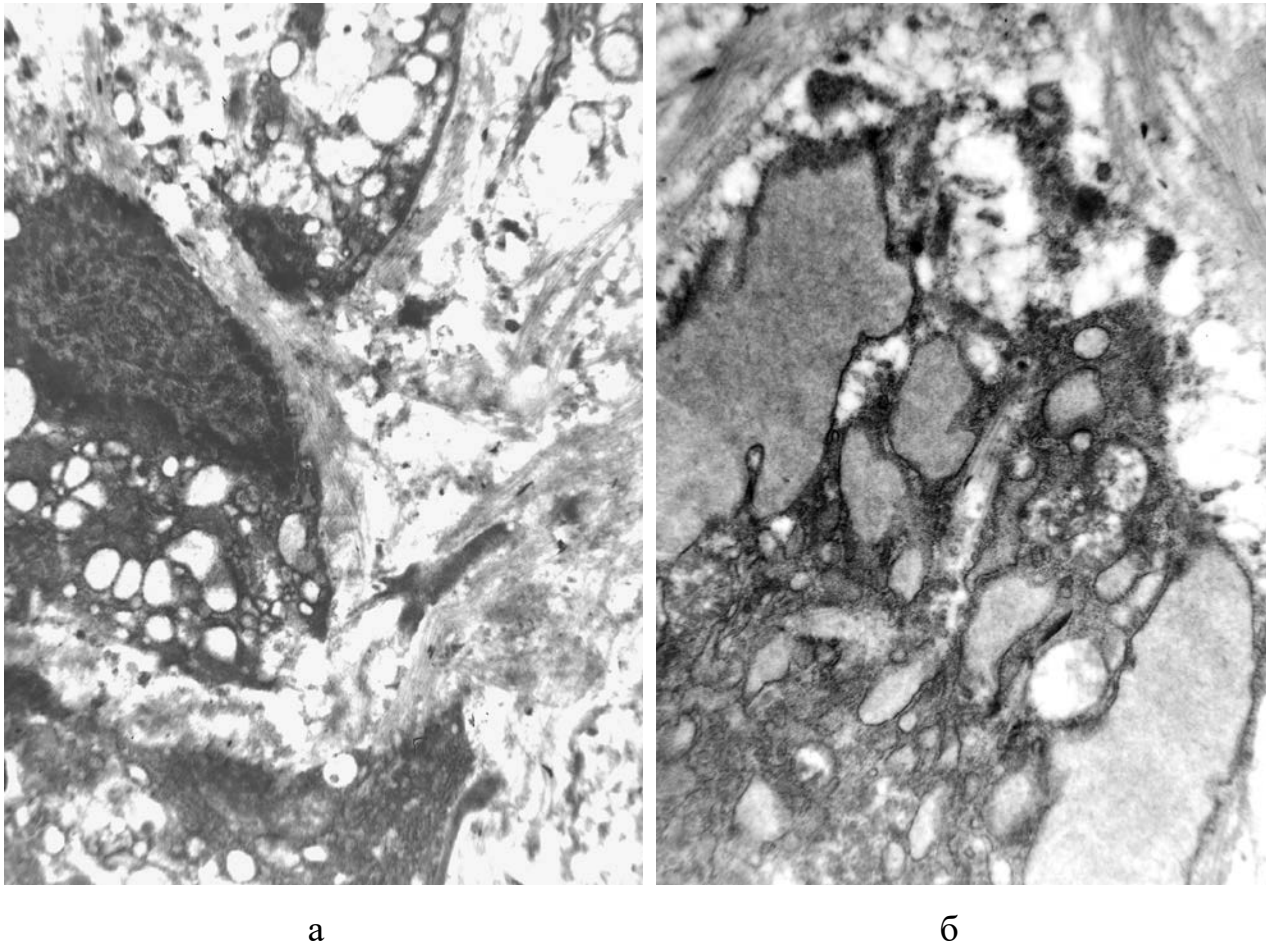


Рис. 4.29. Osteобласти з накопиченими продуктами синтезу у цитоплазмі: а) ділянка скупчення клітин; б) фрагмент цитоплазми остеобласта з розширеними цистернами ЕПС у вигляді пухирців. Дослід, 6 діб після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом: а) зб.×10400; б) зб.13700.

У грануляційній тканині поблизу кровоносних судин виявляються клітини у стані мітотичного поділу та юні фібробласти з крупним ядром та, як правило, двома ядерцями (рис. 4.32), що свідчить про низький рівень клітинного диференціювання.

Морфометричний аналіз визначив, що у метафізарному дефекті щурів дослідної групи площа грануляційної тканини достовірно більша (в 2,3 раза), ніж у контрольних тварин, а фіброретикулярної та новоутвореної кісткової тканин менша відповідно у 1,6 та 2,8 раза.

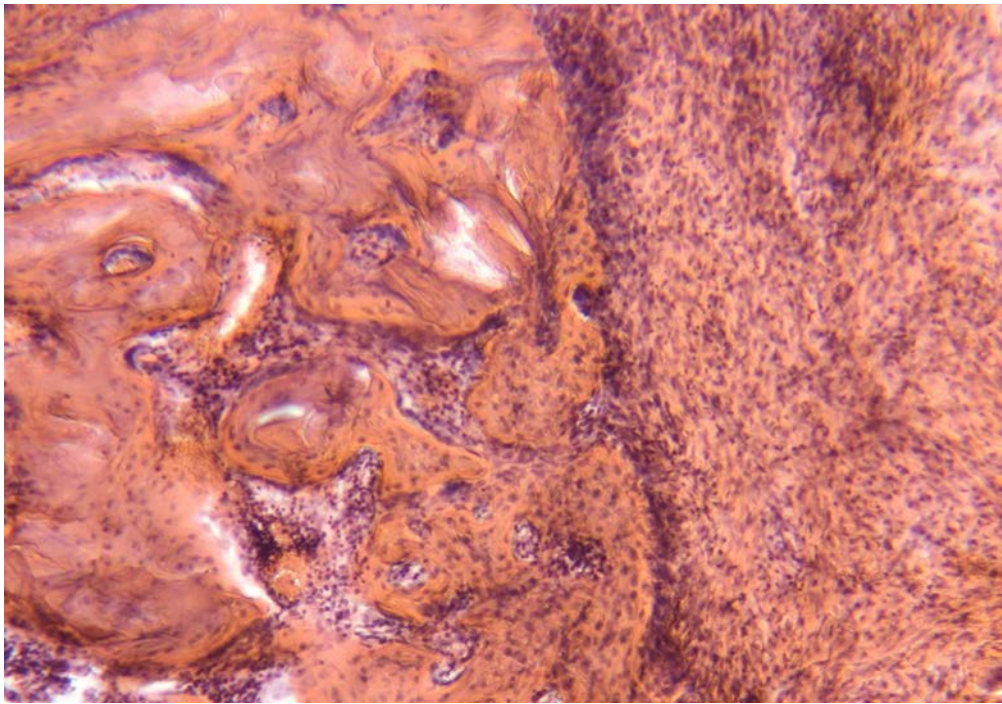


Рис. 4.30. Новоутворені кісткові трабекули на поверхні крайових відділів материнської кістки та фіброретикулярна тканина у центральних ділянках дефекту. Контроль, 7 діб після операції. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

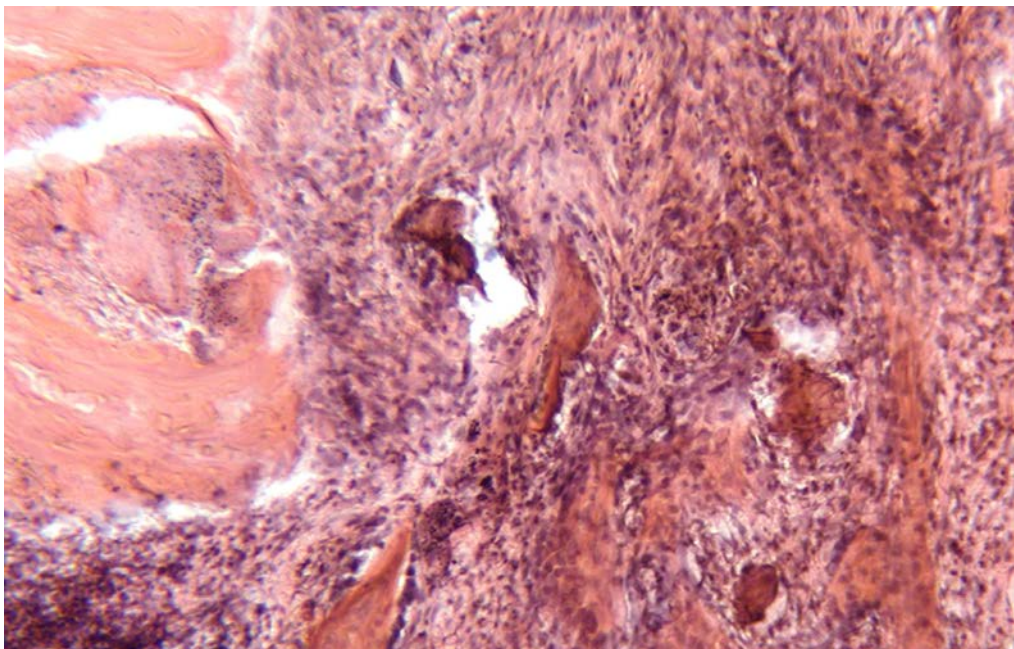


Рис. 4.31. Фіброретикулярна тканина з ділянками остеоїду в кістковому дефекті. Дослід, 7 діб після операції. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

У прилеглих до дефекту материнських кісткових трабекулах щурів обох експериментальних груп виявляються лакуни без остеоцитів. На поверхні материнських трабекул спостерігаються нашарування новоутвореної кісткової тканини. Утворені грубоволокнисті кісткові трабекули також визначаються у міжтрабекулярних просторах серед залишків фіброретикулярної тканини.

Ширина періосту поблизу дефекту збільшена за рахунок гіперплазії волокнистого шару, відмічається проліферація клітин остеогенного шару з формуванням молодих трабекул.

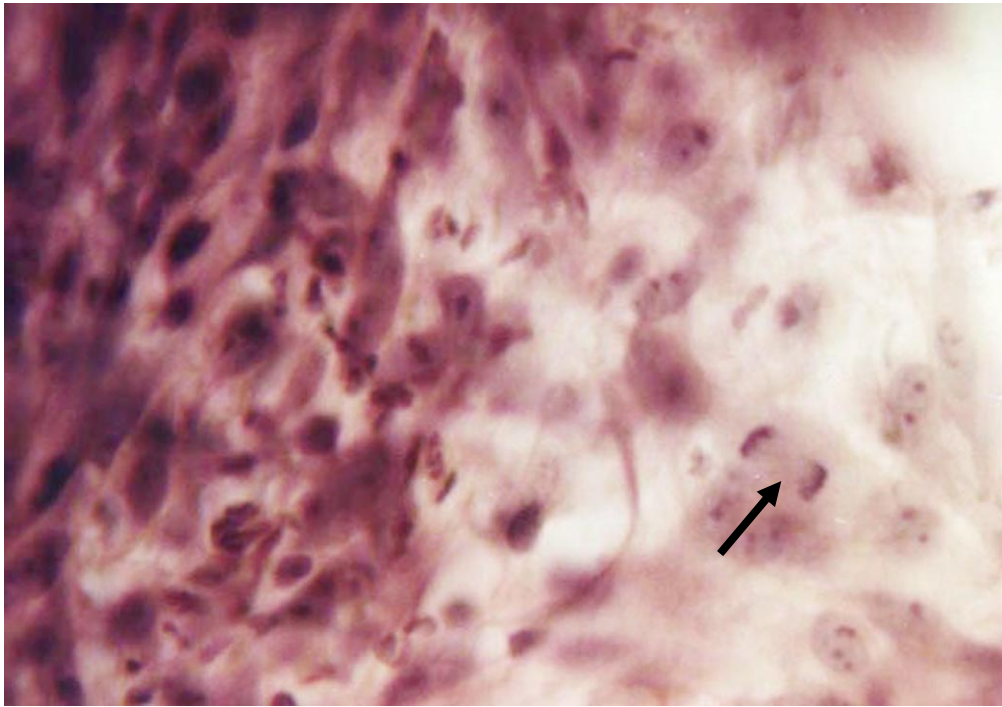


Рис. 4.32. Ділянка фіброретикулярної тканини. Клітина у стані мітотичного поділу (стадія телофази). Дослід, 7 діб після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.50[×].

Таким чином, результати свідчать, що у регенераті щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, спостерігається уповільнення катаболізму продуктів запальних реакцій з відставанням процесів диференціювання та утворенням специфічних тканин, тобто зсув перебігу

стадій процесу остеорепарації у часі. Водночас через 7 діб після операції репаративна регенерація в дефектах дистальних метафізів стегнової кістки щурів обох груп відповідає десмальному типу або первинному зрощенню кістки.

14 діб після травматичного ушкодження. Макроскопічно кістка має потовщення у зоні дефекту, місце дефекту вкрито сполучною тканиною.

У зоні кісткових дефектів контрольних щурів переважає грубоволокниста кісткова тканина у вигляді новоутворених кісткових трабекул, які формують дрібнопетлясту сітку. Молоді трабекули, що утворені на поверхні кортикальної материнської кістки, виявляють з нею щільний контакт, але між ними визначається достатньо чітка межа (рис. 4.33). У регенераті спостерігаються одиничні трабекули, губчаста речовина яких представлена пластинчастою кістковою тканиною. Прилеглі до них міжтрабекулярні простори заповнені ККМ.

За морфометричними даними у зоні дефекту контрольних щурів відносна площа кісткової тканини (остеоїд, грубоволокниста та пластинчаста) збільшилась у 1,7 раза порівняно з попереднім терміном дослідження (див. табл. 4.3). Водночас значно зменшились відносні площі грануляційної та фіброретикулярної тканин (відповідно в 1,45 та 1,32 раза).

На деяких ділянках кортексу зони дефекту визначаються резорбційні лакуни з активними остеокластами (рис. 4.34). Це свідчить, що відбувається резорбція крайових ділянок ушкодженої материнської кістки та «підготовка місця» для утворення молодої кістки.

Періост поблизу дефекту, як і на попередній термін дослідження, розширений за рахунок сформованих молодих кісткових трабекул (періостальний остеогенез) та розростання структур волокнистого шару.

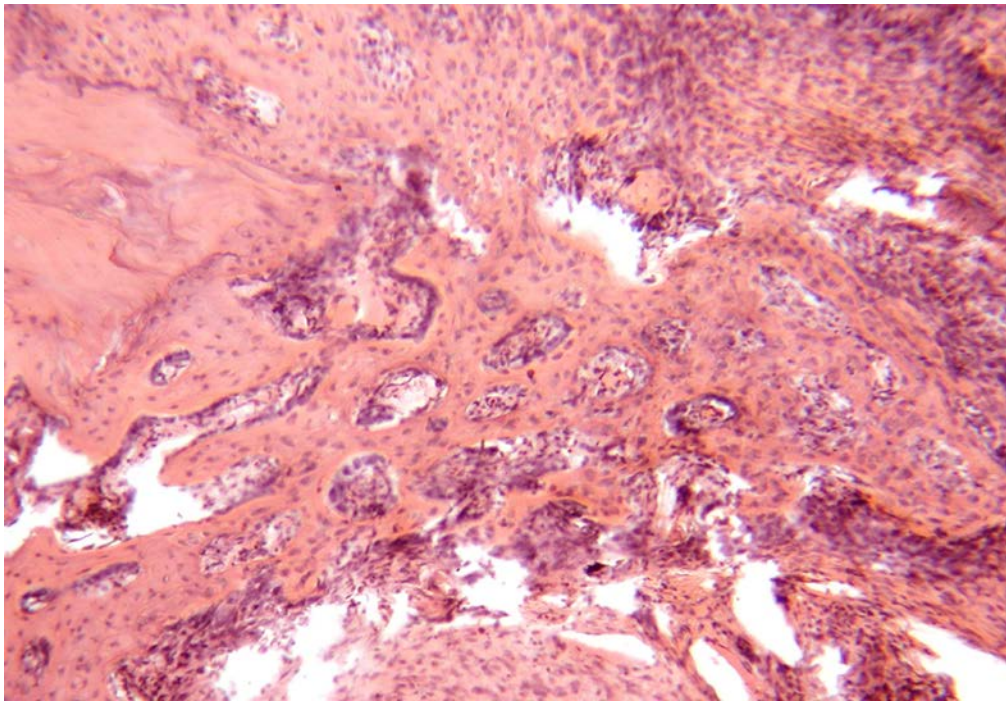


Рис. 4.33. Дрібнопетляста новоутворена кісткова тканина біля материнської кортикальної кістки. Контроль, 14 діб після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

У щурів з аліментарним дефіцитом кальцію в метафізарному дефекті виявляється тканинний склад регенерату аналогічний контрольним тваринам, але площа грануляційної тканини була в 2,27 раза більшою, а кісткової тканини - в 2,14 раза меншою, ніж у контролі (див. табл. 4.3). Значна територія дефекту зайнята фіброретикулярною тканиною. Отже, морфометричний аналіз площі тканин у зоні кісткового дефекту дослідних щурів свідчить про уповільнення як перебудови тканин регенерату, так і процесу кісткоутворення, порівняно з контрольними тваринами.

Прилегли до дефекту ділянки кортикальної материнської кістки щурів, яких утримували на низькокальцієвій дієті, мають мікротріщини, ділянки остеолізу, лакуни без остеоцитів, а у кістковому мозку виявляється багато розширених кровоносних судин (рис. 4.35).

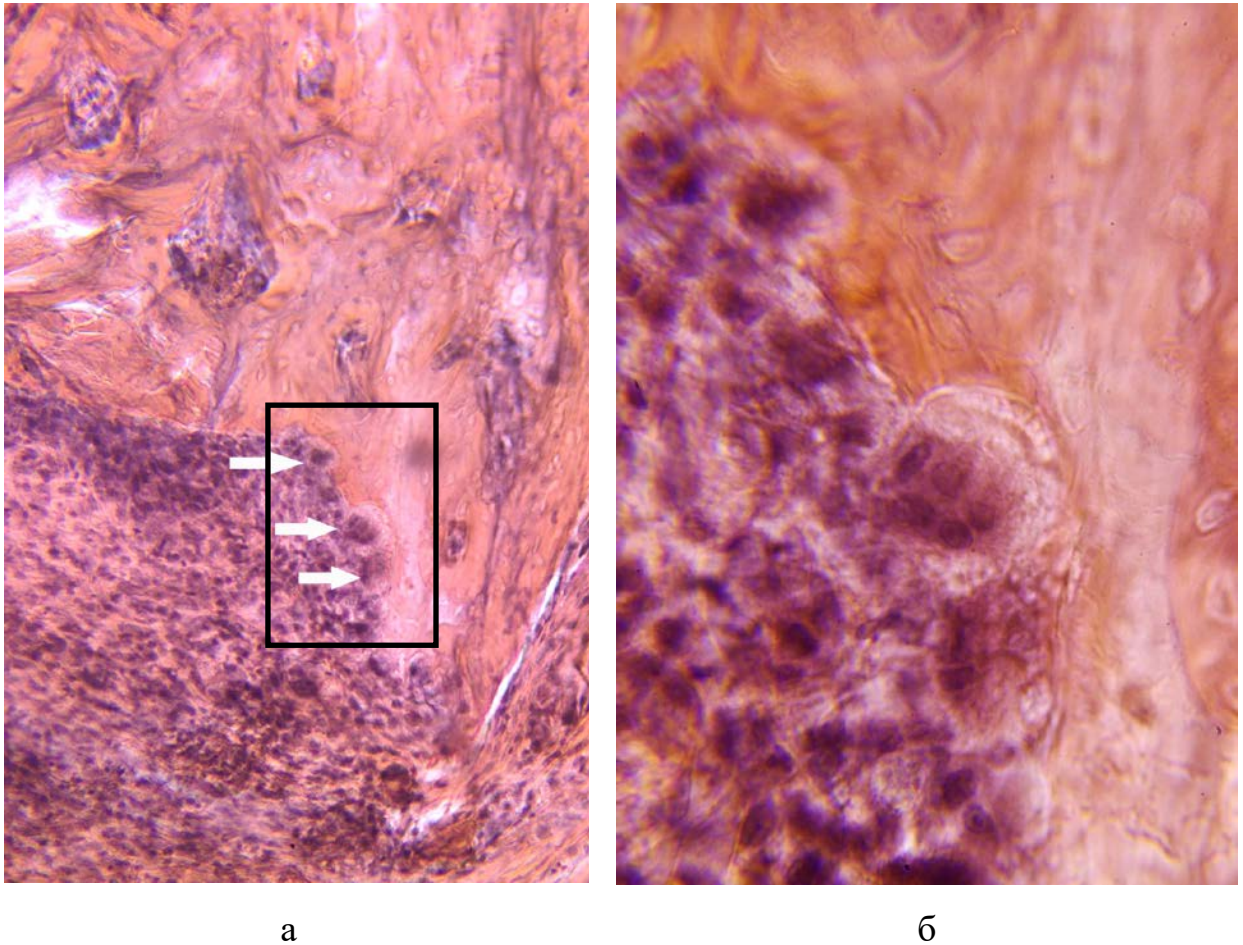


Рис. 4.34. Активні остеокласти (стрілка) на поверхні ушкодженої кортикальної кістки. Дослід, 14 діб після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а) ок.10[×], об.12,5[×]; б) ок.10[×], об.50[×].

Таким чином, результати аналізу репаративної регенерації дефекту в дистальному метафізі стегнової кістки щурів свідчать, що через 14 діб після операції у тварин з аліментарним дефіцитом кальцію у зоні ушкодження спостерігається уповільнення темпів реорганізації тканин регенерату та затягування у часі цього процесу. Морфологічно це проявляється достовірною різницею співвідношення тканин у складі регенерату дослідних тварин порівняно з контрольними щурами, а саме: у дослідних тварин більша площа грануляційної тканини та менша площа новоутвореної кісткової тканини.

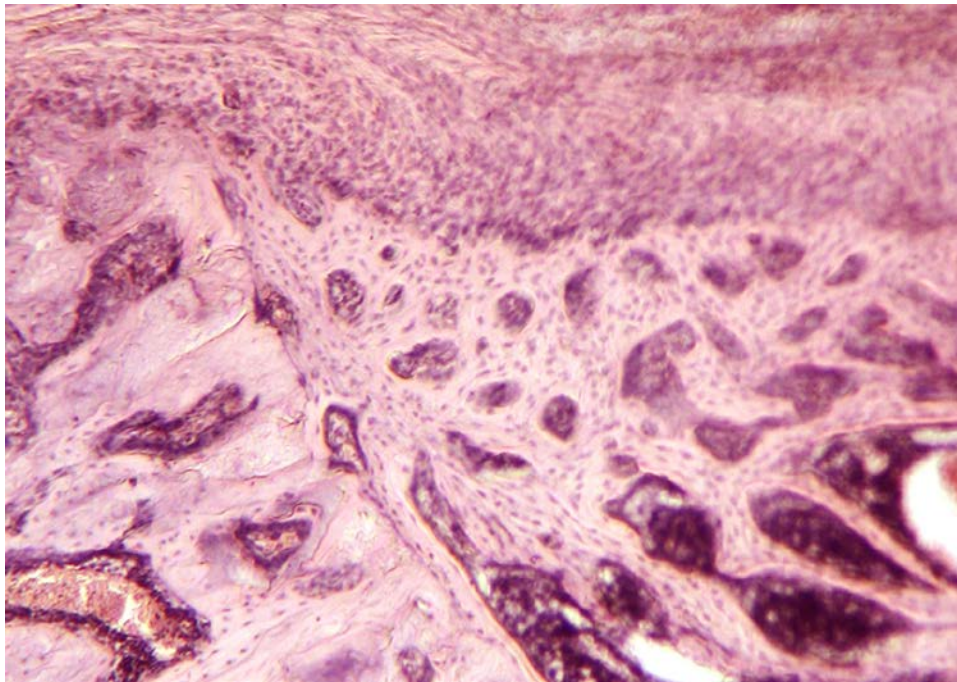


Рис. 4.35. Дрібнопетляста грубоволокниста кісткова тканина у кортикальній зоні дефекту. Невеликі ділянки остеолізісу у прилеглій до дефекту материнській кістці. Розширені судинні канали. Контроль, 14 діб після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

21 доба після травматичного ушкодження. У тварин контрольної групи в зоні дефекту виявляються обширні території новоутворених трабекул як грубоволокнистої, так і пластинчастої структури. Трабекули характеризуються високою щільністю остеоцитів з крупними ядрами. На поверхні окремих трабекул визначаються ділянки щільно розташованих остеобластів (рис. 4.36). Частина міжтрабекулярних просторів виповнена фіброретикулярною тканиною, інша частина – червоним кістковим мозком. При ультраструктурному дослідженні в регенераті виявлені крупні остеокласти, які містять ядра лопатевої форми з каріолемним розташуванням гетерохроматину та еухромними центральними ділянками (рис. 4.37). В цитоплазмі цих клітин спостерігаються численні мітохондрії, дрібні первинні лізосоми, фагосомоподібні пухирці. За морфометричною оцінкою загальна площа кісткової тканини в 1,3 раза перевищує цей показник попереднього

терміну, а площа фіброретикулярної тканини менша в 1,4 раза (див. табл. 4.3). Все це свідчить про активність процесу кісткоутворення у зоні дефекту та відповідає за класифікацією стадії мінералізації кісткової тканини та початку ремоделювання кісткового регенерату.

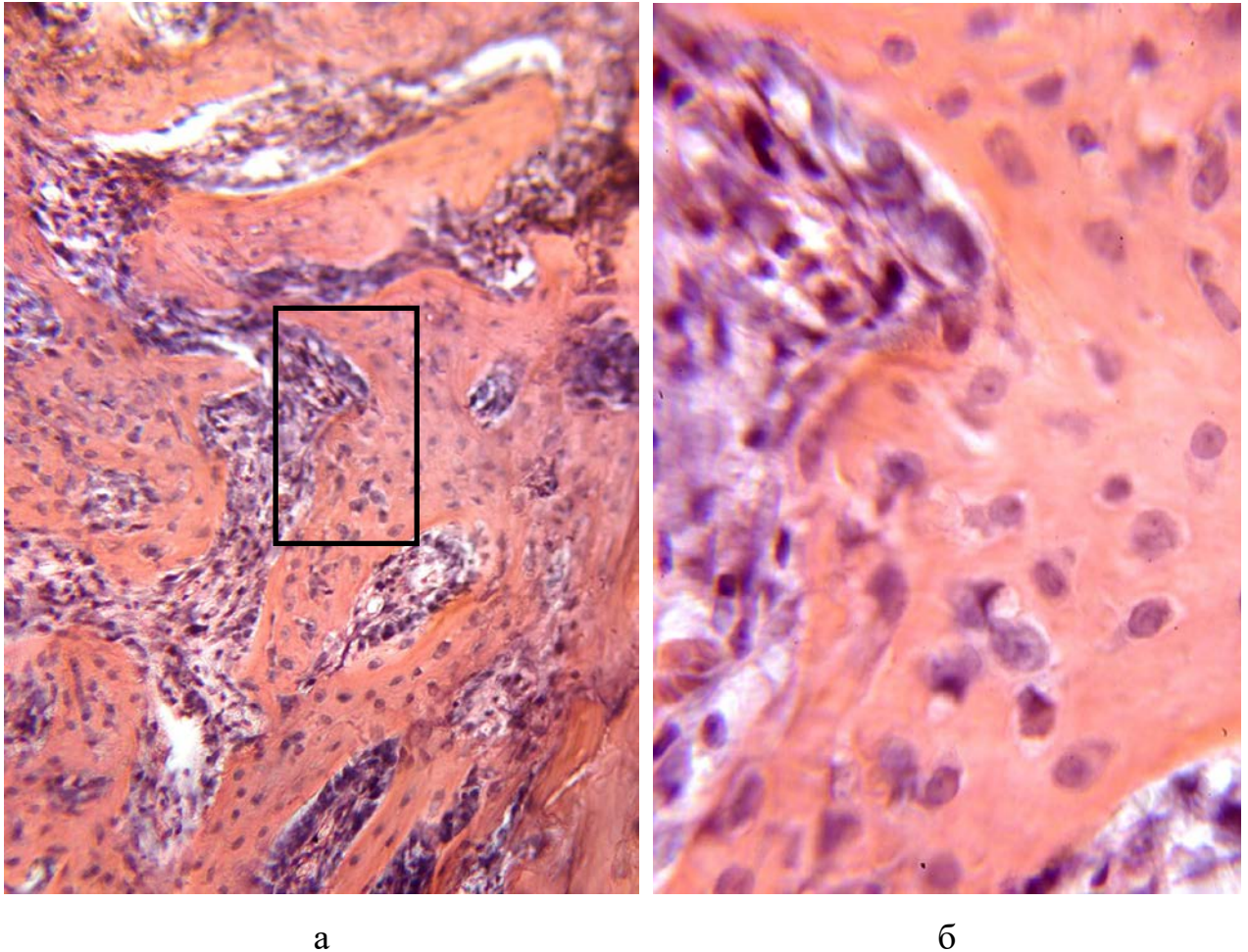


Рис. 4.36. Новоутворені кісткові трабекули у центральній ділянці дефекту. Контроль, 21 доба після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а) ок.10[×], об.25[×]; б) ок.10[×], об.50[×].

У щурів з аліментарним дефіцитом кальцію регенерат представлений трабекулами новоутвореної кістки та фіброретикулярною тканиною (рис. 4.38). Значну площу дефекту займає фіброретикулярна тканина (43 %), що в 1,55 раза більше, ніж у контрольній групі (див. табл. 4.3). Загальна площа новоутвореної кістки в 1,4 раза менша порівняно з контролем, до того ж, її трабекули представлені переважно грубоволокнистою кістковою тканиною.

Площа пластинчастої кісткової тканини становить $\frac{1}{4}$ частини від загальної площі новоутвореної кістки (в контролі – $\frac{1}{3}$ частини) та є в 1,75 раза меншою за цей показник у контрольній групі щурів.

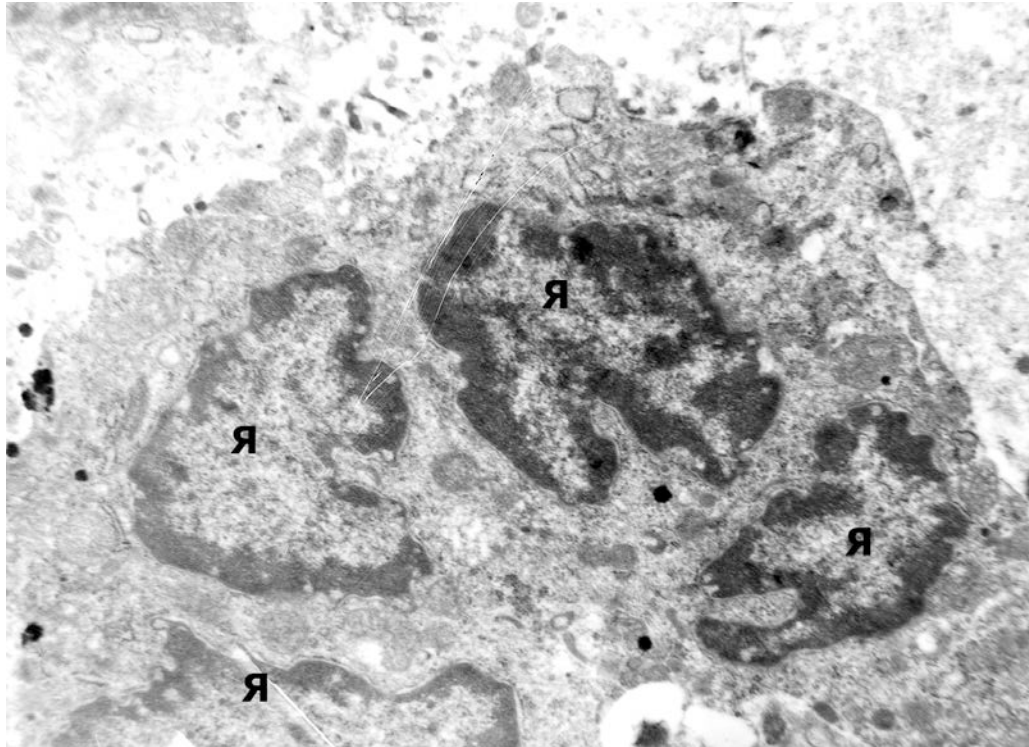


Рис. 4.37. Фрагмент остеокласта з ядрами (Я), в котрих гетерохроматин має каріолемну локалізацію. Контроль, 21 доба після операції. ТЕМ, контрастування за Рейнольдсом. Зб.×12500.

Прилеглі до дефекту материнські кісткові трабекули містять лакуни без остеоцитів та ділянки деструкції, але на поверхні цих трабекул спостерігається нашарування остеїда.

В цілому виявлені через 21 добу після операції морфологічні особливості тканинного складу регенерату у щурів дослідної групи свідчать про меншу інтенсивність кісткоутворення та ремоделювання новоутвореної кісткової тканини, ніж у тварин контрольної групи.

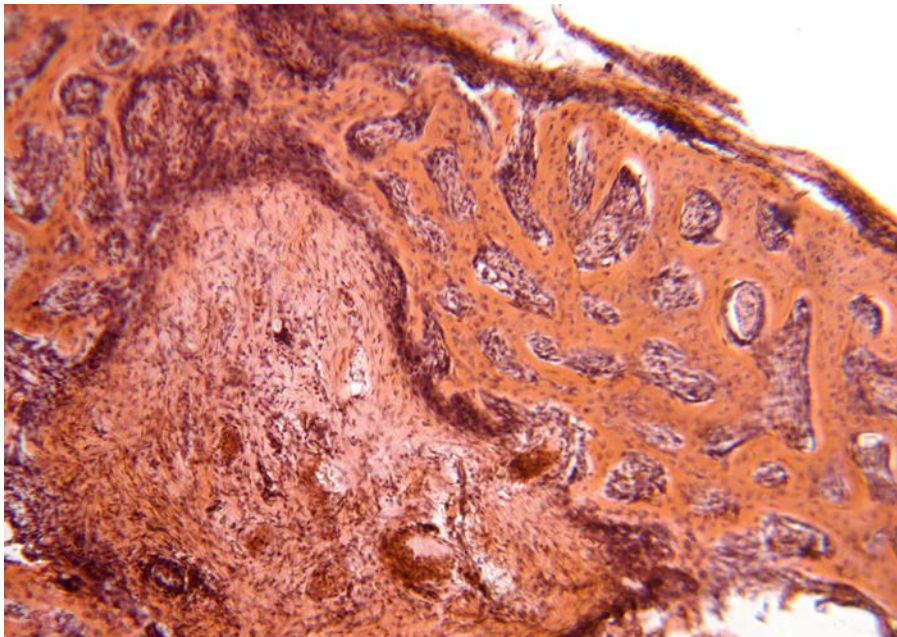


Рис. 4.38. Новоутворені кісткові трабекули та ділянка фіброретикулярної тканини у кортикальній зоні дефекту. Дослід, 21 доба після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

28 днів після травматичного ушкодження. Дослідження зони дефекту у щурів контрольної групи виявляє відновлення кортексу та трабекулярної структури кістки з чітким відмежуванням дефекту (рис. 4.39), водночас спостерігаються невеликі ділянки фіброретикулярної тканини.

У дослідних щурів у зоні дефекту визначається кісткові трабекули, які утворюють дрібнопетлясту сітку подібно до контролю, проте території фіброретикулярної тканини значно більші за контрольні. Утворені міжтрабекулярні простори виповнені червоним кістковим мозком. Спостерігаються ділянки низької інтеграції новоутвореної кісткової тканини з материнською кортикальною кісткою (рис. 4.40).

Морфометричний порівняльний аналіз тканинного складу регенерату визначив, що у дослідних тварин площа фіброретикулярної тканини була в 1,8 раза більша, ніж у щурів контрольної групи (табл. 4.3), а площа пластинчастої кісткової тканини була в 1,9 раза меншою, ніж у контрольних щурів.

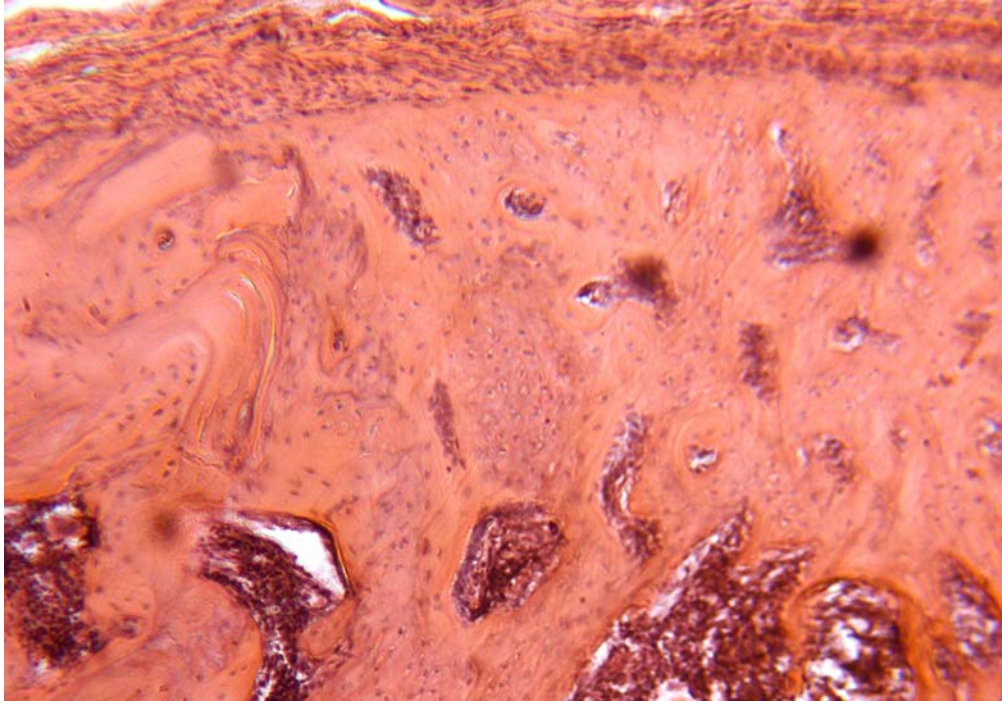


Рис. 4.39. Новоутворена пластинчаста кісткова тканина поєднана з материнською кортикальною кісткою. Відновлення періостального шару над зоною дефекту. Контроль, 28 діб після операції. Забарвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Співвідношення площ тканин у складі регенерату наочно представлено у вигляді діаграми на рис. 4.41 та відображає морфометричні дані, що наведені у табл. 4.3.

За цими результатами можна зробити висновок, що через 28 діб після операції з моделювання метафізарного дефекту стегнової кістки щурів спостерігається морфологічна картина відновлення зони ушкодження, яка відповідає за класифікацією стадії ремоделювання кістки та завершення процесу остеорепарації. Однак менша ступінь зрілості кісткової тканини у тварин дослідної групи при порівнянні з контрольними тваринами свідчить, що кісткоутворення та ремоделювання кістки досі тривають, тобто вони не завершені.

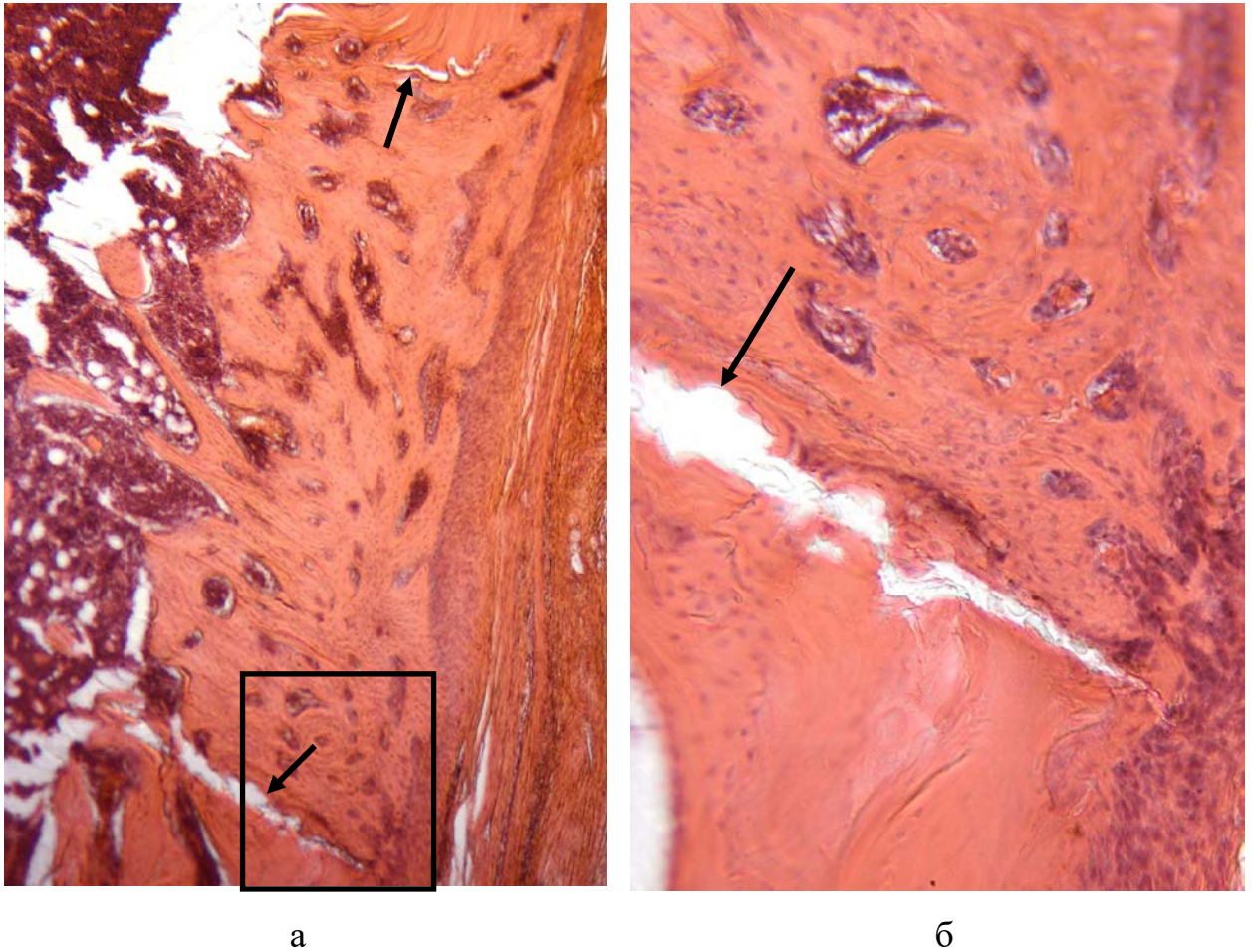
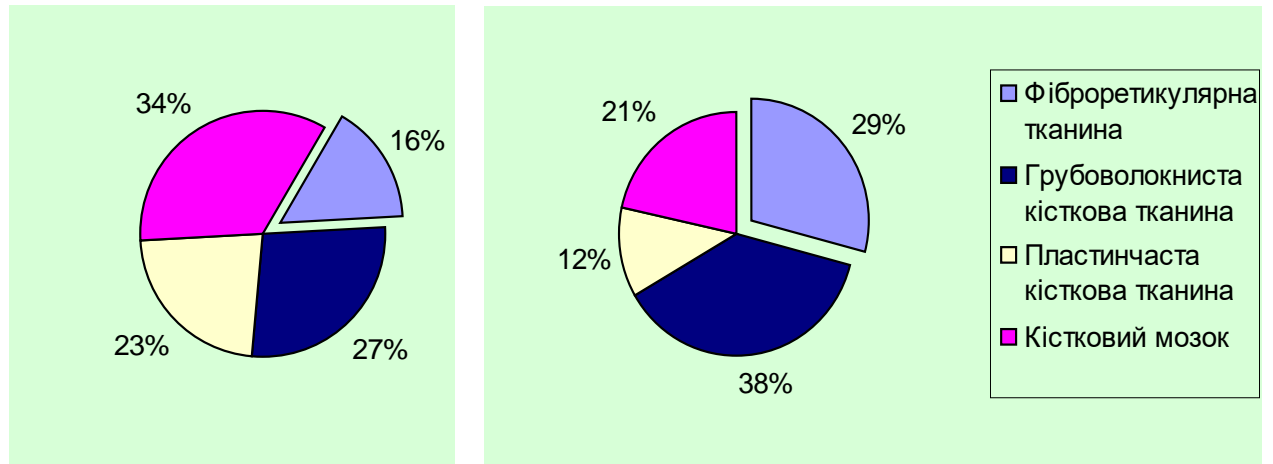


Рис. 4.40. Низька інтеграція новоутвореної кісткової тканини з материнською кортикальною кісткою. Дослід, 28 діб після операції. Забарвлення гематоксиліном та еозином: а) ок.10[×], об.6,3[×]; б) ок.10[×], об.25[×].

Отже, в експерименті на 140 білих лабораторних щурах проведено дослідження репаративного остеогенезу в умовах аліментарного дефіциту кальцію в організмі тварин. Аналіз особливостей морфогенезу репаративної регенерації метафізарного дефекту стегнової кістки щурів в умовах низькокальцієвої дієти у тварин визначив пригнічення репаративного остеогенезу. На запально-проліферативній стадії має місце порушення в співвідношенні клітин у ділянці дефекту (зменшення кількості макрофагів та



контрольна група

дослідна група

Рис. 4.41. Діаграма співвідношення площ тканин у складі регенерату метафізарного дефекту у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 28 днів після операції.

тканинних базофілів), спостерігається низька фагоцитарна та секреторна активність макрофагів та зменшення пулу фібробластів, що в результаті призводить до більш пізнього формування тканиннospецифічних структур - остеїду та кісткових трабекул. Це свідчить, що у дослідних щурів уже на ранніх стадіях остеорепації закладаються передумови для порушення переходу фази травматичного запалення у фазу проліферації та диференціювання клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ АЛІМЕНТАРНОГО ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ НА ПРОЯВ КЛІТИНАМИ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ ОСТЕОГЕННОГО ПОТЕНЦІАЛУ

Аналіз кісткоутворення після трансплантації ККМ до ектопічних ділянок дозволяє провести *in vivo* тестування їх остеогенного потенціалу під впливом різних факторів. Тому саме ця модель була нами обрана для дослідження впливу низькокальцієвої дієти на здатність ККМ щурів до остеогенезу, а в якості носія для трансплантації ККМ використаний пористий ГАП (за рахунок пористості ГАП збільшується площа його поверхні для адгезії та утримання ККМ).

Експеримент був виконаний окремо для двох термінів тривалості аліментарного дефіциту кальцію - 5 та 11 місяців. Окремо у кожній з цих груп дослідження використані та проаналізовані по три варіанти керамічних імплантатів залежно від речовини, якою вони були насичені (табл. 5.1): 1) живильне середовище 199; 2) суспензія ККМ щурів-донорів, яких утримували на стандартному раціоні харчування; 3) суспензія ККМ щурів-донорів, які знаходились на низькокальцієвій дієті.

Таблиця 5.1

Кількісний розподіл керамічних дисків у групах тварин (шт.)

Щури-реципієнти	Живильне середовище 199	Щури-донори ККМ		Загальна кількість
		контроль (n=3)	дослід (n=3)	
Контроль (n=4)	8	8	8	24
Дослід (n=4)	8	8	8	24
Загальна кількість	16	16	16	48

Примітка. n – кількість щурів у групі.

5.1 Гістологічні особливості ектопічного остеогенезу після трансплантації клітин кісткового мозку щурів, яких утримували в умовах 5-місячної низькокальцієвої дієти

Навколо всіх досліджених імплантатів виявляється шар волокнистої сполучної тканини.

Пори керамічних імплантатів, насичених *живильним середовищем 199*, у щурів-реципієнтів і контрольної, і дослідної груп містять пухку сполучну тканину. Ділянки остеогенезу не визначаються.

У внутрішніх порах дисків волокнистий компонент пухкої сполучної тканини представлений тонкими колагеновими волокнами без чіткої орієнтації, тоді як у їх поверхневих порах колагенові волокна формують пучки, розташовані концентрично вздовж краю пори (рис. 5.1). Центральні ділянки поверхневих пор займають кровоносні судини різних розмірів. Пухка сполучна тканина має незначну щільність клітин, серед яких визначаються фібробласти, макрофаги, лімфоцити, а також одиничні плазматичні клітини та нейтрофіли.

У щурів-реципієнтів контрольної групи в імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *контрольних щурів-донорів*, поверхневі пори виповнені кістковою тканиною різного ступеня зрілості - остеїд, грубоволокниста та пластинчаста кісткова тканина. Ділянки пластинчастої кісткової тканини виявляються в 3 із 8 імплантатів (рис. 5.2). У міжтрабекулярних просторах утвореної кісткової тканини визначається фіброретикулярна тканина та іноді спостерігається формування червоного кісткового мозку, склад якого представлений гемопоетичними клітинами (гранулоцитами, еритроцитами та мегакаріоцитами). Утворена кісткова тканина безпосередньо контактує з керамічним матеріалом імплантата.

У внутрішніх порах усіх імплантатів виявляється пухка сполучна тканина з колагеновими волокнами та клітинами, характерними для пухкої сполучної тканини. Щільність розташування колагенових волокон у

керамічних порах варіабельна. Серед клітин значна перевага належить фібробластам.

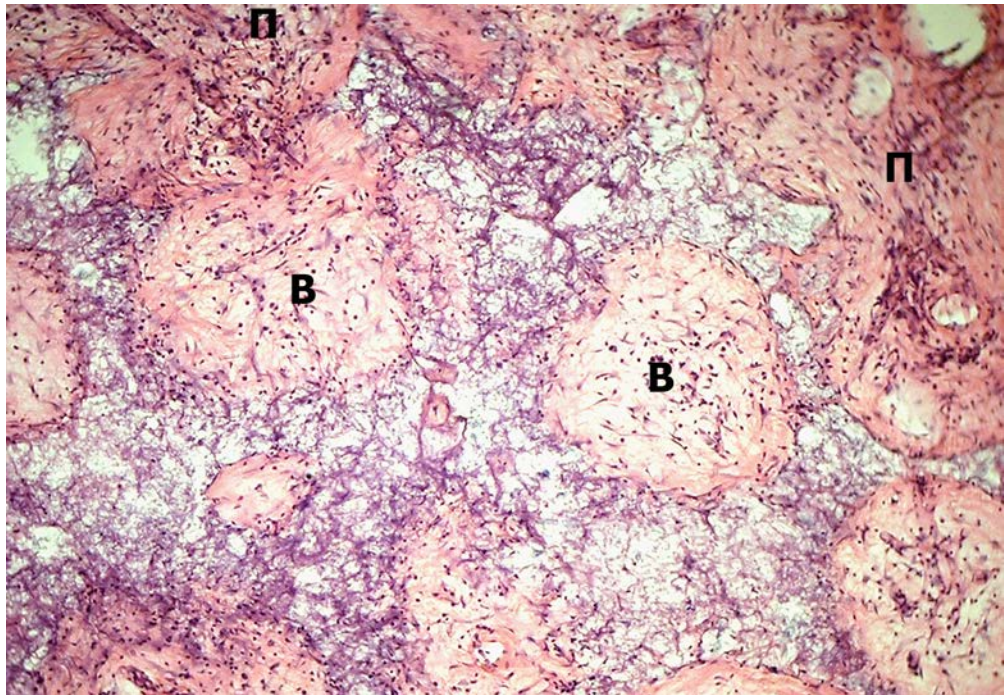


Рис. 5.1. Пухка сполучна тканина з колагеновими волокнами без чіткої орієнтації у внутрішніх порах (В) та з колагеновими волокнами, упорядкованими вздовж країв поверхневих пор (П) імплантата. Пористий керамічний імплантат, насичений живильним середовищем 199. Реципієнт – щур контрольної групи (5 місяців стандартної дієти). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

В імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *дослідних щурів-донорів*, як і в імплантатах попередньої групи, кісткова тканина виявляється лише у поверхневих порах у вигляді ділянок остеоїда, грубоволокнистої та пластинчастої кісткової тканини (рис. 5.3). Проте за результатами морфометричного дослідження встановлено, що площа утвореної кісткової тканини у порах цих імплантатів була в 1,52 раза менша, ніж відповідний показник в імплантатах з трансплантованими ККМ контрольних щурів-донорів (табл. 5.2).

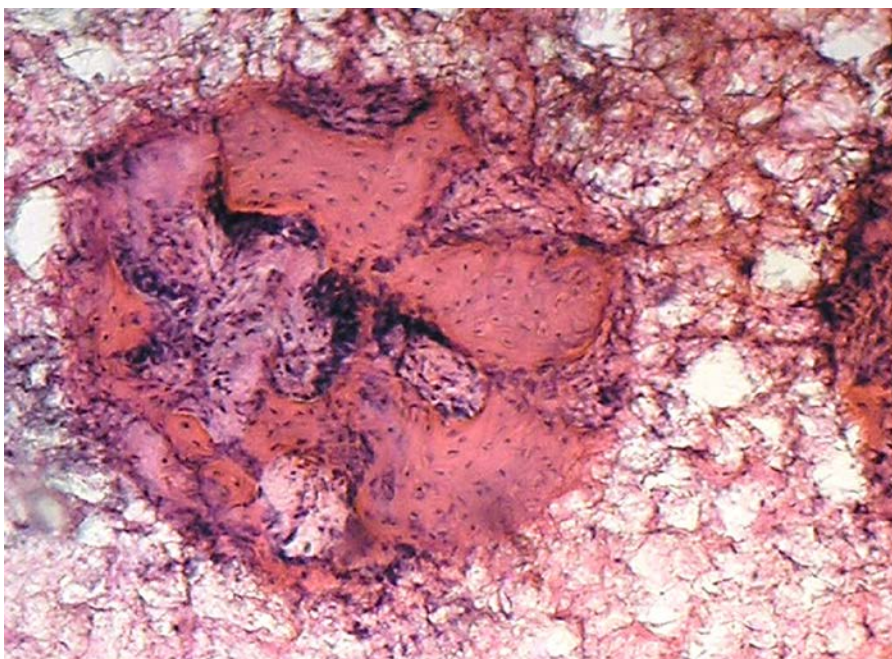


Рис. 5.2. Зріла пластинчаста кісткова тканина у поверхневій порі. Реципієнт та донор ККМ – щури контрольної групи (5 місяців стандартної дієти). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Внутрішні пори імплантатів заповнені пухкою сполучною тканиною, колагенові волокна якої виявляють різноманітність у орієнтації та щільності розташування.

У щурів-реципієнтів дослідної групи в імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *контрольних щурів-донорів*, переважна більшість поверхневих пор містить колагеноволоконисту пухку сполучну та жирову тканини, і лише в деяких з них виявляються ділянки остеїда, грубоволокнистої та пластинчастої кісткової тканини (рис. 5.4).

Внутрішні пори імплантатів заповнені колагеноволоконистою сполучною тканиною з різною щільністю клітин фібробластичного диферону.

В імплантатах з трансплантованими ККМ *дослідних щурів-донорів* істотної різниці у тканинному складі вмісту поверхневих та внутрішніх пор порівняно з попередніми імплантатами не виявляється. Проте візуально звертає увагу значно менша площа кісткової тканини у поверхневих порах та

відсутність пластинчастої кісткової тканини, а також низька щільність клітин у пухкій сполучній тканині внутрішніх пор.



Рис. 5.3. Пластинчаста кісткова тканина (ПКТ) у поверхневих порах, ділянки остеоїда (ОД) та пухка волокниста сполучна тканина (ПСТ) у внутрішніх порах імплантата. Реципієнт ККМ – щур контрольної групи, донор ККМ - щур дослідної групи (5 місяців низькокальцієвої дієти). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Морфометричний аналіз визначив, що у дослідних щурів-реципієнтів, утриманих 5 місяців на низькокальцієвій дієті, площа утвореної кісткової тканини в імплантатах з трансплантованими ККМ дослідних щурів менша у 1,53 раза, ніж в імплантатах з ККМ контрольних тварин (див. табл. 5.2).

Аналіз залежності ектопічного кісткоутворення від впливу аліментарного дефіциту кальцію на організм щурів-реципієнтів показав, що і в імплантатах з трансплантованими ККМ контрольних щурів, і в імплантатах з трансплантованими ККМ дослідних щурів площа утвореної кісткової тканини достовірно менша, ніж в аналогічних імплантатах у контрольних щурів-реципієнтів (відповідно в 1,78 та 1,76 раза) (див. табл. 5.2). Отже,

недостатній вміст кальцію у раціоні харчування протягом 5 місяців викликав в організмі щурів-реципієнтів метаболічні зміни, які негативно вплинули на «реалізацію» остеогенного потенціалу трансплантованих ККМ.

Таблиця 5.2

Площа ектопічно утвореної кісткової тканини в керамічних імплантатах у щурів при 5-місячній низькокальцієвій дієті ($M \pm m$, %)

Групи тварин	Речовина, якою насичені імплантати		
	суспензія ККМ контрольних щурів-донорів	суспензія ККМ дослідних щурів-донорів	С 199
Контрольні щури-реципієнти	$15,7 \pm 1,23$	$10,3 \pm 0,79$ $p_1 < 0,01$	0
Дослідні щури-реципієнти	$8,9 \pm 0,58$ $p_2 < 0,001$	$5,8 \pm 0,47$ $p_1 < 0,001, p_2 < 0,001$	0

Примітки:

1. P_1 – порівняно з імплантатами, які містять ККМ контрольних щурів-донорів;
2. P_2 – порівняно з дисками, імплантованими контрольним шурам-реципієнтам.

Таким чином, результати експериментального дослідження свідчать, що аліментарний дефіцит кальцію протягом 5 місяців чинить негативний вплив на остеогенний потенціал ККМ щурів. Так, у всіх щурів-реципієнтів (і контрольних, і дослідних) у разі трансплантації їм ККМ дослідних щурів (утриманих на низькокальцієвій дієті) площа утвореної кісткової тканини в керамічних імплантатах достовірно менша, ніж при трансплантації ККМ контрольних щурів (утриманих на стандартній дієті).

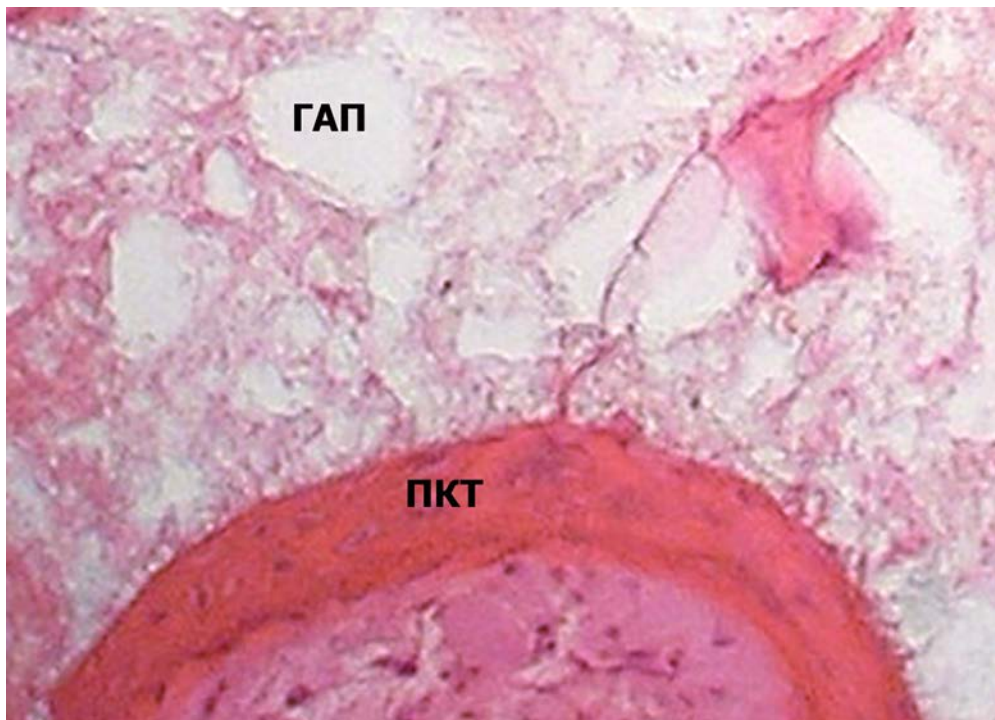


Рис. 5.4. Ділянка пластинчастої кісткової тканини (ПКТ), розташована уздовж краю поверхневої пори імплантата на межі з керамічним матеріалом (ГАП). Реципієнт ККМ – щур дослідної групи (5 місяців низькокальцієвої дієти), донор ККМ - щур контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.50[×].

Також встановлено, що ектопічний остеогенез залежить не лише від остеогенного потенціалу трансплантованих ККМ, але й від метаболічного стану організму тварини-реципієнта, тобто умов, де відбувається «реалізація» остеогенного потенціалу. При цьому, найбільша активність остеогенезу, яку оцінювали за площею та ступенем зрілості ектопічно утвореної кісткової тканини, виявляється у випадку, коли і донор, і реципієнт ККМ – це щури контрольної групи, а найменша – у випадку, коли і донор, і реципієнт ККМ є щурами дослідної групи.

5.2 Гістологічні особливості ектопічного остеогенезу після трансплантації клітин кісткового мозку щурів, яких утримували в умовах 11-місячної низькокальцієвої дієти

Всі керамічні диски, що були імплантовані під шкіру на спині у щурів, оточені шаром волокнистої сполучної тканини.

В порах керамічних імплантатів, які були насичені *живильним середовищем 199*, у всіх щурів-реципієнтів (і контрольної, і дослідної груп) присутня пухка сполучна тканина, натомість кісткова тканина не виявляється.

У крайових ділянках поверхневих пор імплантатів щільність колагенових волокон висока, вони розташовані концентрично вздовж краю пори. У центральних ділянках цих пор спостерігаються численні різнокаліберні кровоносні судини та колагенові волокна, які формують «повстиноподібні» структури з більш високою щільністю клітин, ніж у крайових ділянках (рис. 5.5). Клітинний склад представлений переважно лімфоцитами та фібробластами, натомість макрофаги поодинокі.

Внутрішні пори імплантатів містять пухку сполучну тканину з низькою щільністю клітин (фібробластів, лімфоцитів та макрофагів) та з тонкими колагеновими волокнами, які не мають чіткої орієнтації.

У щурів-реципієнтів контрольної групи в імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *контрольних щурів-донорів*, у поверхневих порах виявляються волокниста сполучна тканина та ділянки остеїду (рис. 5.6). Всі інші пори керамічних імплантатів містять пухку сполучну тканину, у якій щільність та орієнтація розташування колагенових волокон зростає у напрямку від внутрішніх до поверхневих ділянок імплантатів. У багатьох поверхневих порах спостерігаються численні кровоносні судини, які зосереджені в центрі пори, і відмічається збільшена щільності клітин, особливо у крайових відділах пор. Виявляються клітини у

стані мітотичного поділу. По краю пор на межі з керамічним матеріалом знаходяться веретеноподібні фібробласти.

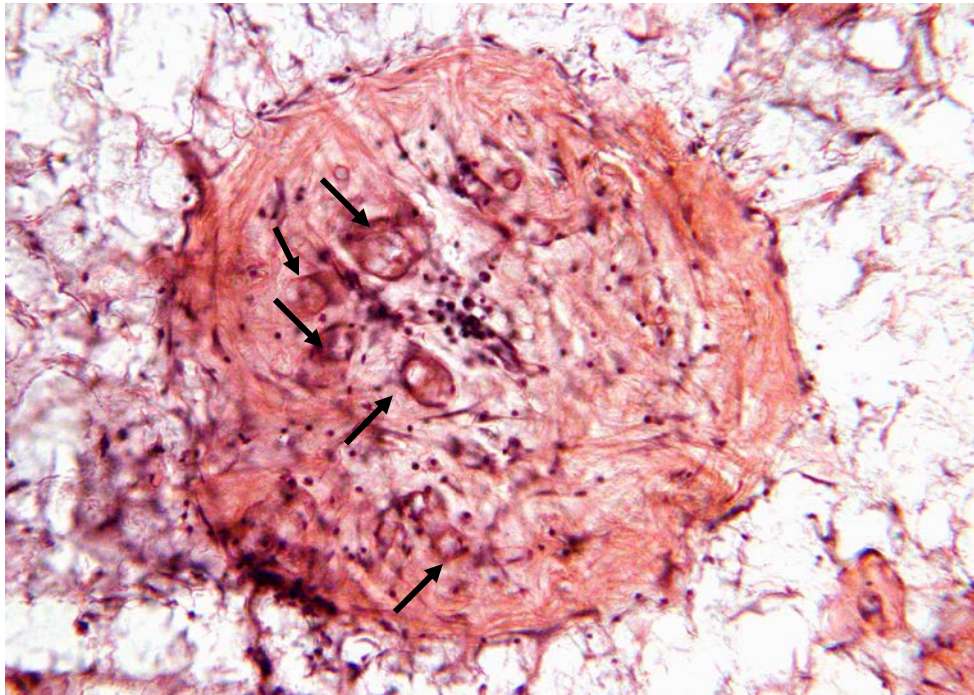


Рис. 5.5. Різнокаліберні кровоносні судини в центрі поверхневої пори імплантата. Колагенові волокна розташовані концентрично вздовж краю пори. Пористий керамічний імплантат, насичений живильним середовищем 199. Реципієнт – щур контрольної групи (11 місяців стандартної дієти). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

В даній серії нашого експериментального дослідження у щурів, утриманих на 11-місячній стандартній дієті, загальний вік становить 12 місяців, а у щурів, утриманих на аналогічній дієті протягом 5 місяців, - становить 6 місяців, що надає можливість оцінити вплив вікових змін в організмі цих тварин на остеогенний потенціал їх ККМ. За результатами морфометричного аналізу показано, що у разі 12-місячного віку донорів і реципієнтів ККМ площа утвореного в імплантатах остеоїду в 2,2 раза менша (табл. 5.3) за площу кісткової тканини в аналогічних імплантатах 6-місячних тварин (розділ 5.1, табл. 5.2). Одержані нами результати підтверджують дані К. Inoue et al. (1997), які досліджували здатність ККМ щурів різного віку до

кісткоутворення у пористому ГАП та показали, що з віком остеогенний потенціал ККМ зменшується.

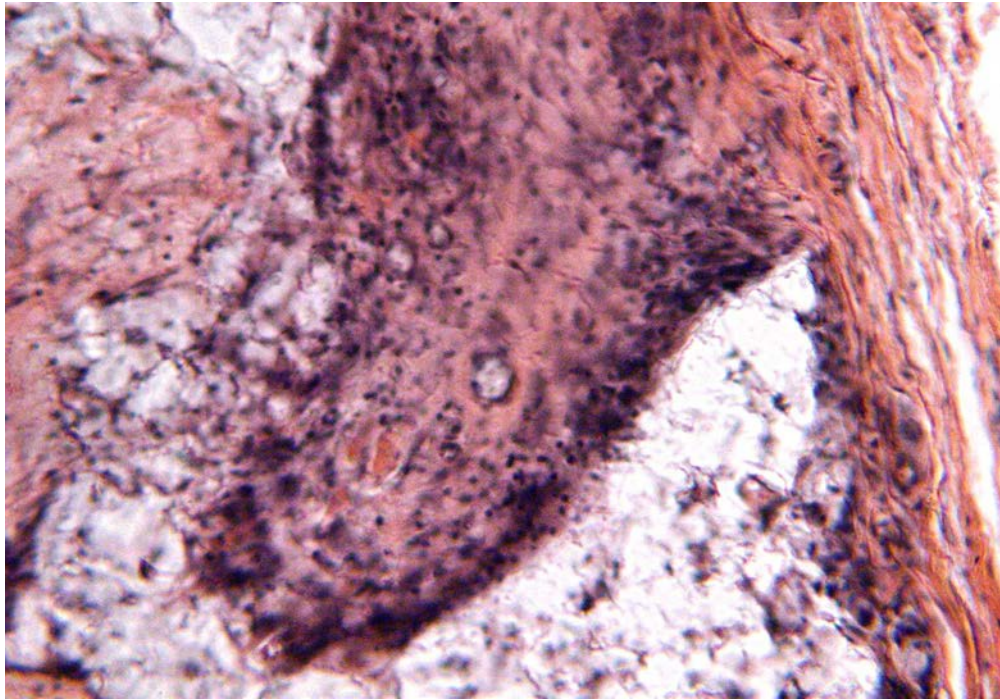


Рис. 5.6. Ділянка остеогенної тканини у поверхневій порі імплантата. Реципієнт і донор ККМ - щури контрольної групи (11 місяців стандартної дієти). Забарвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.50[×].

В імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *дослідних щурів-донорів*, ділянки остеогенезу не виявляються. Керамічні пори заповнені пухкою сполучною тканиною з тонкими колагеновими волокнами без чіткої орієнтації та з низькою щільністю фібробластів навіть у поверхневих порах імплантатів, і лише в крайових відділах декількох із них спостерігається збільшення щільності фібробластів та наявність судин, які на окремих ділянках, перетинаючи пору, виходять за її межі та проникають до сусідніх пор (рис. 5.7).

Площа ектопічно утвореної кісткової тканини в керамічних імплантатах у щурів при 11-місячній низькокальцієвій дієті (M±m, %)

Групи тварин	Речовина, якою насичені імплантати		
	суспензія ККМ контрольних щурів-донорів	суспензія ККМ дослідних щурів-донорів	С 199
Контрольні щури-реципієнти	7,2 ± 0,57 (n=4)	0	0
Дослідні щури-реципієнти	3,7 ± 0,45 (n=3) P<0,01	0	0

Примітки: n – кількість імплантатів, які містять ділянки остеоїду

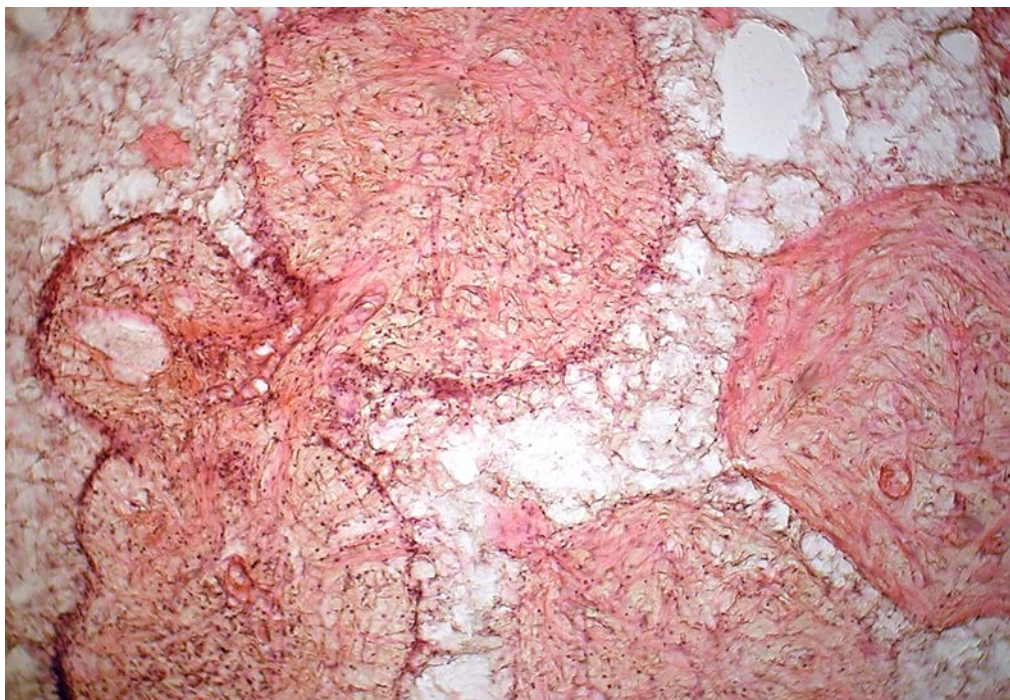


Рис. 5.7. Пухка волокниста сполучна тканина з низькою щільністю клітин у порах імплантата. Реципієнт ККМ – щур контрольної групи, донор ККМ - щур дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

У щурів-реципієнтів дослідної групи в імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *контрольних щурів-донорів*, у поверхневих порах виявляються волокниста сполучна тканина та невеличкі ділянки остеоїда (рис. 5.8), площа якого менша в 1,95 раза, ніж в аналогічних імплантатах у контрольних щурів-реципієнтів (табл. 5.3). Внутрішні пори імплантатів заповнені пухкою сполучною тканиною та розрізняються між собою щільністю розташування колагенових волокон та фібробластів, які переважно знаходяться поодиноці між колагеновими волокнами, і лише на невеликих територіях (як правило, у центральних ділянках пор) спостерігається їх скупчення.

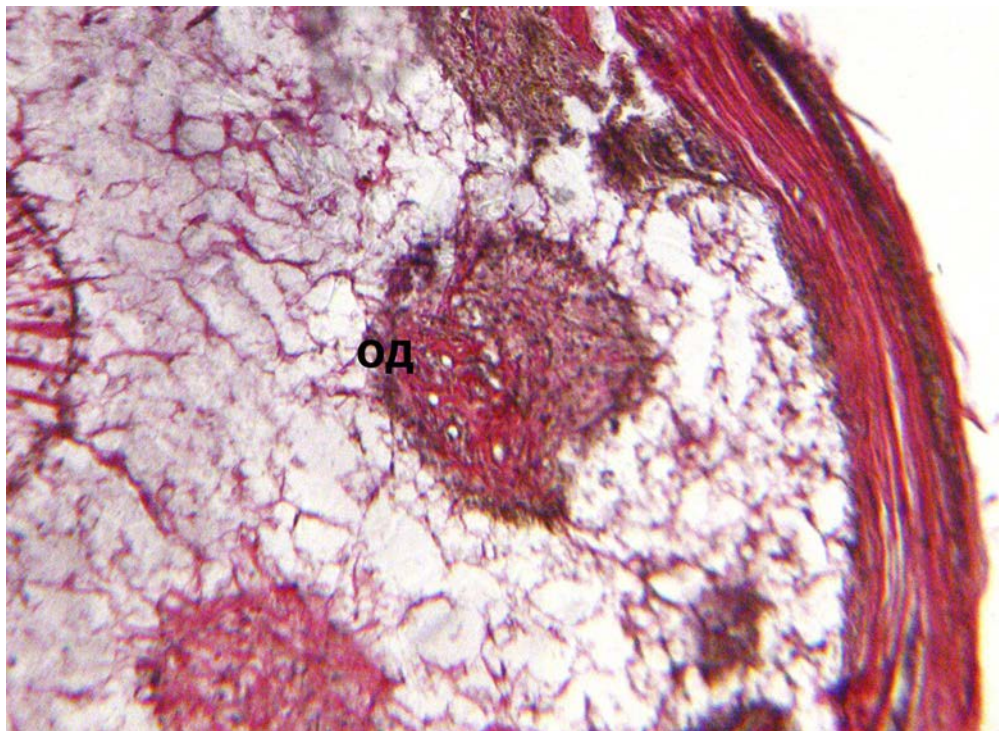


Рис. 5.8. Шар волокнистої сполучної тканини на поверхні керамічного імплантата. Ділянка остеоїда (ОД) у поверхневій порі імплантата. Реципієнт ККМ – щур дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти), донор ККМ - щур контрольної групи. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізон. Ок.10[×], об.6,3[×].

Забарвлення гістозрізів пікрофуксином за Ван-Гізон дозволило спостерігати два основних типи напрямків розташування колагенових волокон усередині керамічних пор: 1) концентричне - уздовж краю пор; 2) радіальне - із середини пори до її країв та за її межі з утворенням «променеподібних» структур (рис. 5.9). При цьому у порах із значною кількістю кровоносних судин спостерігаються обидва типи орієнтації колагенових волокон, тоді як у порах з невеликою кількістю судин переважають концентрично розташовані волокна, а в центральних ділянках таких пор колагенові волокна не мають чіткої орієнтації.

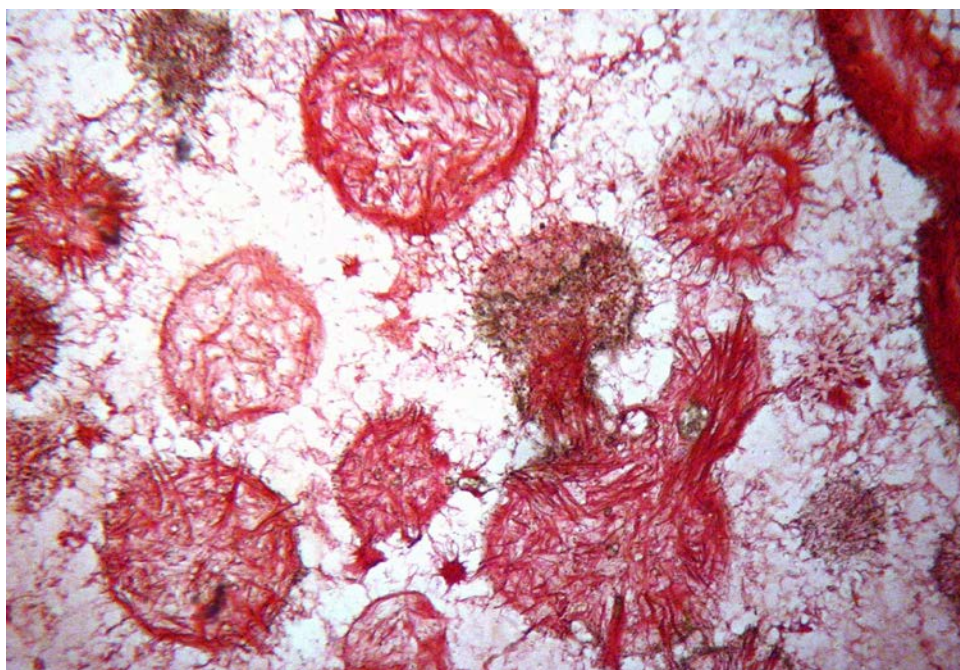


Рис. 5.9. Пухка сполучна тканина у порах керамічного імплантата. Радіальне та концентричне розташування колагенових волокон. Реципієнт ККМ – щур дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти), донор ККМ - щур дослідної групи. Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізон. Ок.10[×], об.6,3[×].

Характерна особливість всіх імплантатів, реципієнтами яких були щури дослідної групи, - це численні багатоядерні клітини сторонніх тіл, а можливо і остеокласти. Вони спостерігаються на межі керамічних імплантатів із сполучною тканиною, яка їх оточує, а також у крайових

відділах поверхневих пор біля керамічного матеріалу (рис. 5.10). Відомо, що одним з механізмів резорбції ГАП та трикальційфосфатної кераміки є остеокластична резорбція, і остеокласти «сприймають» керамічний матеріал як кісткову тканину [173]. Враховуючи макрофагально-моноцитарний характер походження остеокластів, їх локалізацію на поверхні керамічного матеріалу, можна припустити їх участь у резорбції ГАП, який у даному експерименті використаний як носій ККМ.

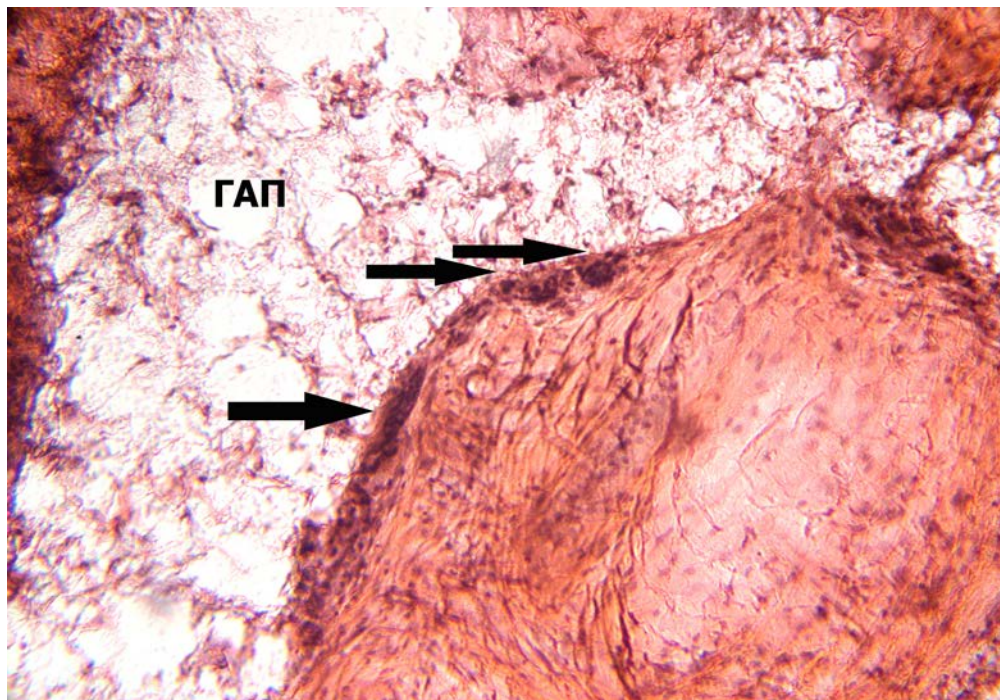


Рис. 5.10. Багатоядерні клітини сторонніх тіл (стрілка) у крайових відділах пори на межі з керамічним матеріалом (ГАП). Реципієнт ККМ – щур дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти), донор ККМ - щур контрольної групи. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

В імплантатах з трансплантованими ККМ, отриманими від *дослідних щурів-донорів*, керамічні пори заповнені пухкою сполучною тканиною, ділянки остеогенезу не визначаються. Поверхневі пори між собою розрізняються щільністю колагенових волокон та клітин, водночас більшість з них містять численні кровоносні судини (рис. 5.11). У внутрішніх порах

імплантатів виявляється пухка сполучна тканина з низькою щільністю клітин, у тому числі і фібробластів (рис. 5.12).

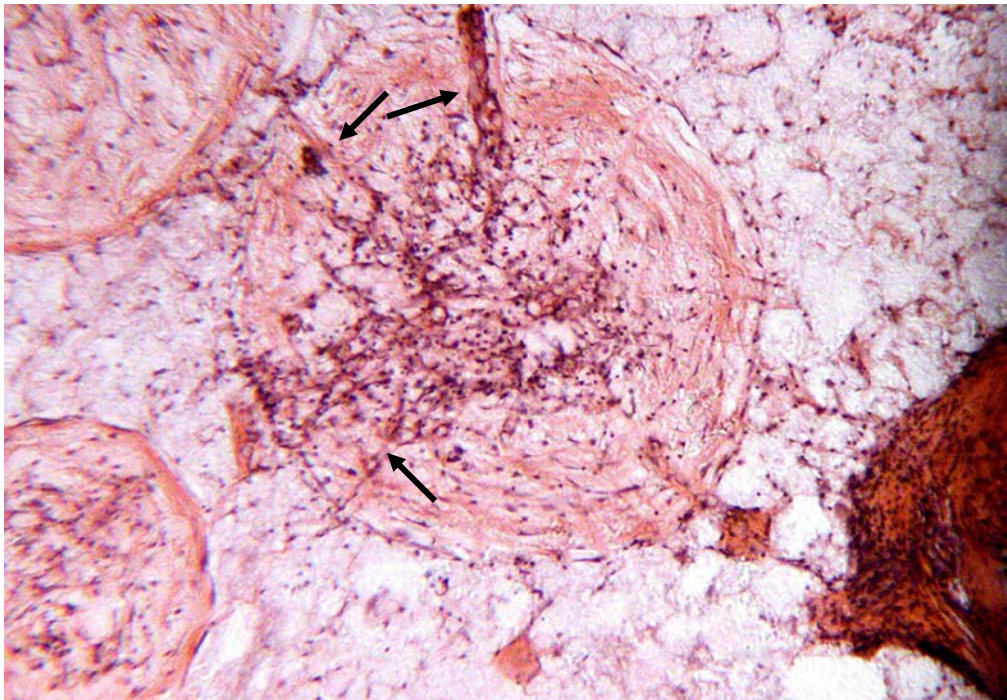


Рис. 5.11. Кровоносні судини у поверхневій порі керамічного імплантата. Реципієнт і донор ККМ - щури дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти). Забарвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.25[×].

Таким чином, дослідження впливу 11-місячної низькокальцієвої дієти на остеогенний потенціал ККМ щурів показало, що цей фактор пригнічує здатність ККМ до кісткоутворення. Так, у жодного щура-реципієнта (ні контрольного, ні дослідного) в порах керамічних імплантатів з трансплантованими ККМ дослідних щурів остеогенез не виявлений, а в імплантатах з трансплантованими ККМ контрольних щурів площа остеїдних ділянок в 1,95 раза менша у дослідних щурів-реципієнтів, ніж у контрольних. Це свідчить про негативний вплив 11-місячного аліментарного дефіциту кальцію не тільки на остеогенний потенціал ККМ щурів-донорів, але й на стан організму щурів-реципієнтів.

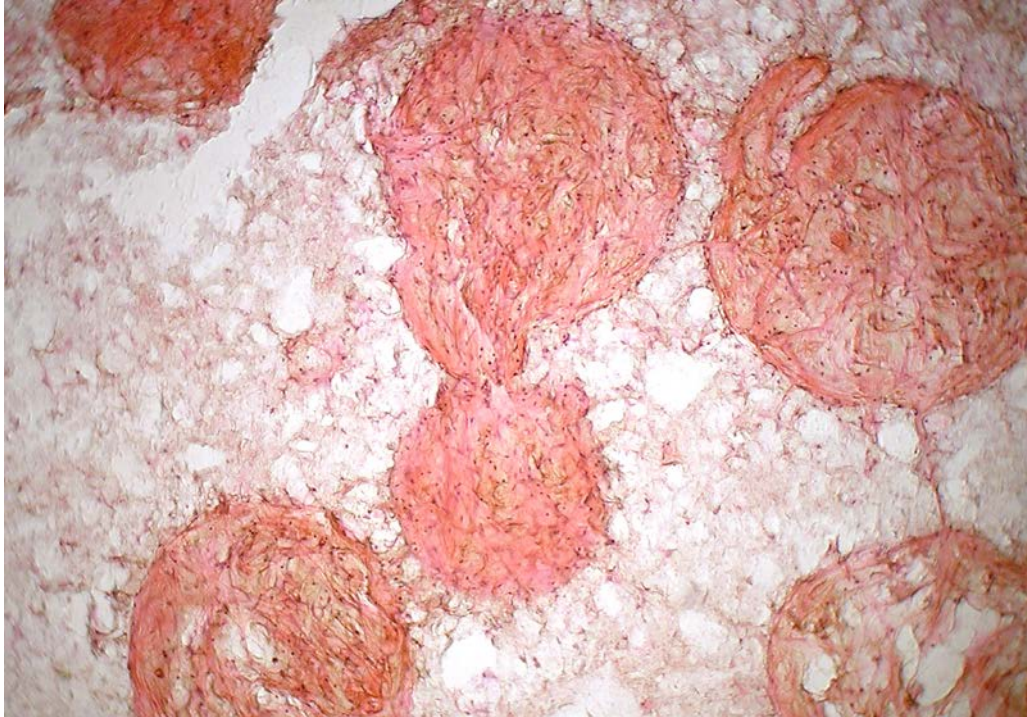


Рис. 5.12. Пухка сполучна тканина з низькою щільністю клітин у внутрішніх порах імплантата. Реципієнт і донор ККМ - щури дослідної групи (11 місяців низькокальцієвої дієти). Забарвлення гематоксилином та еозином. Ок.10[×], об.12,5[×].

Отже, в експерименті на 28 білих лабораторних щурах проведено тестування *in vivo* остеогенного потенціалу ККМ щурів при їх трансплантації підшкірно на пористому керамічному (ГАП) носії. Вивчений вплив аліментарного дефіциту кальцію різної тривалості (5 та 11 місяців) на здатність ККМ до кісткоутворення в ектопічних ділянках. Проаналізована наявність остеогенезу в порах імплантатів у щурів-реципієнтів 4 груп експерименту:

- 1) дефіцит кальцію (0,03 % Ca) у раціоні харчування протягом 5 місяців;
- 2) дієта зі стандартним вмістом кальцію (1,2 %) протягом 5 місяців;
- 3) дефіцит кальцію (0,03 % Ca) у раціоні харчування протягом 11 місяців;
- 4) дієта зі стандартним вмістом кальцію (1,2 %) протягом 11 місяців.

Результати експериментального дослідження показали, що після 5-місячної дієти у всіх щурів-реципієнтів (і контрольних, і дослідних) в поверхневих порях імплантатів з трансплантованими ККМ формувались ділянки остеогенезу (остеоїд, грубоволокниста та пластинчаста кісткова тканина). Натомість в імплантатах, насичених живильним середовищем 199 без ККМ (в якості контролю), кісткоутворення не спостерігалось, а їх керамічні пори заповнені пухкою сполучною тканиною. В імплантатах з ККМ дослідних щурів-донорів площа (%) ектопічно утвореної кісткової тканини у дослідних щурів-реципієнтів (5-місячна низькокальцієва дієта) менша в 1,53 раза (дослід - $5,8 \pm 0,47$; контроль - $8,9 \pm 0,58$; $P < 0,001$), у контрольних щурів-реципієнтів – менша в 1,52 раза (дослід - $10,3 \pm 0,79$; контроль - $15,7 \pm 1,23$; $P < 0,01$).

При 11-місячній тривалості експерименту в усіх імплантатах з ККМ дослідних щурів остеогенез не виявлений, тоді як половина досліджених імплантатів з ККМ контрольних щурів у поверхневих порях містила остеоїдні ділянки. Показник їх площі (%) у дослідних щурів-реципієнтів менший в 1,95 раза, ніж у контрольних щурів-реципієнтів (дослід - $3,7 \pm 0,45$; контроль - $7,2 \pm 0,57$; $P < 0,01$).

Всі ці результати свідчать, що низькокальцієва дієта пригнічує здатність ККМ до кісткоутворення, а також негативно впливає на метаболічний стан організму щурів-реципієнтів, де «відбувається реалізація» остеогенних властивостей трансплантованих ККМ. Збільшення тривалості дії цього фактору призводить до підсилення його негативного впливу як на остеогенний потенціал ККМ щурів-донорів, так і на метаболічні процеси, що перебігають в організмі щурів-реципієнтів.

РОЗДІЛ 6

ЗАКЛЮЧЕННЯ

На всіх термінах моделювання аліментарного дефіциту кальцію (1, 5, 11 місяців) у дослідних щурів визначались порушення структури кісткової тканини з ознаками її резорбції. Водночас ступінь прояву структурних змін у кістковій тканині був різним залежно від статі тварин і від терміну утримання тварин на низькокальцієвій дієті.

У губчастій кістці дистального епіметафіза спостерігалось порушення розташування трабекулярної “сітки”, пов’язане з нерівномірним потоншенням та “відокремленням” кісткових трабекул, розширенням міжтрабекулярних просторів. При ультраструктурному дослідженні в кістковому матриксі дослідних щурів відмічені нерівномірна мінеральна щільність, осередки деструкції у вигляді тканинного детриту, осміюфільні лінії цементації варіабельної ширини та форми, поблизу яких часто спостерігались щілин. Більшість остеоцитів містили гіперхромні ядра та знаходились в розширених лакунах, які мали нерівномірні “зигзагоподібні” контури країв. Спостерігались лакуни з клітинним детритом або без клітин.

У діафізі дослідних щурів визначались ознаки порушення компактизації кістки, пов’язані з наявністю ділянок пазушної резорбції та порожнин, які містили фіброзну тканину, а також ділянок спонгізації ендостального боку кортексу та лакунарної резорбції періостального боку. Виявлений у щурів дослідної груп комплекс структурних змін кісткової тканини засвідчив, що в умовах аліментарного дефіциту кальцію відбувається активізація остеорезорбційного процесу у формі остеокластичної (син. лакунарної) резорбції, остеоцитарного (син. періостеоцитарного) остеолізу, пазушної резорбції (син. «рідка кістка») та периканалікулярного (син. периваскулярного) остеолізу. Водночас ступінь прояву структурних змін у кістковій тканині був різним залежно від статі тварин, а також від терміну їх утримання на низькокальцієвій дієті.

Відомо, що аліментарний дефіцит кальцію підсилює процеси кісткової резорбції, але їх інтенсивність та ступінь прояву визначається змінами у активності остеобластів та остеокластів, яка регулюється рівнем паратгормону (ПТГ), пов'язаного з цілим рядом факторів: вмістом кальцію у дієті, терміном тривалості дієти, віком, статтю, типом кісткової речовини (губчаста або компактна) [62, 116, 129-131, 141]. Результати морфометричного аналізу підтверджують дані про різну швидкість та механізми «втрати» кісткової тканини у самців та самиць, пов'язані з дією статевих гормонів (більш вираженою у естрогенів, між у андрогенів) у «захисті» кістки від резорбції, що викликана підвищенням рівня ПТГ [137].

При дослідженні морфологічних особливостей перебігу репаративного остеогенезу у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію нами виявлена низька функціональна активність макрофагів, які є основними «регуляторами» переходу від фази запалення до фази проліферації. У зв'язку з цим спостерігається уповільнення темпу очищення зони травматичного ушкодження від продуктів запалення, а внаслідок затягування у часі перебігу фази запалення відбувається затримка проліферативної фази. Так, морфологічно через 7 діб після операції у зоні дефекту виявляються ділянки грануляційної тканини, а також відламки материнської кістки, що може бути пов'язано з порушенням процесів фагоцитозу.

Отримані у нашій роботі дані про клітинний склад регенерату через 3 доби після операції свідчать, що у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію достовірно менше макрофагів (контроль - $20,7 \pm 2,4$ %, дослід - $10,8 \pm 0,9$ %, $P < 0,001$) та тканинних базофілів (контроль - $6,2 \pm 1,2$ %, дослід - $2,9 \pm 0,6$ %, $P < 0,05$), тоді як за кількістю лімфоцитів достовірної різниці не виявлено (контроль - $18,4 \pm 0,5$ %, дослід - $15,7 \pm 3,5$ %, $P > 0,05$). Це дає підставу висунути припущення, що порушення макрофагальної ланки у дослідних тварин може бути пов'язаним з недостатньою продукцією ГМ-КСФ через меншу кількість макрофагів і тканинних базофілів. Наші дані підтверджують висновки

О.О.Оні [167] щодо особливої важливості ролі тканинних базофілів у репаративному остеогенезі тварин (на відміну від людини).

При електронно-мікроскопічному дослідженні ми не виявили у регенератах щурів контрольної та дослідної груп такої різниці за функціональною активністю остеокластів, як макрофагів, не дивлячись на те, що вони мають однакове походження – гемопоетичне (з мононуклеарів). Ці результати свідчать, що диференціація макрофагів та остеокластів регулюється різними шляхами, а підвищений рівень ПТГ в організмі щурів з аліментарним дефіцитом кальцію не перешкодив диференціації остеокластів, тоді як диференціація макрофагів зазнала негативного впливу цих умов. Встановлена нами низька остеобластична диференціація клітин регенерату дослідних щурів у порівнянні з контрольними може бути пов'язана з недостатнім рівнем КМБ-2 через порушення макрофагальної ланки регенерації (зменшену кількість та знижену функціональну активність макрофагів).

В літературі є дані, що в кістковому регенераті через 3, 5 діб після травматичного ушкодження кістки виявляється локальний кальциноз, котрий пов'язують із підсиленням виходом кальцію з ушкодженої кісткової тканини та збільшенням активності фосфатаз, які вивільняються із зруйнованих структур. Так, В.И.Шевцов, Ю.М.Ирьянов [95] зазначають, що в результаті цього спостерігаються відкладення мінералів у вигляді голкоподібних кристалів апатиту в тромбоцитах, адипоцитах кісткового мозку, на волокнах фібрину та імунних комплексах, тобто неколагенових. Якщо врахувати те, що кальцій бере участь у неспецифічній регуляції процесів клітинної проліферації (низька концентрація кальцію) та диференціації (висока концентрація кальцію), то можна припустити, що для нормального перебігу остеорепації важливу роль грає локальна концентрація кальцію. І якщо, травмована кістка має остеопоротичні зміни, тобто низьку мінеральну щільність, то вивільнений з неї кальцій не може накопичитись у тій кількості, яка забезпечить необхідну локальну концентрацію кальцію, або вона може

створитись за рахунок підсилення резорбції кістки у ділянках, прилеглих до зони ушкодження. Це може привести до зволікання у часі стадій процесу репаративного остеогенезу.

Можна припустити, що порушення перебігу регенерації кістки в умовах низькокальцієвої дієти певною мірою пов'язані з активністю ПТГ. Дані літератури свідчать, що у всіх тварин з аліментарним дефіцитом кальцію спостерігається підвищений рівень ПТГ [109, 176, 182, 184]. Це може свідчити, що при травмі кісток на фоні аліментарного дефіциту кальцію спостерігається надто високий рівень ПТГ, але це питання в доступній нам літературі не висвітлено. В даному разі інтерес можуть викликати ПТГ та простагландин E_2 , які залучені до запальної стадії остеорепації. Ці регулятори перебігу процесу (ПТГ – системний, простагландин E_2 – локальний) виявляють подвійний дозозалежний ефект дії на кістку. Простагландин E_2 при низькій концентрації стимулює проліферацію та остеобластичну диференціацію клітин у зоні кісткового ушкодження і синтез колагену, тоді як при високій концентрації він всі ці процеси гальмує. Подібний вплив характерний і для ПТГ: низькі дози стимулюють кісткоутворення, а високі – стимулюють кісткову резорбцію та інгібують кісткоутворення. В літературі висловлено припущення, що такий протилежний ефект може бути пов'язаним з утворенням різних медіаторів, які опосередковують процеси. Наприклад, відомо, що ПТГ стимулює продукцію факторів, які активують остеокластогенез, а отже і кісткову резорбцію (ІЛ-6, ГМ-КСФ), а також факторів, які активують проліферацію та/або остеобластичну диференціацію клітин, а отже і кісткоутворення (ІПФР, ТФР- β , і також простагландин E_2) [98]. Враховуючи ці дані, можна припустити, що у нашому експерименті надто високий рівень ПТГ у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію стимулював утворення надто високого рівню простагландину E_2 , через що він проявив свою інгібуючу дію на остеобластичну диференціацію клітин регенерату, і водночас підсилив судинну проникливість, яка сприяє набряку та міграції клітин запалення.

Щодо ГМ-КСФ, то з літературних джерел відомо, що цей фактор, з яким зв'язують кісткову резорбцію, здійснює контроль проліферації та диференціації клітин-попередників гранулоцитів та макрофагів не тільки локально, але й системно. Синтезується ГМ-КСФ Т-лімфоцитами, макрофагами, тканинними базофілами, ендотеліоцитами та ін. [22].

Простагландин E_2 також збільшує синтез ППФР-1, що, ймовірно, відіграє певну роль на запальній стадії репаративного процесу, коли на короткий час він інгібує активність остеокластів, а потім підсилює кісткову резорбцію шляхом стимуляції попередників остеобластів та підсиленням остеокластогенезу (формування активних остеокластів із їх попередників) [99].

В основі порушення може бути зниження хемотаксису макрофагів та відповідно порушення взаємозв'язку між макрофагами, фібробластами та ендотеліальними клітинами. Відомо, що макрофаги окрім ФРФ секретують фактор росту ендотеліальних клітин, а ендотеліальні клітини – ФРФ [17].

В експерименті з тестування остеогенних властивостей клітин кісткового мозку у ектопічній ділянці було встановлено, що аліментарний дефіцит кальцію пригнічує ці властивості, і при збільшенні терміну дії цього фактору зростає пригніченість остеогенних властивостей. При цьому різним термінами тривалості аліментарного дефіциту кальцію (5 та 11 місяців) відповідав різний вік щурів (6 та 12 місяців відповідно), тому вікові зміни також негативно позначились на метаболічному стані організмів тварин. Так, проведений аналіз показників площі (%) ділянок ектопічного остеогенезу визначив, що у щурів 12-місячного віку (донори і реципієнти ККМ – контрольні тварини) площа утвореного в імплантатах остеїду в 2,2 разів менша за площу кісткової тканини в аналогічних імплантатах 6-місячних тварин (6 місяців - $15,7 \pm 1,23$; 12 місяців - $7,2 \pm 0,57$; $P < 0,001$). Ці результати підтверджують дані K.Inoue et al. (1997), які провели дослідження здатності ККМ щурів різного віку до кісткоутворення у пористому ГАП та показали, що з віком остеогенний потенціал ККМ зменшується.

Проведене гістологічне дослідження доводить, що ГАП не є індуктором остеогенезу, бо в порах керамічних імплантатів, насичених живильним середовищем 199 без ККМ, не відбувалося утворення кісткової тканини. Натомість при насиченні ГАП суспензією ККМ контрольних щурів (утриманих на стандартній дієті) спостерігалось формування кісткової тканини у поверхневих порах імплантатів. Отже, в даному експерименті індуктором ектопічного кісткоутворення є ККМ, які виявляють остеогенний потенціал, а ГАП кераміка демонструє властивості кондукції.

Крім цього, біля керамічного матеріалу у щурів-реципієнтів ККМ з 11-місячним аліментарним дефіцитом кальцію виявлені багатоядерні клітини чужорідних тіл. Гіпотетично цей факт може бути пов'язаним з дефіцитом кальцію в організмі щурів, який супроводжується збільшеною резорбцією імплантованого матеріалу, що містить кальцій, для поповнення пулу кальцію в організмі тварин. Також можна припустити, що пригнічення ектопічного остеогенезу та прискорення резорбції керамічного імплантата у дослідних тварин може бути наслідком підвищення рівня ПТГ, яке спостерігається при низькому вмісті кальцію у раціоні харчування.

Таким чином, одержані нами результати свідчать, що такий фактор, як аліментарний дефіцит кальцію, пригнічує остеогенні властивості ККМ у щурів-донорів та викликає зміни метаболічного стану організму у щурів-реципієнтів, проявом чого є менша площа та зрілість ектопічно утвореної кісткової тканини. Негативний вплив цього фактора підсилюється зі збільшенням тривалості низькокальцієвої дієти.

ВИСНОВКИ

В дисертації подано теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання, яке полягає у з'ясуванні в експерименті на щурах впливу аліментарного дефіциту кальцію на морфологічні особливості перебудови кісткової тканини, перебігу репаративної регенерації кістки та прояву остеогенних властивостей клітин кісткового мозку при ектопічній імплантації. Вирішення наукового завдання призначено для удосконалення теоретичної бази цілеспрямованої комплексної розробки методів профілактики та лікування травматичних ушкоджень кісток у пацієнтів з остеопенією та остеопорозом, а також для використання при проведенні подальших наукових досліджень на даній експериментальній моделі.

1. Утримання щурів з 1-місячного віку на низькокальцієвій (0,03%) дієті протягом трьох досліджених термінів (1, 5, 11 місяців) призводить до виникнення комплексу структурних змін у губчастій та компактній кістці, які проявляються переважанням процесів резорбції кісткової тканини над кісткоутворенням. Має місце активізація кісткової резорбції за остеокластичним, остеоцитарним, периканалікулярним та пазушним типами.

2. В умовах аліментарного дефіциту кальцію прояв структурних змін у кістковій тканині має залежність від статі щурів та особливостей будови кістки. Відносна площа *губчастої кістки у самців* дослідної групи зменшена в 1,35; 1,47; 1,19 разів відповідно до вивчених термінів при порівнянні з контрольною групою, у *самиць* її достовірно зменшення (в 1,33 рази) визначається лише після 5 місяців низькокальцієвої дієти. Відносна площа *компактної кістки у самців* зменшена на всіх термінах дослідження відповідно в 1,19; 1,27; 1,26 рази, а у *самиць* - в 1,31 та 1,25 рази на перших двох термінах (1 та 5 місяців). У компактній кістці при 1-місячній дієті у самців зменшена ширина шару зовнішніх генеральних пластин, тоді як у тварин обох статей спостерігається зниження ширини остеонного шару (5-

місячна дієта) та зменшення ширини шару зовнішніх генеральних пластин (11-місячна дієта).

3. У щурів зі змодельованим кістковим дефектом після 5-місячної низькокальцієвої дієти спостерігається затримка переходу стадії травматичного запалення у стадію диференціювання клітин та формування тканинноспецифічних структур. Через 3 доби після операції у зоні дефекту зменшена в 1,9 раза кількість макрофагів та в 6,1 раза фібробластів на фоні підвищеної в 2,9 раза кількості нейтрофілів при порівнянні з контролем. Ультраструктурна будова макрофагів свідчить про їх знижену фагоцитарну та секреторну активність.

4. В умовах аліментарного дефіциту кальцію у кістковому регенераті через 28 діб після травматичного ушкодження виявляється пригніченість процесів кісткоутворення та кісткового ремоделювання, про що свідчить збільшена в 1,8 раза площа фіброретикулярної тканини та зменшена в 1,2 раза площа пластинчастої кістки.

5. Низькокальцієва дієта впродовж 5 місяців пригнічує остеогенні властивості клітин кісткового мозку у щурів, що проявляється меншою в 1,5 раза площею кісткової тканини, утвореної після трансплантації клітин в ектопічну ділянку. У щурів після 11-місячного аліментарного дефіциту кальцію ектопічного кісткоутворення не виявлено.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО НАУКОВОГО ТА ПРАКТИЧНОГО ВИКОРИСТАННЯ ОТРИМАННИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Нові знання, отримані при виконанні дослідження, доповнюють існуючі знання про структурні зміни кісткової тканини та репаративну регенерацію кістки в умовах аліментарного дефіциту кальцію. Результати роботи можуть бути використані у науково-експериментальних дослідженнях опорно-рухової системи, а також рекомендовані для

включення в спецкурси з цитології, гістології, патології кісткової тканини в біологічних та медичних вищих навчальних закладах.

2. Отримані експериментальні дані щодо негативного впливу аліментарного дефіциту кальцію на структуру кісткової тканини, а також на репаративний остеогенез є теоретичним підґрунтям для поглибленої та цілеспрямованої розробки комплексних заходів і методів профілактики остеопенії та остеопорозу, а також розвитку дисрегенерації при відновленні травмованих кісток у пацієнтів та у тварин, що актуально для травматології, ветеринарної медицини та біології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аврунин А.С. Позиционные регуляторы костной ткани – основа ауторегуляторного механизма развития и воспроизведения остеогенеза / А.С.Аврунин, Н.В.Корнилов, А.В.Суханов // Морфология. – 1998. – Т.144, № 4. – С. 7-12.
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия : [руководство] / Г.Г.Автандилов. - М. : Медицина, 1990. - 384 с.
3. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека / В.С.Астахова.- К.: Феникс, 2000.- 176 с.
4. Белоцкий С.М. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты / С.М.Белоцкий, Р.Р.Авталион. - М. : БИНОМ, 2008. - 240 с.
5. Бенгус Л.М. Влияние магния, иприфлафона и кальция на состояние костной ткани крыс в условиях низкокальциевой диеты / Л.М.Бенгус // Проблеми остеології. - 2002. - Т. 5, № 2-3. - С. 29-32.
6. Бенгус Л.М. Морфология губчатой и компактной костной ткани при нарушении метаболизма кальция и направленной остеотропной терапии / Л.М.Бенгус // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т. 7, № 4. – С. 137-139.
7. Бенгус Л.М. Ремоделирование губчатой костной ткани при алиментарном дефиците кальция и на фоне длительного применения глюкокортикоидов / Л.М.Бенгус // Український морфологічний альманах. – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 10-13.
8. Билич Г.Л. Фармакологическая регуляция регенерации – итоги и перспективы / Г.Л.Билич // Морфология. - 1996. - Т. 109, № 2. - С. 35.
9. Богатов В.Н. Распределение минеральных солей в структурах компактного вещества кости человека / В.Н.Богатов, Ю.И.Денисов-Никольский // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1977. - Т.73, № 12. - С. 61-68.

10. Бруско А.Т. Функциональная перестройка костей и ее клиническое значение : монография / А.Т.Бруско, Г.В.Гайко. - Луганск: Луганский государственный медицинский университет, 2005.- 212 с.
11. Бутенко Г.М. Остеопороз и иммунная система / Г.М.Бутенко // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение: [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 5. – С. 55-59.
12. Верховський В.В. Репаративний остеогенез при переломах довгих кісток у осіб, що постраждали від аварії на ЧАЕС (експериментальне та клінічне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.21 «Травматологія та ортопедія» / В.В.Верховський. – Київ, 2006. – 16 с.
13. Виноградова Т.П. Регенерация и пересадка костей / Т.П.Виноградова, Г.И.Лаврищева. – М. : Медицина, 1974. – 247 с.
14. Витамин D и костная система : монография / [В.Г.Гайко, Ан.В.Калашников, А.Т.Бруско и др.]. - К. : Книга плюс, 2008. - 176 с.
15. Возможности использования стволовых стромальных клеток в регенерации тканей пародонта и их взаимодействие с тканевым микроокружением / М.Д.Перова, М.Г.Шубич, В.Б.Карпюк [и др.] // Морфология. - 2007. - Т. 131, № 3. - С. 45-49.
16. Возрастные изменения количества стромальных клеток-предшественников в костном мозге животных / О.В.Лебединская, Ю.Ф.Горская, Е.Ю.Шуклина [и др.] // Морфология. – 2004. - № 6. – С. 46–49.
17. Воспаление : [руководство для врачей] / под ред. В.В.Серова, В.С.Паукова. – М. : Медицина, 1995. – 640 с.
18. Гамбарян П.П. Крыса / П.П.Гамбарян, Н.М.Дукельская. - М. : Сов. наука, 1955. – 254 с.
19. Гистология (введение в патологию) : учебник [для студентов медицинских вузов] / [Н.В.Бойчук, Р.Р.Исламов, Э.Г.Улумбеков,

- Ю.А.Челышев] ; под ред. Э.Г.Улумбекова, Ю.А.Челышева. – М. : ГЭОТАР, 1997. - 960 с.
20. Гистология, цитология и эмбриология : атлас : учебное пособие / О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, Т.К.Дубовая и др. [под ред. О.В.Волковой, Ю.К.Елецкого]. – М. : Медицина, 1996. - 544 с.
 21. Гистология, цитология, эмбриология : справочник / [В.Д.Новиков, Г.В.Правоторов]. - М. : Изд-во ЮКЭА, 2003. - 336 с.
 22. Гололобов В.Г. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон / В.Г.Гололобов, Р.В.Деев // Морфология. - 2003. - Т. 123, № 1. - С. 9-19.
 23. Горская Ю.Ф. Возрастные изменения в популяции индуцибельных остеогенных клеток-предшественников / Ю.Ф.Горская, Е.Ю.Шуклина, В.Г.Нестеренко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2002. - № 2. - С. 180-182.
 24. Григорьев А.И. Принципы организации обмена кальция / А.И.Григорьев, И.М.Ларина // Успехи физиологических наук. - 1992. - Т. 23, № 3. – С. 24-43.
 25. Данилов Р.К. Экспериментально-гистологический анализ гистогенеза и регенерации тканей (некоторые итоги XX века и перспективы дальнейших исследований) / Р.К.Данилов, Т.Г.Боровая, Н.Д.Клочков // Морфология. - 2000. - Т. 117, № 4. - С.7-16.
 26. Дедух Н.В. Гормональные и локальные регуляторы моделирования и ремоделирования кости / Н.В.Дедух, С.В.Малышкина // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение : [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 2. - С. 30-42.
 27. Дедух Н.В. Морфологические особенности репаративного остеогенеза на воспалительно-пролиферативной стадии процесса при алиментарном дефиците кальция / Н.В.Дедух, О.А.Никольченко, Е.Ю.Валенчук //

- Таврический медико-биологический вестник. - 2004. - Т. 7, № 4. - С. 153-155.
28. Дедух Н.В. Регенерация костного дефекта при введении животным препарата остеогенон / Н.В.Дедух, А.М.Дурсунов, С.В.Малишкина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2004. – № 2. – С. 40-45.
 29. Дедух Н.В. Скелетные ткани / Н.В.Дедух, Е.Я.Панков // Руководство по гистологии. В 2 т. Т. 1 / МЗ Российской Федерации ; отв. ред. Р.К.Данилов. – СПб : Спец. лит-ра, 2001. - Глава 7. – С. 284-336.
 30. Дедух Н.В. Экспериментальное моделирование на животных как ступень познания патогенеза остеопороза / Н.В.Дедух, С.В.Малышкина, Л.М.Бенгус // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение : [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 48. – С. 527-538.
 31. Динамика численности костномозговых клеток, образующих колонии фибробластов в культуре, и ее связь с активностью остеогенеза при репаративной регенерации в условиях удлинения конечности / Г.А.Илизаров, Л.А.Палиенко, А.А.Шрейнер, В.С.Богомятков // Онтогенез. – 1983. – Т. 14, № 6. – С. 617-623.
 32. Довідник по годівлі сільськогосподарських тварин / [Г.О.Богданов, В.Ф.Каравашенко, О.І.Зверев та ін.] ; за ред. Г.О.Богданова. - [2-е вид.]. – К. : Урожай, 1986. - 488 с.
 33. Долгушин И.И. Иммунология травмы / И.И.Долгушин, Л.Я.Эберт, Р.И.Лифшиц. – Свердловск : Изд-во Уральского университета, 1989. - 188 с.
 34. Домашевская Е.И. Сравнительная характеристика структуры пластинчатой кости у амфибий, рептилий и млекопитающих в связи с разной опорно-функциональной нагрузкой на конечности / Е.И.Домашевская // Таврический медико-биологический вестник. - 2004.- Т. 7, № 4.- С. 158-163.

35. Егорова И.Ф. Апоптоз и некроз: взаимоотношение явлений / И.Ф.Егорова, Р.А.Серов // Морфология. - 2004.- № 4.- С. 71-75.
36. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року : офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). - Режим доступу до документа : http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137
37. Зайченко И.Л. Элементы к построению управления развитием регенеративного процесса костной ткани и вообще тканей / И.Л.Зайченко. – Львов : Львовское науч.-мед. общ-во ортопедов и травматологов, 1958. – 250 с.
38. Зупанец И.А. Травматическое повреждение костей как фактор риска развития остеопенического синдрома и остеопороза / И.А.Зупанец, Н.В.Дедух, Л.Д.Горидова [и др.] // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение : [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 30. – С. 292-300.
39. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции / Н.А.Корж, Л.А.Кладченко, С.В.Малышкина, И.Б.Тимченко // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2005. - № 4. - С. 118-127.
40. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе / Н.А.Корж, В.А.Радченко, Л.А.Кладченко, С.В.Малышкина // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2003. - № 2. - С. 150-169.
41. Калашніков А.В. Розлади репаративного остеогенезу у хворих із переломами довгих кісток (діагностика, прогнозування, лікування, профілактика) : дис. ... доктора мед. наук : 14.01.21 / Калашніков Андрій Валерійович. – К., 2003. - 284 с.

42. Канадская ассоциация по остеопорозу. Школа для пациентов с остеопорозом. Роль кальция в здоровье костей и рациональное его потребление (зарубежный опыт) / пер. с англ. Т.О.Черновой // Остеопороз и остеопатии. - 1999. - № 2. - С. 36-42.
43. Карупу В.Я. Электронная микроскопия / В.Я.Карупу. - К. : Выща школа, 1984. - 208 с.
44. Клишов А.А. Гистогенез и регенерация тканей / А.А.Клишов. - Л. : Медицина, 1984. - 232 с.
45. Ковалев Д.И. Регуляция обмена кальция в организме человека / Д.И.Ковалев // Проблемы эндокринологии. - 1991. - Т. 37, № 6. - С. 61-66.
46. Ковешников В.Г. Скелетные ткани: хрящевая ткань, костная ткань / В.Г.Ковешников, М.Х.Абакаров, В.И.Лузин ; под ред. В.Г.Ковешникова. – Луганск: Изд-во Луганского госмедуниверситета, 2000.– 154 с.
47. Ковешніков В.Г. Метод морфометричного дослідження та оцінки структурно-функціонального стану кісток / В.Г.Ковешніков, С.А.Кащенко, В.В.Маврич // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. - 2006. – Т. 3, № 2. – С. 59-62.
48. Корж М.О. Чинники ризику, діагностика та лікування порушень репаративного остеогенезу при діафізарних переломах довгих кісток : методичні рекомендації / М.О.Корж, Л.Д.Горидова, К.К.Романенко, Н.В.Дєдх. - Київ, 2005.- 20 с.
49. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации (сообщение 1) / Н.А.Корж, Н.В.Дєдх // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 77-84.
50. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости (сообщение 2) / Н.А.Корж, К.К.Романенко, Л.Д.Горидова // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 84-90.

51. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / [И.П.Западнюк, В.И.Западнюк, Е.А.Захария, Б.В.Западнюк]. - К. : Выща школа, 1983. - 383 с.
52. Лаврищева Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И.Лаврищева, Г.А.Оноприенко. - М. : Медицина, 1996. – 207 с.
53. Лурия Е.А. Культивирование и дифференцировка остеогенных костномозговых клеток-предшественников / Е.А.Лурия, С.А.Кузнецов, Е.Н.Генкина // Методы культивирования клеток. - Л. : Наука, 1988. - С. 276-282.
54. Мажуга П.М. Одноядерные и многоядерные клетки тканевой резорбции и их функциональные особенности / П.М.Мажуга // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29, № 1. – С. 9-18.
55. Международная гистологическая номенклатура / под общ. ред. Ю.Н.Кобаева. - К. : Вища школа, 1980. – 112 с.
56. Микроскопическая техника : руководство / под ред. Д.С.Саркисова, Ю.Л.Перова. - М. : Медицина, 1996. - 544 с.
57. Михайлова Л.Н. К вопросу об остеогенных клетках-предшественниках при репаративном остеогенезе / Л.Н.Михайлова, А.А.Пальцин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1986. - Т. 91, № 6. - С. 755-757.
58. Міжнародна анатомічна номенклатура / за ред. І.І.Бобрика, В.Г.Ковешнікова. – К. : Здоров'я, 2001. – 328 с. – (Український стандарт).
59. Міжнародна гістологічна та ембріологічна номенклатура / за ред. А.Й.Іванової, Ю.Б.Чайковського, О.Д.Луцика. – Львів : Львівський медичний інститут, 1993. – 176 с.
60. Москалев Ю.И. Минеральный обмен / Ю.И.Москалев. - М. : Медицина, 1985. - 288 с.

61. Насонов Е.Л. Дефицит кальция и витамина Д: новые факты и гипотезы (обзор литературы) / Е.Л.Насонов // Остеопороз и остеопатии. - 1998. - № 3. - С. 42-47.
62. Некачалов В.В. Патология костей и суставов. Руководство / В.В.Некачалов. – СПб : Сотис, 2000. - 288 с.
63. Ницевич Т.П. Особенности структуры периоста и эндоста бедренной кости у грызунов и зайцеобразных / Т.П.Ницевич, Е.И.Домашевская // Цитология и генетика. - 1991. - Т. 25, № 1. - С. 5-11.
64. Остеогенные клетки и их использование в травматологии / А.К.Дулаев, В.Г.Гололобов, Р.В.Деев [и др.] // Медицинский академический журнал. - 2003. - Т. 3, № 3.- С. 59-66.
65. Панченко Л.М. Показники остеогенної активності кісткового мозку людини та їх практичне використання : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.21 «Травматологія та ортопедія» / Л.М.Панченко. - К., 1997. - 20 с.
66. Паюшина О.В. Мезенхимальные стволовые клетки: источники, фенотип и потенции к дифференцировке / О.В.Паюшина, Е.И.Домарацкая, В.И.Старостин // Известия РАН. Серия Биология. - 2006. - № 1. - С. 6-25.
67. Поворознюк В.В. Використання нестероїдних протизапальних препаратів у місцевій терапії у хворих різного віку з патологією кістково-м'язової системи : методичні рекомендації / В.В.Поворознюк, І.К.Бабова, Т.В.Орлик. - Київ, 2004. - 29 с.
68. Поворознюк В.В. Фактическое питание и метаболизм костной ткани / В.В.Поворознюк, Н.В.Григорьева, Ю.Г.Григоров, Т.Н.Семесько // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение : [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 38. – С. 410-424.
69. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. –

Офіц. веб-сайт. – Режим доступу до документа :
<http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>

70. Прохончуков А.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии / А.А.Прохончуков, Н.А.Жижина, Р.А.Тигранян // Проблемы космической биологии. - Т.49. - М. : Наука, 1984. - 200 с.
71. Регенерация тел позвонков при пластике кальций-фосфатной керамикой у животных с остеопорозом : материалы 18-й научной конф. гистологов [«Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей»], (Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2004 г.) / Министерство обороны России, отв. ред. Р.К.Данилов. – СПб : Военно-медицинская академия, 2004. – 174 с.
72. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Медикаментозные препараты, оптимизирующие репаративный остеогенез (сообщение 5) / Н.А.Корж, Л.Д.Горидова, Н.В.Дедух, К.К.Романенко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 3. – С. 85-99.
73. Родионова Н.В. Динамика и ультраструктурные особенности образования остеокластов / Н.В.Родионова // Цитология. - 1985. – Т. 27, № 9. – С. 995-1000.
74. Родионова Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе / Н.В.Родионова. – К. : Наукова думка, 1989. – 185 с.
75. Родіонова Н.В. «Чорнобильське забруднення» і остеопороз / Н.В.Родіонова // Вісник НАН України. - 1999. - № 11. - С. 18-22.
76. Родіонова Н.В. Колонієутворення стромальних клітин кісткового мозку щурів *in vitro* після експериментальної гіпокінезії / Н.В.Родіонова, Л.В.Богданович // Український морфологічний альманах. - 2005. - Т. 3, № 1. - С. 53-55.

77. Родіонова Н.В. Цитологічні механізми перебудов у кістках при гіпокінезії та мікрогравітації / Н.В.Родіонова. – К. : Видавництво «Наукова думка» НАН України, 2006. - 239 с.
78. Рожинская Л.Я. Остеопороз: диагностика нарушений метаболизма костной ткани и кальций-фосфорного обмена (лекция) / Л.Я.Рожинская // Клинічна лабораторна диагностика. - 1998. - № 5. - С. 25-32.
79. Рожинская Л.Я. Системный остеопороз (патогенез, диагностика, лечение) : [справочник] / Л.Я.Рожинская. - М. : КРОН-ПРЕСС, 1996. - 208 с.
80. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф.Рокицкий. - Мн. : Высшая школа. – 1973. – 320 с.
81. Савич В.В. Современные материалы хирургических имплантатов и инструментов / В.В.Савич, М.Г.Киселев, А.И.Воронович. – Мн.: Технопринт, 2003. – 119 с.
82. Садофьев Л.А. Дифференцировка остеогенных клеток в культуре / Л.А.Садофьев, О.И.Подгорная // Цитология. - 1999. - Т. 41, № 10. - С.877-884.
83. Справочник по диетологии / под ред. А.А.Покровского, М.А.Самсонова. - М. : Медицина, 1981. - 704 с.
84. Струков А.И. Патологическая анатомия : учебник / А.И.Струков, В.В.Серов. - М. : Медицина, 1995. - 688 с.
85. Сумароков Д.Д. Влияние противовоспалительных препаратов на остеоиндуктивную активность костной ткани / Д.Д.Сумароков, Д.В.Гуткин // Фармакология и токсикология. - 1988. - Т. 51, № 6. - С. 41-42.
86. Суханов А.В. Перестройка костной ткани после нарушения целостности костей / А.В.Суханов, А.С.Аврунин, Н.В.Корнилов // Морфология. - 1997. - Т. 112, № 6. - С. 82-87.
87. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / Б.Уикли. – М. : Мир, 1975. - 325 с.

88. Франке Ю. Остеопороз / Ю.Франке, Г.Рунге; [пер. с нем. А.Ю.Болотиной, Н.М.Мыловой]. - М. : Медицина, 1995. - 304 с.
89. Фриденштейн А.Я. Индукция косной ткани и остеогенные клетки предшественники / А.Я.Фриденштейн, К.С.Лалыкина. - М. : Медицина, 1973. - 224 с.
90. Фриденштейн А.Я. Пролиферативные и дифференциальные потенции скелетогенных костномозговых колониеобразующих клеток / А.Я.Фриденштейн, Р.К.Чайлахян, Ю.В.Герасимов // Цитология. - 1986. - Т. 28, № 3. - С. 341-349.
91. Фролькис В.В. Экспериментальный остеопороз (модели, механизмы развития возрастного остеопороза) / В.В.Фролькис, В.В.Поворознюк, О.О.Евтушенко // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение : [монография] / под ред. Н.А.Коржа, В.В.Поворознюка, Н.В.Дедух, И.А.Зупанца. – Харьков : Золотые страницы, 2002. – Глава 47. – С.512-526.
92. Хенч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инженеринг тканей / Л.Хенч, Д. Джонс; [пер. с англ. Ю.Л.Цвирко]. - М. : Техносфера, 2007. - 304 с.
93. Чобану П.И. Стимуляция остеогенеза костномозговыми клетками при осложненных переломах / П.И.Чобану, Г.И.Лаврищева, А.С.Козлюк. – Кишинев : Штиинца, 1989. - 181 с.
94. Шахов В.П. Мезенхимальные клетки и остеогенез (обзор литературы) / В.П.Шахов, А.В.Карлов, И.А.Хлусов // Гений ортопедии. - 2003. - № 2. - С. 116-121.
95. Шевцов В.И. Морфология травматического воспаления при переломах / В.И.Шевцов, Ю.М.Ирьянов // Гений ортопедии. - 1999. - № 2.- С. 18-23.
96. Шевцов В.И. Морфофункциональная характеристика геморрагий при заживлении костных ран в условиях чрескостного остеосинтеза и в дистракционных регенератах / В.И.Шевцов, Ю.М.Ирьянов, А.Н.Дьячков // Гений ортопедии. - 1999. - № 4. - С. 5-12.

97. Шевцов В.И. Ультраструктурные особенности ангиогенеза при заживлении переломов / В.И.Шевцов, Ю.М.Ирьянов // Гений ортопедии. - 1999. - № 2. - С.13-18.
98. Щепеткин И.А. Кальцийфосфатные материалы в биологических средах / И.А.Щепеткин // Успехи современной биологии. - 1995. - Т. 115, вып. 1. - С. 58-73.
99. Щепеткин И.А. Остеокластическая резорбция кости / И.А.Щепеткин // Успехи современной биологии. – 1996. – Т. 116, № 4. – С. 474-492.
100. A rat osteoporotic spine model for the evaluation of bioresorbable bone cements / M.L.Wang, J.Massie, A.Perry [et al.] // Spine J. - 2007. - Vol. 7, №4. - P. 466-474.
101. A systemic acceleratory phenomenon (SAP) accompanies the regional acceleratory phenomenon (RAP) during healing of a bone defect in the rat / M.Mueller, T.Schilling, H.W.Minne, R.Ziegler // J. Bone Miner. Res. - 1991. - Vol. 6, № 4. - P. 401-410.
102. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cell dynamics / J.P.Rodriguez, S.G.Garat, A.M.Pino [et al.] // J. Cell. Biochem. - 1999. - Vol. 75, № 3. - P. 414-423.
103. Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors / G.F.Muschler, H.Nitto, C.A.Boehm, K.A.Easley // J. Orthop. Res. - 2000. - Vol. 19, № 1. - P. 117-125.
104. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats / R.A.Meyer, P.J.Tsahakis, D.F.Martin [et al.] // J. Orthop. Res. – 2001. – Vol. 19. – P. 428-435.
105. Age-related changes in osteogenic stem cells in mice / R.J.Bergman, D.Gazit, A.J.Kahn [et al.] // J. Bone Miner. Res. - 1996. - Vol. 11. - P. 568-577.

106. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow / G.D'Ippolito, P.C.Schiller, C.Ricordi [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* - 1999. - Vol. 14. - P. 1115-1122.
107. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration / T.Albrektsson, C.Johansson // *Eur. Spine J.* - 2001. - № 10. - P. 96-101.
108. Angus R.M. Nutrition intake of pre- and postmenopausal Austrian women with special reference to calcium / R.M.Angus, N.A.Pocock, J.A.Eisman // *Eur. J. Clin. Nutr.* - 1996. - Vol. 63. - P. 950-953.
109. Armbrecht H.J. Adaptation of middle aged rats to long-term restriction of dietary vitamin D and calcium / H.J.Armbrrecht, L.R.Forte // *Arch. Biochem. Biophys.* - 1985. - Vol. 242, № 2. - P. 464-469.
110. Augat P. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone / P.Augat, U.Simon, A.Liedert // *Osteoporos Int.* - 2005. - Vol. 16. - P. 36-43.
111. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions / J.F.Connolly, R.Guse, J.Tiedeman, R.Dehne // *Clin. Orthop.* - 1991. - Vol. 266. - P. 259-270.
112. Baksh D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy / D.Baksh, L.Song, R.S.Tuan // *J. Cell. Mol. Med.* - 2004. - Vol. 8, № 3. - P. 301-316.
113. Beresford J.N. Osteogenic stem cell and stromal system of bone and marrow / J.N.Beresford // *Clin. Orthop.* - 1989. - Vol. 240. - P. 270-280.
114. Biochemical and histological sequences of membranous ossification in ectopic sites / T.Yoshikawa, H.Ohgushi, M.Okumura [et al.] // *Calcif. Tissue Int.* - 1992. - Vol. 50, № 2. - P. 184-188.
115. Bobis S. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical application / S.Bobis, D.Jarocho, M.Majka // *Folia Histochemica Cytobiologica.* - 2006. - Vol. 44, № 4. - P. 215-230.

116. Bone composition and histological analysis of young and aged rats fed diets of varied calcium bioavailability / C.A.Peterson, J.A.Eurell, K.W.Kelley, J.W.Erdman // J. Am. Coll. Nutr. - 1995. - Vol. 14, № 3. - P. 278-285.
117. Bone deficit in ovariectomized rats. Functional contribution of the marrow stromal cell population and the effect of oral dihydrotachysterol treatment / C.Tabuchi, D.J.Simmons, A.Fausto [et al.] // J Clin. Invest. - 1986. - Vol. 78, № 3. - P. 637-642.
118. Brighton C.T. Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus / C.T.Brighton, R.M.Hunt // J. Orthop. Trauma. - 1997. - Vol. 11, № 4. - P. 244-253.
119. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation / L.Mosekilde, S.E.Weisbrode, J.A.Safron [et al.] // Bone. - 1993. - Vol. 14, № 3. - P. 379-382.
120. Christian C.A. General principles of fracture treatment / C.A.Christian // Campbell's operative orthopaedics ; Ed. S.T.Canale. - 9-th ed. – St Louis: Mosby, 1998. - P.1993-2041.
121. Comparative effects of orchidectomy and sciatic neurectomy on cortical and cancellous bone in young growing rats / J.Iwamoto, T.Takeda, S.Ichimura [et al.] // J. Bone Miner. Metab. - 2003. - Vol. 21. - P. 211-216.
122. Comparative effects of vitamin K and vitamin D supplementation on prevention of osteopenia in calcium-deficient young rats / J.Iwamoto, J.K.Yeh, T.Takeda [et al.] // Bone. - 2003. - Vol. 33, № 4.- P. 557-566.
123. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair / X.Zhang, E.Schwarz, D.Young [et al.] // J. Clin. Invest. - 2002. - Vol. 109, № 11. - P.1405-1415.
124. Derubeis A.R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances / A.R.Derubeis, R.Cancedda // Ann. Biomed. Eng. - 2004. - Vol. 32, № 1. - P. 160-165.

125. Diegelman R.F. The role of macrophages in wound repair: a review / R.F.Diegelman, I.K.Coher, A.M.Kaplan // *Plast. Reconst. Surg.* - 1981. - Vol.68. - P. 107-113.
126. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy / M.Ito, A.Nashida, T.Nakamura [et al.] // *Bone.* - 2002. - Vol. 30. - P. 594-598.
127. Ectopic bone formation in bone marrow stem cell seeded calcium phosphate scaffolds as compared to autograft and (cell seeded) allograft / J.O.Eniwumide, H.Yuan, S.H.Cartmell [et al.] // *Eur. Cells Materials.* - 2007. - Vol. 14. - P. 30-39.
128. Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells / B.A.Huibregtse, B.Johnstone, V.M.Goldberg [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 2000. – Vol. 18, № 1. – P. 18-24.
129. Effect of dietary calcium on bone density in growing rabbits / V.Gilsanz, T.F.Roe, J. Antunes [et al.] // *Am. J. Physiol.* - 1991. - Vol. 260, №3 (1). - P.E471-476.
130. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur / H.Chen, D.Hayakawa, S.Emura [et al.] // *Histol. Histopathol.* – 2002. – Vol. 17, № 4. – P. 1129-1135.
131. Effects of vitamin K2 administration on calcium balance and bone mass in young rats fed normal or low calcium diet / J.Iwamoto, J.K.Yeh, T.Takeda, Y.Sato // *Horm. Res.* - 2005. - Vol. 63, № 5. - P. 211-219.
132. Egermann M. Animal models for fracture treatment in osteoporosis / M.Egermann, J.Goldhahn, E.Schneider // *Osteoporos Int.* - 2005. - № 16. - P.S129-S138.
133. Einhorn T.A. Enhancement of fracture-healing / T.A.Einhorn // *J. Bone Joint Surg.* – 1995. – Vol. 77-A, № 6. – P. 940-956.
134. Einhorn T.A. The cell and molecular biology of fracture healing / T.A.Einhorn // *Clin. Orthop.* - 1998. - Vol. 355. - P. 7-21.

135. Einhorn T.A. The contributions of dietary protein and mineral to the healing of experimental fractures: A biomechanical study / T.A.Einhorn, F.Bonnarens, A.H.Burnstein // *J. Bone Joint Surg.* – 1986. – Vol. 68-A, № 6. – P. 1389-1395.
136. Ekeland A. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats / A.Ekeland, L.B.Engesaeter, N.Langeland // *Acta Orthop. Scand.* – 1982. – Vol. 53. – P. 527-534.
137. Estrogen protection against bone resorbing effects of parathyroid hormone infusion. Assessment by use of biochemical markers / F.Cosman, V.Shen, F.Xie [et al.] // *Ann. Intren. Med.* - 1993. - Vol. 118. - P. 337-343.
138. Experimental osteoporosis in rat induced by hypocalcic diet // U.E.Pazzaglia, G.Zatti, P.Gervaso [et al.] // *J. Orthop. Res.* – 1993. – Vol. 11, № 3. – P. 422-428.
139. Fracture healing in the rat osteopenia model / W.R.Walsh, P.Sherman, C.R.Howlett [et al.] // *Clin. Orthop. Rel. Res.* – 1997. – Vol. 342. – P. 218-227.
140. Frost H.M. The biology of fracture healing. An overview for clinicians / H.M.Frost // *Clin. Orthop.* – 1989. – Vol. 248. – P. 283-309.
141. Geng W. Skeletal sensitivity to dietary calcium deficiency is increased in the female compared with the male rat / W.Geng, G.L.Wrighth // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* - 2001. - Vol. 79, № 5. - P. 379-385.
142. Goshima J. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells / J.Goshima, V.M.Goldberg, A.I.Caplan // *Clin. Orthop.* - 1991. - Vol. 269. - P. 274-283.
143. Harlan Teklad Global Diets® [Электронный ресурс]. – Режим доступа до сайта: <http://www.teklad.com/global.asp>
144. Heise U. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute / U.Heise, J.Osborn, F.Duwe // *Int. Orthop.* - 1990. - Vol. 14. - P. 329-338.

145. Hernigou P. Autologous bone marrow graft for patients presenting non unions / P.Hernigou, F.Beaujean // *Rev. Chir. Orthop.* - 1997. - Vol. 83. - P.495-504.
146. Hill E.L. Ovariectomy impairs fracture healing after 21 days / E.L.Hill, K.Kraus, K.P.Lapierre // *Trans. Orthop. Res. Soc.* - 1995. - Vol. 20. - P. 230.
147. Hotzel D. The contribution of nutrition to the pathogenesis of osteoporosis / D.Hotzel, A.Zittermann // *Z. Ernährungswiss.* - 1989. - Bd. 28, № 1. - S. 17-31.
148. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape / M.H.Mankani, S.A.Kuznetsov, B.Fowler [et al.] // *Biotechnol. Bioeng.* - 2001. - Vol. 72. - P. 96-107.
149. In vivo osteogenic capability of cultured allogeneic bone in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of FK506 in vivo / T.Yoshikawa, H.Nakajima, E.Yamada [et al.] // *J. Bone Mineral Res.* - 2000. - Vol. 15. - P. 1147-1157.
150. Increased adipogenesis and myelopoiesis in the bone marrow of SAMP6, a murine model of defective osteoblastogenesis and low turnover osteopenia / O.Kajkenova, B.Lecka-Czernik, I.Gubrij [et al.] // *J. Bone Miner. Res.* - 1997. - Vol. 12. - P. 1772-1779.
151. Influence of inflammation-mediated osteopenia on the regional acceleratory phenomenon and the systemia acceleratory phenomenon during healing of a bone defect in the rat / T.Schilling, M.Muller, H.W.Minne [et al.] // *Calcif. Tissue Int.* - 1998. - Vol. 63, № 2. - P. 160-166.
152. Joos U.E. Mesenchymal cell and osteoblasts: cytokines promote a shuttle mechanism of osteogenesis versus hematopoiesis / U.E.Joos, E.M.Schneider, K.H.Schmidt // *Calcified Tissue Int.* - 1989. - Vol. 44, suppl. - P. 41.
153. Kunkel M.E. Comparison of chemical, histomorphometric, and absorptiometric analyses of bones of growing rats subjected to dietary calcium stress / M.E.Kunkel, D.L.Powers, N.G.Hord // *J. Am. Coll. Nutr.* - 1990. - Vol. 9, № 6. - P. 633-640.

154. LabDiet® [Электронный ресурс]. – Режим доступа до сайта: http://www.labdiet.com/products_frm.htm
155. Lead exposure inhibits fracture healing and is association with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency / J.J.Carmouche, J.E.Puzas, X.Zhang [et al.] // Environ. Health Perspect. - 2005. - Vol. 113, № 6. - P. 749-755.
156. Lee E.H. The potential of stem cells in orthopaedic surgery / E.H.Lee, J.H.Hui // J. Bone Joint. Surg. – 2006. – Vol. 88-B, № 7. – P. 841-851.
157. Lieberman J.R. The role of growth factors in the repair of bone / J.R.Lieberman, A.Daluiski, T.A.Einhorn // J. Bone Joint Surg. - 2002. - V. 84-A, № 6. - P. 1032-1044.
158. Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats / Y.Jiang, J.Zhao, H.K.Genant [et al.] // J. Bone Miner Res. - 1997. - Vol. 12. - P. 820-831.
159. Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that induce bone morphogenetic protein-2 / C.M.Champagne, J.Takebe, S.Offenbacher, L.F.Cooper // Bone. - 2002. - Vol. 30, № 1. – P. 26-31.
160. Mechanical loading attenuates bone loss due to immobilization and calcium deficiency / C.L.Inman, G.L.Warren, H.A.Hogan [et al.] // J. Appl. Physiol. – 1999. – Vol. 87, № 1. – P. 189-195.
161. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine / S.-K.Tae, S.-H.Lee, J.-S.Park, G.-I.Im // Biomed Mater. - 2006. - № 1. - P. 63-71.
162. Nordin B.E. The calcium deficiency model for osteoporosis / B.E.Nordin, H.A.Morris // Nutrition Reviews. - 1989. - Vol. 47, № 3. - P. 65-72.
163. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease / A.M.Sattler, M.Schoppet, J.R.Schaefer, L.C.Hofbauer // Calcif. Tissue Int. - 2004. - Vol. 74. - P. 103-106.

164. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis / K.Stenderup, J.Justesen, E.F.Eriksen [et al.] // J. Bone Miner. Res. - 2001. - Vol. 16, № 6. - P. 1120-1129.
165. Ohgushi H. Heteropotic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells / H.Ohgushi, V.M.Goldberg, A.I.Caplan // J. Orthop. Res. – 1989. – Vol. 7, № 4. – P. 568-578.
166. Ohgushi H. Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics / H.Ohgushi, M.Okumura // Acta Orthop. Scand. – 1990. – Vol. 61, № 5. – P. 431-434.
167. Oni O.O. The early stages of the repair of adult human diaphyseal fracture / O.O.Oni // Injury. - 1997. - Vol. 28, № 8. - P. 521-525.
168. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model // H.Namkung-Matthai , R.Appleyard, J.Jansen [et al.] // Bone. - 2001. - Vol. 28, № 1 .- P. 80-86.
169. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet / T.Kubo, T.Shiga, J.Hashimoto [et al.] // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. - 1999. - Vol. 68. - P. 197-202.
170. Parathyroid hormone-induced in fetal rat limb bones is associated with production of the metalloproteinase collagenase and gelatinase B / J.P.Witty, S.A.Foster, G.P.Stricklin [et al.] // J. Bone Miner. Res. - 1996. - Vol. 11. - P.72-78.
171. Partial characterization of rat marrow stromal cells / D.J.Simmons, P.Seitz, L.Kidder [et al.] // Calcif. Tissue Int. - 1991. - Vol. 48, № 5. - P. 326-334.
172. Pecker R.R. Prevention of osteoporosis: calcium nutrition / R.R.Pecker // Osteoporos Int. - 1993. - № 3, suppl. 1. - P. 163-165.
173. Pluripotential mesenchymal cells repopulate bone marrow and retain osteogenic properties / G.A.Dahir, Q.Cui, P.Anderson [et al.] // Clin. Orthop. - 2000. - Vol. 379, Suppl. - P. 134-145.

174. Regulation of osteoblast levels during bone healing / M.L.Olmedo, P.S.Landry, K.K. Sadasivan [et al.] // J. Orthop. Trauma. - 1999. - Vol. 13, №5. - P. 356-362.
175. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells / R.Querto, M.Mastrogiacomo, R.Cancedda [et al.] // N. Engl. J. Med. - 2001. - Vol. 344. - P. 385-386.
176. Response of cortical and cancellous bones to mild calcium deficiency in young growing female rats: a bone histomorphometry study / J.Iwamoto, T.Takeda, Y.Sato, J.K.Yeh // Exp. Anim. - 2004. - Vol. 53, № 4. - P. 347-354.
177. Saotome K. Bone resorption under the influence of parathyroid hormone in vitro / K.Saotome, T.Hoshino, T.Harada // J. Jap. Orthop. Assoc. - 1982. - Vol. 56. - P. 777-789.
178. Siasson H.A. Mechanism of bone resorption in calcium-deficient rats / H.A.Siasson, G.J.Kelmar, G.Marroti // Calcif. Tissue Int. - 1984. - Vol. 36, № 6. - P. 711-721.
179. Simmons D.J. Fracture healing perspectives / D.J.Simmons // Clin. Orthop. Rel. Res. - 1995. - Vol. 200. - P. 100-113.
180. Simpson A.H. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing / A.H.Simpson, L.Mills, B.Noble // J. Bone Joint Surg. - 2006. - Vol. 88-B, № 6. - P. 701-704.
181. Skeletal response to dietary calcium in a rat model simulating weightlessness / R.K.Globus, D.D.Bikle, B.Halloran, E.Morey-Holton // J. Bone Miner. Res. - 1986. - Vol. 1, № 2. - P. 191-197.
182. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss / D.N.Kalu, C.C.Liu, R.R.Hardin [et al.] // Endocrinology. - 1989. - Vol. 124, № 1. - P. 7-16.
183. The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histological analysis / K.Inoue, H.Ohgushi, T.Yoshikawa [et al.] // J. Bone Miner. Res. - 1997. - Vol. 12, № 6. - P. 989-994.

184. Trabecular bone turnover, bone marrow cell development, and gene expression of bone matrix proteins after low calcium feeding in rats / H.Seto, K.Aoki, S.Kasugai, K.Ohya // *Bone*. - 1999. - Vol. 25, № 6. - P. 687-695.
185. Tuan R.S. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering / R.S.Tuan, G.Boland, R.Tuli // *Arthritis Res. Ther.* - 2003. - Vol. 5, № 1. - P. 32-45.
186. Turner A.S. Animal models of osteoporosis - necessity and limitations / A.S.Turner // *Eur. Cells Materials*. - 2001. - Vol. 1. - P. 66-81.
187. Two cell lines from marrow that differ in terms of collagen synthesis, osteogenic characteristics, and matrix mineralization / D.R.Diduch, M.R.Coe, C.Joyner [et al.] // *J. Bone Joint Surg.* - 1993. - Vol. 75-A, № 1. - P. 92-105.
188. Webb J. A review of fracture healing / J.Webb, J.Tricker // *Cur. Orthop.* - 2000. - Vol. 14. - P. 457-463.
189. Yoon S.T. Osteoinductive molecules in orthopedics: basic science and preclinical studies / S.T.Yoon, S.D.Boden // *Clin. Orthop.* - 2002. - Vol. 395. - P. 33-43.

ДОДАТКИ

№ з/п	Назва продукту харчування	100 гр. продукту					Вітамін D, МО/г	КОНТРОЛЬНА ГРУПА							ДОСЛІДНА ГРУПА						
		Са, мг	Р, мг	Білки, г	Жири, г	Вуглеводи, г		Продукт, г	Са, мг	Р, мг	Білки, г	Жири, г	Вуглеводи, г	Вітамін D, МО/г	Продукт, г	Са, мг	Р, мг	Білки, г	Жири, г	Вуглеводи, г	Вітамін D, МО/г
1	Хліб житній	21	87	4,7	0,7	49,8	0	10	2,1	8,7	0,47	0,07	4,98	0	---	---	---	---	---	---	---
2	М'ясо II категорії	10	210	20,2	7,0	0	0,13	10	1,0	21,0	2,02	0,7	0	0,013	---	---	---	---	---	---	---
3	Молоко згущене	307	219	7,2	8,5	58,3	0	4	12,28	8,76	0,288	0,34	2,332	0	---	---	---	---	---	---	---
4	Молоко пастериз.	121	91	2,8	3,2	4,7	0,02	5	6,05	4,55	0,14	0,16	0,235	0,001	---	---	---	---	---	---	---
5	Сир голландський	1000	544	23,4	30,0	0	0	5	50,0	27,2	1,17	1,5	0	0	---	---	---	---	---	---	---
6	Творог	95	130	12,0	8,5	3,3	0	5	4,75	6,5	0,6	0,425	0,165	0	---	---	---	---	---	---	---
7	Морква	51	55	1,3	0,1	9,3	0	6	3,06	3,3	0,078	0,006	0,558	0	10	5,1	5,5	0,13	0,01	0,93	0
8	Буряк	37	43	1,7	0	10,8	0	---	---	---	---	---	---	---	10	3,7	4,3	0,17	0	1,08	0
9	Капуста	48	31	1,8	0	5,4	0	6	2,88	1,86	0,108	0	0,324	0	20	9,6	6,2	0,36	0	1,08	0
10	Гарбуз	40	25	1,0	0	6,5	0	---	---	---	---	---	---	---	20	8,0	5,0	0,2	0	1,3	0
11	Яблука	10	6	0,2	0	24	0	---	---	---	---	---	---	---	18	1,8	1,08	0,036	0	4,32	
12	Сало свиняче	0	0	1,6	82,1	0	0	---	---	---	---	---	---	---	1,5	0	0	0,024	1,232	0	0
13	Овес	12	35	11,27	4,48	58	0	---	---	---	---	---	---	---	10	1,2	3,5	1,127	0,448	5,8	0
14	Ячмінь	6	34	10,72	1,86	67,2	0	---	---	---	---	---	---	---	10	0,6	3,4	1,072	0,186	6,72	0
15	Крупа вівсяна	64	361	11,9	5,8	65,4	0	20	12,8	72,2	2,38	1,16	13,08	0	---	---	---	---	---	---	---
16	Комбікорм	125	80	13,2	3,6	5,5	0,0072	20	25	16	2,64	0,72	1,1	0,00144	---	---	---	---	---	---	---
17	Борошно кісткове	2650	1400	0	0	0	0	4,5	119,25	63	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---
18	Карбонат кальцію	38000	0	0	0	0	0	0,5	190	0	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---
19	Фосфат кальцію	23000	17000	0	0	0	0	3,5	805	595	0	0	0	0	---	---	---	---	---	---	---
20	Сіль	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
21	Ергокальциферол®	0	0	0	99,8	0	58140	0,004	0	0	0	0,00399	0	232,58	0,004	0	0	0	0,00399	0	232,56
Всього								100	1234,2	828,07	9,89	5,09	22,77	232,6	100	30,00	28,98	3,119	1,88	21,23	232,6
									1,2%	0,8%	10%	5%	23%		0,030%	0,029%	3%	2%	21%		

Додаток А
Вміст кальцію та інших хімічних компонентів у раціоні харчування шурів