

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, а саме до травматології та ортопедії, і може бути використана для оцінки активності остеорепарації при дії різних екзогенних чинників, як стимулюючих остеогенез, так і пригнічуючих цей процес.

Використання корисної моделі, що пропонується, дасть можливість не тільки розкрити механізми перебігу репаративного остеогенезу під впливом досліджуваних факторів. Модель дозволить оптимізувати умови експерименту за рахунок виключення дії на остеорепаративний процес ендогенних факторів організму тварин (вікових змін, імунного, метаболічного та ендокринного стану тварини). Використання запропонованої моделі сприятиме розробці ефективних методів медикаментозної корекції (оптимізації) репаративного остеогенезу, що дасть можливість скоротити терміни остеорепарації і, як результат, зменшити терміни перебування хворого у стаціонарі.

Відомий спосіб визначення регенераторних можливостей кісткової тканини, який реалізується за допомогою моделі, котра має клітини кісткового мозку, виділені з губчастої кістки досліджуваного суб'єкта, які культивують на ксеногенному фідерному шарі клітин кісткового мозку щурів. Вираженість репаративних потенцій суб'єкта оцінюють в моделі за числом та розмірами сформованих колоній клітин у різні терміни дослідження. Додатково враховують фенотип клітин у колоніях (фібробласти або клітини з високим остеогенним потенціалом), а також наявність кристалів кальцію (у пізні терміни культивування) [Астахова В.С. Определение регенераторных возможностей костной ткани ортопедических больных путем клонирования остеогенных клеток-предшественников костного мезга //Материалы 10-го съезда травматологов-ортопедов Украины, Одеса, 1987. - Ч.2. - С.22-24].

Позитивною якістю даної моделі є те, що дослідження виконується у культурі клітин, що дозволяє провести оцінку потенцій остеорепарації у короткі терміни. До недоліків моделі необхідно віднести те, що виділення клітин кісткового мозку у суб'єкта супроводжується додатковим болісним втручанням. Негативним також є те, що додатково необхідно мати спеціально підготовлені фідерні клітини, а добре відомо, що тип клітин у фідері та методика підготовки фідера (до речі - дуже громіздка) впливають на утворення колоній при культивуванні клітин кісткового мозку. Крім того, негативним також є те, що ця модель не дозволяє вивчати та оцінювати вплив різних факторів (як стимулюючих репаративний процес, так і пригнічуючих його) на формування самого регенерату з його початкових етапів - утворення клітинної бластими, щільність клітин у котрій та клітинний склад відіграють значну роль у формуванні повноцінного кісткового регенерату.

Відомий спосіб визначення активності процесу кісткоутворення, який полягає у створенні моделі культури клітин шляхом видалення з кістки інтактною тварини кісткового мозку та культивування його клітин у присутності сироватки хворого. При культивуванні формуються колонії фіброblastів, які у подальшому підраховують і порівнюють з кількістю утворених колоній в контрольній культурі [А.с. 1173990А, SU, А61В10/00, 1983].

Позитивними якостями даної моделі є те, що вона дозволяє оцінити репаративні потенції самого хворого, а також те, що застосований для дослідження кістковий мозок беруть не у пацієнта (тобто виключається додаткове травматичне ушкодження), а у інтактних тварин.

До недоліків даної моделі можна віднести те, що для оцінки репаративних потенцій залучають вивчення колонії фіброblastів, сформовані під час культивування клітин кісткового мозку, а не остеогенних клітин - остеобlastів, що може вносити суттєву помилку в зроблені висновки, щодо активності репаративного остеогенезу. Крім того, до недоліків даного способу можна також віднести і те, що дана модель, як і попередня, не дозволяє дослідити формування тканинного регенерату, а також вплив на його утворення різних екзогенних факторів, на що в основному й спрямована запропонована авторами модель.

За сукупністю ознак найбільш близька за технічним рішенням до запропонованої моделі модель, яка передбачає дослідження остеорепаративного процесу у наскрізному дірчастому дефекті, який виконано у губчастій кістці живої тварини [Зайченко І.Л. Элементы к построению управления развитием регенеративного процесса костной ткани и вообще тканей //Львов, 1958. - 236с]. Модель має позитивні сторони, а саме- дозволяє об'єктивно з використанням морфометричних засобів оцінити формування регенерату у дірчастому дефекті на всіх етапах його формування. При цьому може бути досліджено вплив різних факторів на перебіг репаративного остеогенезу.

Проте і згадана модель має недоліки. Саме використання у даній моделі дорослих тварин, для вивчення перебігу репаративного остеогенезу в умовах дії різних екзогенних факторів, можна розглядати як один із значних його недоліків, бо при виконанні досліджень на рівні організму на перебіг репаративного остеогенезу, поряд з впливом досліджуваних чинників, чинять дію і фактори самого організму тварин - стан його імунної системи та метаболізму, тип харчування, вік тварин та інше, що може змінювати об'єктивну картину дії екзогенних чинників. Тенденцією теперішнього дня у наукових дослідженнях є виключення тварин із експериментів і заміна таких експериментів альтернативними (культура клітин чи тканин), тому використання тварин у експерименті також можна вважати вадою даної моделі. При цьому дослідження на тваринах потребує значної їх кількості та часу для одержання вірогідних висновків - це довготривалі експерименти.

В основу корисної моделі поставлено задачу створення моделі, яка б давала можливість об'єктивно у короткий термін оцінити активність формування репаративної клітинної бластими (щільність клітин та їх фенотип), а також морфологію новоутворених тканин, що дозволило б зробити висновок про наявність та активність остеорепаративного процесу, з виключенням дії на остеорепарацію факторів організму (імунного та метаболічного стану), факторів харчування та інших небажаних чинників.

Поставлена задача вирішується тим, що в моделі для визначення *in vitro* впливу екзогенних факторів на остеорепаративний процес, котра має кістку, в якій виконано дірчастий дефект і котру культивують за методом органної культури, згідно корисної моделі, використовують компактно кістку новонародженого щура.

Впродовж термінів культивування у дірчастому дефекті кістки формується регенерат, структуру якого досліджують. Модель дозволяє проаналізувати не тільки потенції кісткової тканини до репарації і активність цього процесу, але й дає можливість вивчати вплив на остеорепарацію різних екзогенних чинників - як стимуляторів

остеогенезу, так і тих які пригнічують його активність. Тобто запропоновану модель можна використовувати для дослідження нових лікарських препаратів, скринінгу нових біоматеріалів - замінників кісткової тканини та інш.

Запропонована модель створюється для оцінки впливу різних екзогенних факторів на перебіг остеорепаративного процесу наступним чином. У новонародженого щура (в стерильних умовах) вилучають компактну кістку (тазову, черепа чи нижньої щелепи) і зубним бором (діаметром 1,5мм) у стерильних умовах виготовляють дірчастий дефект. Кістку розміщують на покрівне скельце у чашці Петрі, додають живильне середовище (4мл середовища 199, 0,5мл 10% телячої сироватки, антибіотики) і культивують за методом органної культури - це контрольна культура, з якою порівнюють результати дослідних культур. Дослідні культури відрізняються від контрольної тим, що у живильне середовище додають досліджуваний фактор і культивують кістку аналогічно контролю.

Результати дії чинника аналізують у різні терміни, щоб дослідити його вплив на різні стадії формування регенерату (3, 5, 7, 9, 15 діб), що також обумовлюється завданням експерименту.

Для дослідження фрагмент кістки вилучають із живильного середовища, готують гістологічні зрізи, котрі фарбують і аналізують сформований регенерат у дірчастому дефекті. Насамперед звертають увагу на щільність клітин у ньому, їх фенотип та біосинтетичну активність, морфологію новоутворених тканин, застосовуючи різні методи дослідження (гістологічні, морфометричні, гістохімічні, електронномікроскопічні, імуногістохімічні та інш.).

За результатами аналізу формується висновок, щодо активності репарації у дірчастому дефекті при порівнянні з контролем.

Приклад 1. Завданням експерименту є дослідження дії на репаративний остеогенез препарату тимоген, який стимулює імунну систему організму.

У новонароджених щурят в стерильних умовах вилучають тазову кістку і моделюють в ній зубним бором (1,5мм) дірчастий дефект. Кістку розміщують на покрівному скельці у чашці Петрі і додають 10мл живильного середовища 199; 0,5мл ембріональної телячої сироватки; 0,1мл суміші пеніцилін натрієвої солі та стрептоміцин сульфату. У дослідні культури додатково додають (впродовж 7 діб) тимоген у дозі 1мкг/мл (розрахунок дози - із літератури). Зразки кісток культивують при 37°C. Дослідження формування регенерату у дірчастому дефекті культивованих кісток виконують на 7 добу культивування, коли у контролі закінчується проліферативна фаза формування клітинної бластери і спостерігається активне диференціювання клітин у остеогенному напрямку. Виготовлені гістологічні зрізи забарвлюють гематоксиліном і еозином і досліджують у світловому мікроскопі.

Встановлено, що у дефектах кісток контрольних культур на 7-у добу культивування спостерігається щільний шар клітин різного диферону. По краю дефекта розташовуються остеогенні клітини, про що свідчить їх морфологія - крупні, округлі клітини з базofilною цитоплазмою та ексцентрично розташованим невеликим ядром з гіпохромним хроматином. Розміри території, на якій розташовуються такі клітини - 57,5% від території дефекта. Морфометричні дослідження виконували за методом Автанділова Г.Г. при використанні морфометричної сітки. У центральній частині дефекта виявлялися переважно клітини фібробластичного диферону та мало диференційовані клітини.

При аналізі дослідних культур (з тимогеном) встановлено, що в дефекті виявлялися аналогічні контрольним культурам клітини. Проте площа остеогенних клітин була дещо більшою - 62,1%. В центральній частині відмінностей у складі клітин від контролю не встановлено. Щільність клітин по території дефекту (при підрахунку кількості клітин у полі зору мікроскопа) також не відрізнялася від контролю.

Висновок - тимоген не чинить негативної дії на проліферацію та диференціювання клітин репаративної бластери. Збільшення території остеогенних клітин є незначним і не може свідчити про стимулюючу дію.

Приклад 2. Завданням експерименту є дослідження дії на репаративний остеогенез шкідливого фактору алкоголю. У дослідну культуру додавали (протягом 7-й діб) алкоголь (спирт етиловий 96°) у дозі 10мкг/мл.

Аналіз результатів культивування кістки з алкоголем показав, що на 7-му добу в дефекті виявлялися скупчення пре- та остеобластів по краю дефекта і значні за розмірами території клітин фібробластичного диферону, малодиференційованих, ретикулярних клітин, макрофагів, що значно відрізняло морфологію дефекта від контролю. Територія, на якій розташовувалися клітини остеобластичного диферону дорівнювала 37,2%, тобто була у 1,55 разів меншою за таку у контролі. Диферонний склад клітин центральної частини дефекту значно менші території клітин остеобластичного диферону свідчить про порушення у стадії проліферації, що призвело до відставання стадій диференціювання клітин.

Висновок. Алкоголь у дозі 10мкг/мл негативно впливає на перебіг остеорепаративного процесу, а саме затримує проліферацію кліти, що призводить до затримки диференціації клітин у остеогенному напрямку. Порушення проліферативної стадії та диференціації клітин буде негативно впливати на подальші стадії репаративного процесу.