

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Нікольченко Ольга Анатоліївна

УДК 616.71-003.93:546.41:578.08

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

03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2009

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Державній установі «Інститут патології хребта та суглобів
ім. проф. М.І. Ситенка АМН України»

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
ДЄДУХ Нінель Василівна
Державна установа «Інститут патології хребта та суглобів
ім. проф. М.І.Ситенка АМН України»
завідувач лабораторії морфології сполучної тканини

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
РОДІОНОВА Наталія Василівна
Інститут зоології ім. І.І.Шмальгаузена НАН України,
завідувач відділу цитології та гістогенезу

доктор біологічних наук, професор
НОВАК Віталій Петрович
Білоцерківський національний аграрний університет,
перший проректор, завідувач кафедри анатомії та гістології
ім. П.О.Ковальського

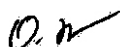
Захист дисертації відбудеться **”28” жовтня 2009 року** о **16⁰⁰** годині на засіданні спеціалізованої
вченої ради Д 26.001.38 Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м.
Київ, пр. акад. Глушкова, 2, біологічний факультет, ауд. 215).

Поштова адреса: 01033, м. Київ - 33, вул. Володимирська, 64, біологічний факультет.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського національного університету імені
Тараса Шевченка (01033, м. Київ - 33, вул. Володимирська, 58).

Автореферат розісланий **”26” вересня 2009 р.**

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Цимбалюк О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А., 1996; Некачалов В.В., 2000; Корж Н.А., Дедух Н.В., 2006).

На сьогоднішній день накопичений значний обсяг знань стосовно закономірностей репаративного остеогенезу. Встановлено, що порушення репаративної регенерації кістки можуть викликати різні чинники, до яких належать і попередні захворювання, пов'язані з порушенням структурно-функціонального стану кісткової тканини, зокрема, остеопороз (Калашніков А.В., 2003; Корж Н.А. и др., 2006). Низький вміст кальцію у раціоні харчування теж сприяє виникненню структурних порушень кістки, що доведено численними експериментальними та клінічними дослідженнями (Pecker R.R., 1993; Корж Н.А. и др., 1999; Дедух Н.В. и др., 2002; Chen H. et al., 2002; Iwamoto J. et al., 2004).

Епідеміологічні дані свідчать про недостатній вміст кальцію у раціоні харчування як дорослого, так і дитячого населення різних регіонів України (Поворознюк В.В. и др., 2002), а також багатьох країн світу (Hotzel D. et al., 1989; Angus R.M. et al., 1996). 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 (Пикалюк В.С. та ін., 1998; Сикора В.З. и др., 1998; Родіонова Н.В., 1999; Поворознюк В.В. и др., 2002; Carmouche J.J. et al., 2005; Верховський В.В., 2006).

Відомо, що у експериментальних тварин на фоні модельованого аліментарного дефіциту кальцію спостерігається порушення перебігу остеорепації (Kubo T. et al., 1999; Namkung-Matthai H. et al., 2001; Дедух Н.В. та ін., 2003). 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 дисертації з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана згідно з планом науково-дослідних робіт ДУ «ІПХС 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 і задачі дослідження. Мета роботи - вивчити морфологічні особливості перебігу репаративної регенерації кістки в умовах аліментарного дефіциту кальцію у лабораторних щурів.

Для досягнення мети роботи були поставлені такі задачі:

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

Структура та обсяг 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 електронограми, 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури проведений аналіз сучасного стану проблеми репаративної регенерації кістки, висвітлено місце моделі аліментарного дефіциту кальцію серед

інших експериментальних моделей остеопорозу у дослідженнях репаративного остеогенезу, поданий аналіз даних літератури стосовно стромальних клітини кісткового мозку як джерела репаративного остеогенезу.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проведені на 252 нелінійних білих щурах популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М.І.Ситенка АМНУ» у 3 серіях відповідно до відтворюваних моделей (таблиця).

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» (2006, ст. 26). 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.).

Таблиця

Розподіл щурів за серіями та групами експерименту

| № серії | Експериментальна модель | Тривалість низько-кальцієвої дієти, місяць | Кількість тварин у групах | | | | Загальна кількість 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 | |

Моделювання аліментарного дефіциту кальцію. Модель аліментарного дефіциту кальцію відтворювали у щурів з 1-місячного віку шляхом їх утримання на низькокальцієвій зерново-овочевій дієті. Добовий раціон харчування тварин в дослідних групах кожної серії експерименту містив 0,03 % кальцію (0,029 % фосфору, 233 МО вітаміну D₂), а в контрольних групах – 1,20 % 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 був

визначений на підставі вітчизняних норм та міжнародних стандартів утримання лабораторних тварин (Западнюк И.П. и др., 1983; Harlan Teklad Global Diets®, LabDiet®).

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

Моделювання травматичного ушкодження кістки. Для вивчення репаративного остеогенезу на фоні модельованого 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію щурам-самцям у дистальному метафізі стегнової кістки здійснювали травматичне ушкодження.

Техніка оперативного втручання. Латеральним доступом у щурів відкривали ділянку дистального метафіза лівої стегнової кістки (без артротомії колінного суглоба) та за допомогою стоматологічного бора (діаметр 1,3 мм) створювали перфораційний (наскрізний дірчастий) дефект.

Після операції щурів дослідної групи продовжували утримувати на дієті та виводили з експерименту за такою схемою (відповідно до стадій репаративного остеогенезу у щурів): щоденно впродовж 1-7 діб, потім через 14, 21, 28 діб після травматичного ушкодження. Дослідження кісткового регенерату провели гістологічним, електронно-мікроскопічним та морфометричним методами.

Тестування *in vivo* остеогенних властивостей клітин кісткового мозку (ККМ). Робота виконана відповідно до методичних рекомендацій Н. Ohgushi et al. (1989) та К. Inoue et al. (1997). В якості імплантата-носія ККМ в експерименті використані 96 зразків пористого гідроксилапатиту (ГА) у формі дисків діаметром 5 мм та висотою 2 мм: пористість – $50 \pm 5\%$, розмір пор – 300-600 мкм, виробник – кафедра фізики твердого тіла ХНУ ім.В.Н.Каразіна. Експерименти проводили окремо після 5- та 11-місячного утримання щурів на низькокальцієвій дієті.

Техніка підготовки ККМ до трансплантації. Після вилучення стегнової та великогомілкової кісток в умовах стерильності відокремлювали їх епіфізи та за допомогою шприца фізіологічним розчином вимивали вміст кістковомозкової порожнини. Клітини осаджували шляхом центрифугування (1000 об/хв, 10 хв), осад відмивали у живильному 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. Один диск в середньому поглинав 60 μ л суспензії, яка містила 2×10^6 клітин. Як контроль використані диски, насичені живильним середовищем 199 без клітин кісткового мозку.

Кожному щуру-реципієнту ККМ (дослідної та контрольної груп) імплантували під шкіру по 6 керамічних дисків: 2 імплантати з клітинами від дослідних щурів, 2 імплантати з клітинами від контрольних щурів, 2 імплантати з живильним середовищем 199 без клітин. Після операції тварин

протягом 2 місяців продовжували утримувати на дієті, відповідній групі щурів-реципієнтів, потім імплантати вилучали з організмів тварин і досліджували гістологічним та гістоморфометричним методами.

Гістологічний метод. Обробку фрагментів стегнової кістки та керамічних імплантатів проводили за гістологічними методами, керуючись рекомендаціями Д.С.Саркісова, Ю.Л.Перова (1996), В.В.Некачалова (2000): 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 і заключення в целоїдин. Зрізи (6-10 мкм) забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізон.

Електронно-мікроскопічний метод. Для ультраструктурного дослідження 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 методом електронної мікроскопії відповідно до рекомендацій Б.Уикли (1975): 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 (епон та аралдит).

Напівтонкі (1-2 мкм) та ультратонкі зрізи (0,05-0,09 мкм) виготовляли за допомогою скляних ножів на ультрамікротомі УМПТ-3М. Забарвлення напівтонких зрізів проводили 1% розчином метиленового синього та 1% розчином основного фуксину. Ультратонкі зрізи контрастували цитратом свинцю та ураніацетатом за Рейнольдсом. Ультраструктурний аналіз проводили у трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР ($\times 3000 - 35000$).

Морфометричні дослідження та статистичний аналіз. На гістопрепаратах стегнової кістки щурів та керамічних імплантатів методом точкового підрахунку за допомогою стереоскопічного мікроскопа “МБС-10” (ок.8 \times , об.4 \times та об.2 \times) з окулярною квадратною сіткою оцінювали та розраховували такі показники: коефіцієнт відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярних просторів дистального епіфіза, коефіцієнт відношення площі компактною кістки до площі кістково-мозкової порожнини діафіза, відносна площа (%) кісткової тканини, утвореної в пористому імплантаті.

На поперечних зрізах діафіза за допомогою окулярного гвинтового мікромметра МОВ-1-16 \times у світловому мікроскопі “БИОЛАМ-ЛОМО” (ок.7 \times , об.3,7 \times та 40 \times) вимірювали ширину шарів кортексу, діаметри остеонів та центральних каналів остеонів (мкм).

В зоні кісткового дефекту на фронтальних зрізах за допомогою сітки Автанділова визначали методом точкового підрахунку відносну площу (%) тканин регенерату через 5, 7, 14, 21, 28 днів

після операції (“БИОЛАМ-ЛОМО”, ок.7[×], об.8[×]), а також аналізували у чотирьох малих квадратах сітки (1 мм²) клітинний склад (%) регенерату через 1 та 3 доби після операції (“Carl Zeiss”, ок.12,5[×], об.50[×]).

Аналізували центральні зрізи, у кожному окремому випадку - не менше 3 зрізів. При виконанні роботи керувались рекомендаціями Г.Г.Автандилова (1990), В.Г.Ковешнікова та ін. (2006). Для визначення достовірної різниці між вибірковими середніми застосовували критерії Стьюдента або Фішера (Рокицкий П.Ф.,1973).

Результати досліджень та їх обговорення. На всіх термінах *моделювання аліментарного дефіциту кальцію* (1, 5, 11 місяців) у щурів визначались схожі порушення структури кісткової тканини з ознаками її резорбції, хоча прояви структурних змін були різними залежно від статі тварин і терміну моделювання. У губчастій кістці дистального епіметафіза спостерігалось порушення розташування трабекулярної “сітки”, пов’язане з нерівномірним потоншенням кісткових трабекул та розширенням міжтрабекулярних просторів. У трабекулах виявлені мікротріщини, відшарування кісткових фрагментів, ділянки лакунарної та пазушної резорбції. При ультраструктурному дослідженні в кістковому матриксі дослідних щурів відмічені нерівномірна мінеральна щільність, осередки деструкції у вигляді тканинного детриту, осміофільні лінії цементації варіабельної ширини та форми, поблизу яких часто спостерігались щілини. Більшість остеоцитів містили гіперхромні ядра та знаходились у розширених лакунах, які мали нерівномірні “зигзагоподібні” контури країв. Виявлялись лакуни з клітинним детритом або без клітин.

У діафізі визначались ознаки порушення компактизації кістки, пов’язані з наявністю невеликих територій пазушної резорбції та порожнин, які містили фіброзну тканину. Спостерігались осередки спонгізації шару внутрішніх генеральних пластинок та ділянки лакунарної резорбції зовнішніх генеральних пластинок на межі з періостом. Встановлена виражена базофілія та нерівномірність контурів розмежування шарів кортексу, наявність розширених проривних судинних каналів.

В цілому виявлений у щурів дослідної групи комплекс структурних змін кісткової тканини свідчить, що в умовах аліментарного дефіциту кальцію відбувається активізація резорбції за остеокластичною (*син.* лакунарної) та пазушною (*син.* «рідка кістка») формами, а також за формами остеоцитарного (*син.* періостеоцитарного) і периканалікулярного (*син.* периваскулярного) остеолізу.

Відносна площа губчастої кістки (відповідно, і коефіцієнт відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярного простору епіфіза) у самців дослідної групи на всіх термінах експерименту достовірно менша, ніж у контрольній групі, а саме: в 1,35 раза (1 місяць дієти), в 1,47 раза (5 місяців дієти), в 1,19 раза (11 місяців дієти). Аналогічна тенденція спостерігалась і в самиць, але достовірною різниця була лише після 5 місяців дієти в 1,32 раза (рис. 1). Ці результати

свідчать, що в умовах низькокальцієвої дієти у самців відбувається більш інтенсивна «втрата» губчастої кістки, ніж у самиць, і що найбільшою мірою вона проявляється у тварин після 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію (вік щурів – 6 місяців, вікова група – молоді).

Площа компактної кістки на всіх термінах експерименту також була меншою у тварин дослідної групи, ніж у контрольних щурів. У самців вона менша в 1,31 раза (1 місяць дієти), 1,27 раза (5 місяців дієти), 1,26 раза (11 місяців дієти), а в самиць у 1,19 раза (1 місяць дієти), 1,25 раза (5 місяців дієти), і не виявлена достовірна різниця за цим показником між дослідною та контрольною групами після 11 місяців дієти (рис. 2).

Морфометричний аналіз діаметра остеонів показав, що після 1 місяця низькокальцієвої дієти у самців цей показник був менший в 1,2 раза (контроль – $38,2 \pm 1,2$ мкм; дослід – $34,1 \pm 1,4$ мкм; $P < 0,05$), у самиць – 1,4 раза (контроль – $40,1 \pm 1,4$ мкм; дослід – $35,1 \pm 1,1$ мкм; $P < 0,01$), що свідчить про знижену інтенсивність процесу кісткоутворення у дослідних тварин обох статей. Не встановлено достовірних відмінностей між діаметрами центральних остеонних каналів у дослідних самців та самиць.

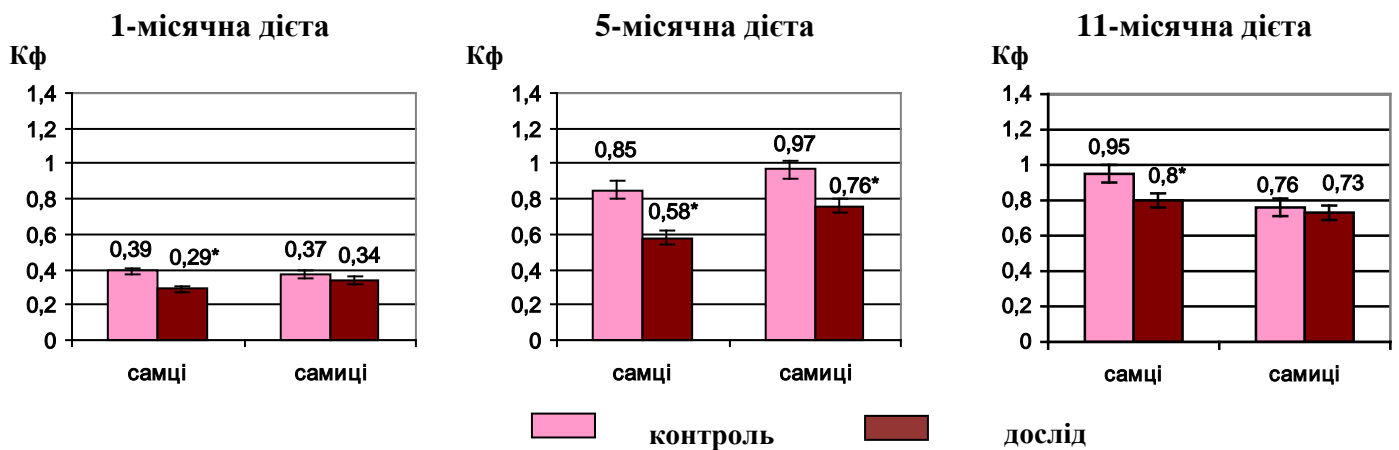


Рис. 1. Коефіцієнт (Кф) відношення площі губчастої кістки до площі міжтрабекулярного простору в епіфізі стегнової кістки щурів після їх утримання на низькокальцієвій дієті впродовж 1, 5, 11 місяців. * - $P < 0,05$.

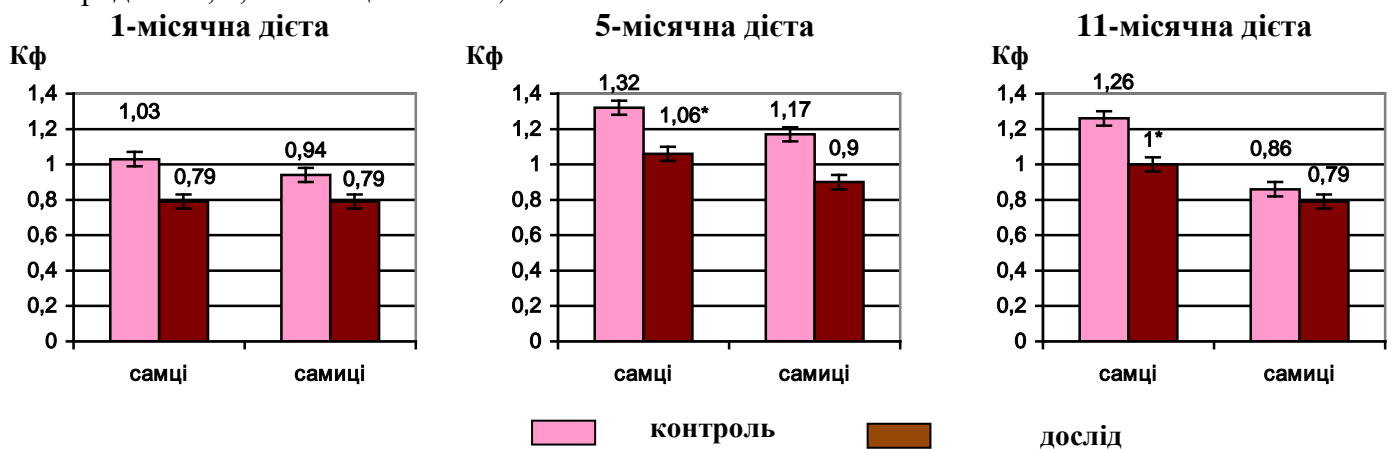


Рис. 2. Коефіцієнт (Кф) відношення площі компактної кістки до площі кістковомозкової порожнини в діяфізі стегнової кістки щурів після їх утримання на низькокальцієвій дієті впродовж 1, 5, 11 місяців. * - $P < 0,05$.

Після 5 місяців аліментарного дефіциту кальцію у самців діаметр остеонів більший в 1,2 раза при порівнянні з контролем (контроль – $26,5 \pm 1,1$ мкм; дослід – $31,2 \pm 1,0$ мкм; $P < 0,01$), але в цілому інтенсивність кісткоутворення ми оцінюємо як помірну, тому що виявлялись переважно зрілі остеони, а остеони у стані формування були поодинокими. Діаметр центральних каналів остеонів більший в 1,1 раза (контроль – $5,9 \pm 0,2$ мкм; дослід – $6,5 \pm 0,3$ мкм; $P < 0,05$), що свідчить про підвищену активність кісткової резорбції. У самиць на даний термін не встановлено достовірної різниці за цими показниками між контролем та дослідом. Після 11 місяців низькокальцієвої дієти у щурів обох статей різниця даних показників між контролем та дослідом також статистично не достовірна, що віддзеркалює помірність перебігу ремоделювання компактної кістки.

Вимірювання ширини шарів кортексу діяфіза показало, що після 1-місячної низькокальцієвої дієти у самців зменшена ширина шару зовнішніх генеральних пластин в 1,41 раза (контроль – $59,3 \pm 3,8$ мкм; дослід – $42,2 \pm 2,5$ мкм; $P < 0,001$). Після 5-місячної дієти - ширина остеонного шару у самців менша у 1,31 раза (контроль – $262,9 \pm 8,9$ мкм; дослід – $201,3 \pm 10,4$ мкм; $P < 0,001$) та самиць у 1,19 раза (контроль – $199,3 \pm 9,5$ мкм; дослід – $167,7 \pm 8,5$ мкм; $P < 0,05$), а після 11-місячної дієти менша ширина шару зовнішніх генеральних пластин у самців в 1,61 раза (контроль – $126,6 \pm 19,2$ мкм; дослід – $78,8 \pm 5,5$ мкм; $P < 0,05$) та самиць в 1,74 раза (контроль – $79,6 \pm 14,6$ мкм; дослід – $45,7 \pm 6,4$ мкм; $P < 0,05$).

Виявлений комплекс змін у структурі губчастої та компактної кістки щурів дослідної групи після 1 місяця аліментарного дефіциту кальцію (вік щурів – 2 місяці) свідчить про інтенсивний перебіг кісткового ремоделювання, але у дослідних щурів резорбція більш виражена, ніж у контрольних тварин. Після 11-місячної низькокальцієвої дієти (вік щурів – 12 місяців) у щурів спостерігається помірний перебіг ремоделювання кістки, що може бути наслідком вікового зниження активності кісткоутворення. Аналіз площі кісткової тканини встановив, що у губчастій кістці самців, яких утримували на низькокальцієвій дієті впродовж 5 місяців, спостерігається найбільша різниця за цим морфометричним показником порівняно з самцями контрольної групи.

Регенерація змодельованого кісткового дефекту на фоні аліментарного дефіциту кальцію. В зоні кісткового дефекту впродовж 1-3 діб після операції (запально-проліферативна стадія репаративного остеогенезу) у тварин контрольної та дослідної груп відмічені ділянки крововиливу зі скупченням еритроцитів серед фібринових волокон та уламків материнської кістки, плазмоподібна набрякова рідина, клітини запалення – лімфоцити, макрофаги, нейтрофіли (переважно дегранульовані), поодинокі плазмоцити та тканинні базофіли. Запальна реакція мала серозний характер і відповідала асептичному типу запалення. У грануляційній тканині спостерігались «стільнікоподібні» просвіти як прообрази формування синусоїдних капілярів (1 доба) та сформовані капіляри (3 доби), виявлялись малодиференційовані сполучнотканинні клітини, а також фібробласти на різних стадіях диференціювання. Відмітною особливістю

перебігу регенерації було те, що в ділянці дефекту у щурів контрольної групи відмічались скупчення макрофагів зі структурними ознаками активної секреції та фагоцитозу, тоді як грануляційна тканина дослідних тварин характеризувалась меншою кількістю макрофагів, будова яких свідчить про їх низьку активність функціонування (вузький шар цитоплазми, помірна кількість вакуолей і фагосом, а також мікрівиростів цитоплазми).

Аналіз кількісних змін клітинного складу у зоні кісткового дефекту у щурів контрольної групи між 1 та 3 добами після операції показав, що в регенераті достовірно у 1,9 раза зменшилась кількість нейтрофілів та 1,3 раза – лімфоцитів. Водночас зросла чисельна щільність фібробластів та зменшилась кількість малодиференційованих сполучнотканинних клітин, що свідчить про перехід репаративного процесу від запальної фази до проліферативної (рис. 3).

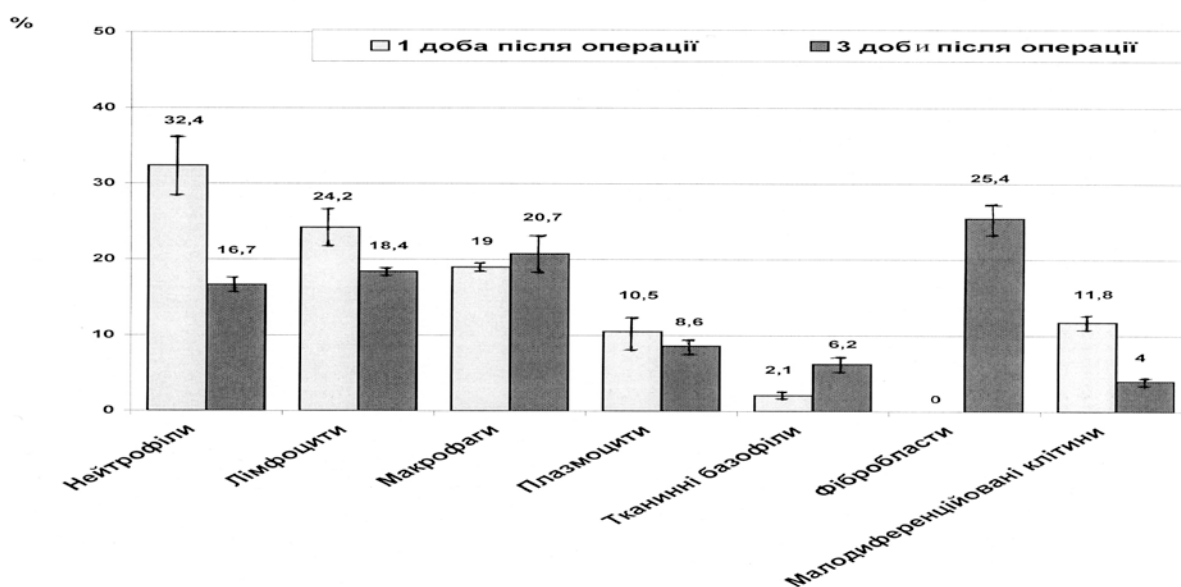


Рис. 3. Гістограма клітинного складу в кістковому регенераті щурів контрольної групи через 1 та 3 доби після операції.

У регенераті тварин з модельованим аліментарним дефіцитом кальцію через 3 доби після операції залишився високим відсоток нейтрофілів, а відсоток макрофагів зменшився та поступився показнику у контрольній групі в 1,9 раза (рис. 4). Меншим у 6 разів був і відсоток фібробластів. Отримані дані свідчать, що у зоні травматичного ушкодження кістки відмічаються морфологічні ознаки фази запалення зі слабо вираженою проліферацією клітин і що в умовах аліментарного дефіциту кальцію у кістковому регенераті щурів вже на ранніх стадіях репаративного остеогенезу спостерігається порушення співвідношення клітин.

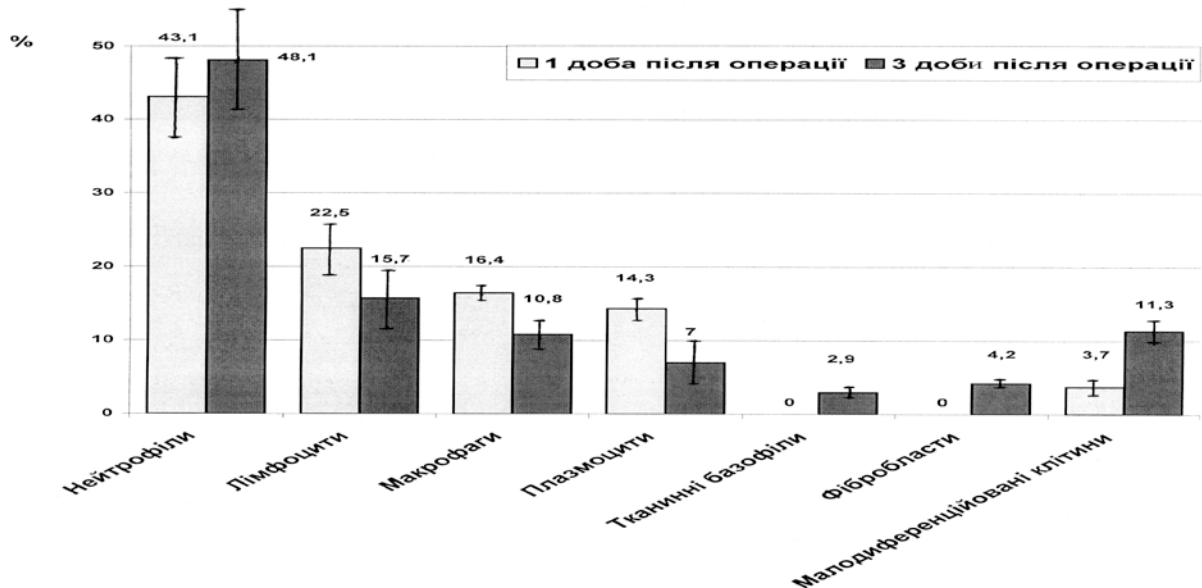


Рис. 4. Гістограма клітинного складу в кістковому регенераті щурів дослідної групи через 1 та 3 доби після операції.

Через 5 діб (стадія початку диференціювання різних видів сполучних тканин регенерату) у щурів дослідної групи центральні ділянки дефекту містили залишки фібринових мас та кісткові уламки, навколо яких розташовувались переважно грануляційна та фіброретикулярна тканини, а також поодинокі «профілі» новоутворених кісткових трабекул. Порівняно з контрольною групою площа грануляційної тканини була в 1,6 раза більшою, а фіброретикулярної і новоутвореної кісткової тканин відповідно в 1,4 та 2,9 раза меншою (рис. 5).

На подальших термінах дослідження (7 та 14 діб – стадії реорганізації регенерату та мінералізації кісткової тканини) у щурів обох груп спостерігалось зменшення площі грануляційної тканини та збільшення площі новоутвореної грубоволокнистої кісткової тканини порівняно з попередніми термінами. Проте у дефектах тварин дослідної групи ділянки грануляційної тканини за площею переважали показники контрольної групи у 2,3 та 2,27 раза відповідно до цих термінів (рис. 4 А), а кісткової тканини – поступались у 2,8 та 2,14 раза (рис. 5 В).

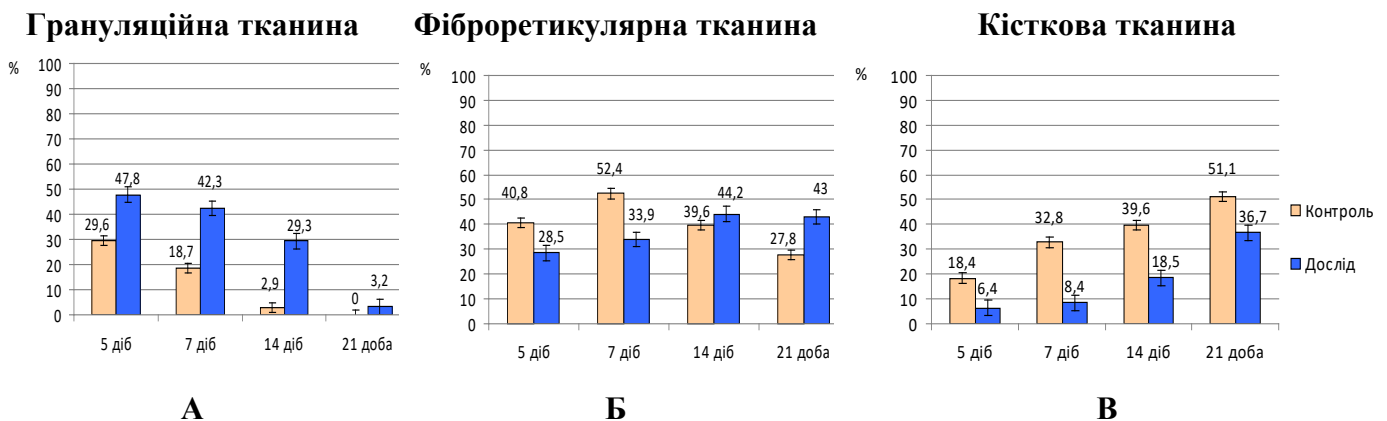


Рис. 5. Відносні площі новоутворених тканин у модельованому дефекті дистального метафіза стегнової кістки щурів на різних термінах дослідження репаративного остеогенезу.

У щурів з аліментарним дефіцитом кальцію *через 21 добу* (стадія початку ремоделювання кісткового регенерату) після травматичного ушкодження значна територія дефекту представлена фіброретикулярною тканиною, площа якої перевищувала показник контролю в 1,55 раза (рис. 5 Б). Новоутворена кісткова тканина представлена у вигляді трабекул переважно грубоволокнистої структури, її площа була в 1,4 раза меншою за відповідний показник у контролі.

Через 28 діб (стадія ремоделювання кісткового регенерату) у дефекті щурів контрольної та дослідної груп визначались новоутворені кісткові трабекули великопетлястої будови та ділянки фіброретикулярної тканини, мало місце відновлення кортексу. Площі фіброретикулярної та грубоволокнистої кісткової тканин у дослідних тварин порівняно з контрольними щурами були достовірно більшими в 1,8 та 1,4 раза відповідно, а площа пластинчастої кісткової тканини - менша в 1,9 раза (рис. 6). Склад тканин регенерату на даний термін репаративного остеогенезу свідчить, що у тварин, яких утримували на низькокальцієвій дієті, спостерігається уповільнення процесу кісткоутворення із затримкою мінералізації та ремоделювання кісткової тканини при порівнянні з тваринами контрольної групи.

В цілому відмітною особливістю кісткового регенерату у щурів із модельованим аліментарним дефіцитом кальцію на ранніх термінах є менша кількість клітин фібробластичного диферону та більша кількість клітин запалення. Виявлені нами при аліментарному дефіциті кальцію зменшення кількості макрофагів та їх низька функціональна активність у регенераті є передумовою для порушення диференціації клітин у фібробластичному та остеобластичному напрямках і стадійно-часової затримки перебігу репаративного остеогенезу.

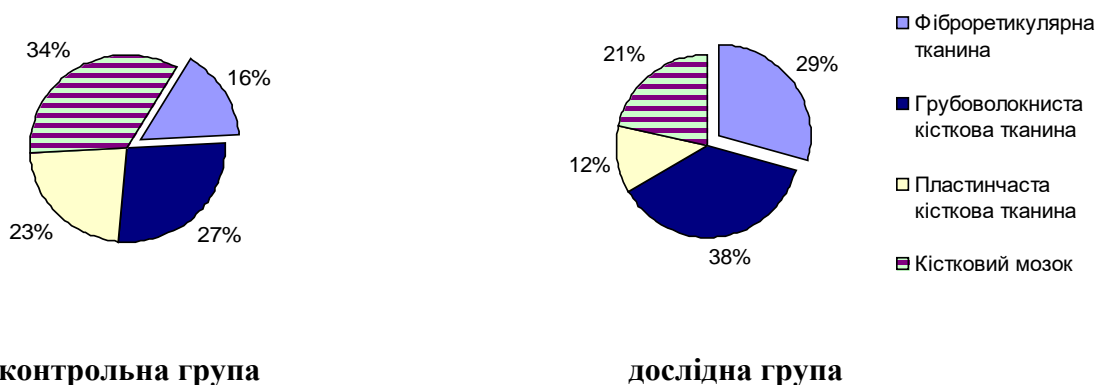


Рис. 6. Діаграма співвідношення площ тканин у складі регенерату метафізарного дефекту у щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 28 діб після операції.

Тестування *in vivo* остеогенних властивостей клітин кісткового мозку при ектопічній імплантації. При дослідженні через 2 місяці не виявлено формування кісткової тканини у порях керамічних зразків, насичених живильним середовищем 199 та імплантованих підшкірно контрольним та дослідним щурам, які знаходились в експерименті впродовж 5 та 11 місяців. Пори

імплантатів були виповнені сполучною тканиною (кровоносні судини, колагенові волокна, фібробласти).

При аналізі керамічних зразків, насичених ККМ та імпантованих контрольним щурам після *5-місячної стандартної дієти*, в їх поверхневих порах виявлені ділянки остеогенезу (остеоїд, грубоволокниста та пластинчаста кісткова тканина), внутрішні пори містили сполучну тканину (рис. 7 А). Площа утвореної кісткової тканини в імплантатах з ККМ дослідних щурів (5-місячна низькокальцієва дієта) була в 1,52 раза меншою, ніж в імплантатах з ККМ контрольних щурів (ККМ контролю – $15,7 \pm 1,23$ %; ККМ досліду – $10,3 \pm 0,79$ %; $P < 0,01$). Це свідчить, що аліментарний дефіцит кальцію пригнічує остеогенні властивості ККМ.

В керамічних зразках, насичених ККМ та імпантованих дослідним щурам після *5-місячної низькокальцієвої дієти*, площа кісткової тканини також була меншою (в 1,53 раза) в імплантатах з ККМ дослідних щурів, ніж в імплантатах з ККМ контрольних щурів (ККМ контролю – $8,9 \pm 0,58$ %; ККМ досліду – $5,8 \pm 0,47$ %; $P < 0,001$). Ці показники поступаються аналогічним показникам, що наведені вище, коли реципієнтами ККМ були контрольні щури (відповідно в 1,76 та 1,78 раза), і свідчать про негативний вплив аліментарного дефіциту кальцію на стан організму-реципієнта та пригнічення остеогенних властивостей трансплантованих ККМ.

В усіх імплантатах, насичених ККМ щурів з модельованим *11-місячним* аліментарним дефіцитом кальцію, кісткова тканина не виявлена, пори імплантатів виповнені сполучною тканиною (рис. 7 Б). Сім із 16 імплантатів, насичених ККМ контрольних щурів (11-місячна стандартна дієта), у поверхневих порах містили ділянки остеоїду, площа яких була в 1,95 раза менша після імплантації дослідним щурам-реципієнтам, ніж щурам-реципієнтам контрольної групи (дослід – $3,7 \pm 0,45$ %; контроль – $7,2 \pm 0,57$ %; $P < 0,01$).

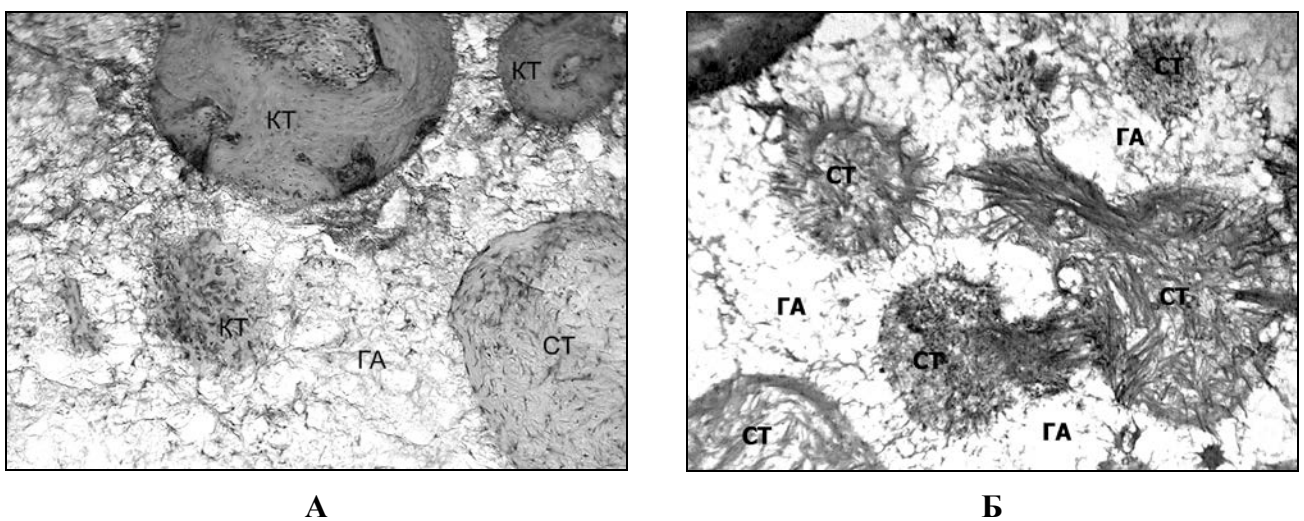


Рис. 7. Кісткова тканина (КТ) та сполучна тканина (СТ), що утворені в поверхневих порах зразків гідроксилапатиту (ГА): А) імплантат з ККМ щурів контрольної групи (5-місячна стандартна дієта), реципієнт – щур контрольної групи. Гематоксилин та еозин. Ок.10, об.25; Б) колагенові волокна в імплантаті з ККМ щурів дослідної групи (11-місячна низькокальцієва

дієта), реципієнт – щур дослідної групи. Пікрофуксин за Ван-Гізон. Ок.10, об.12.

Активність ектопічного остеогенезу залежала від віку тварин. Так, площа кісткової тканини, утвореної в імплантатах з ККМ контрольних щурів після 11-місячної тривалості експерименту, була меншою від аналогічного показника в імплантатах з ККМ контрольних щурів після 5-місячного експерименту в 2,2 раза (реципієнти ККМ – щури контрольних груп; 5 місяців - $15,7 \pm 1,23$ %; 11 місяців – $7,2 \pm 0,57$ %; $P < 0,001$). Ці результати узгоджуються з даними роботи K.Inoue et al. (1997) стосовно зниження остеогенного потенціалу ККМ з віком.

Показники площі ектопічно утвореної кісткової тканини в керамічних зразках після їх насичення ККМ дослідних щурів та імплантації щурам-реципієнтам обох груп були меншими, ніж при насиченні ККМ контрольних щурів, що свідчить про негативний вплив аліментарного дефіциту кальцію та вікових особливостей організму на остеогенний потенціал ККМ як донора, так і реципієнта, що важливо враховувати при використанні ККМ для стимуляції регенерації.

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 раза відповідно до вивчених термінів при порівнянні з контрольною групою, у *самиць* її достовірно зменшення (в 1,33 раза) 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 раза, а у *самиць* - в 1,31 та 1,25 раза 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 тканиннспецифічних 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.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дедух Н.В. Регенерація кісткової тканини при остеопорозі (експериментальне дослідження) / Н.В.Дедух, О.А.Нікольченко, А.М.Побел // Український медичний альманах. – 2003. – Т. 6, № 2. – С. 66-69. *(Особистий внесок: пошук та участь у аналізі даних літератури, експеримент на щурах, гістологічний та морфометричний аналіз, статистична обробка результатів).*

2. Дедух Н.В. Морфологические особенности репаративного остеогенеза на воспалительно-пролиферативной стадии процесса при алиментарном дефиците кальция / Н.В.Дедух, О.А.Николюченко, Е.Ю.Валенчук // Таврический медико-биологический вестник. – 2004. – Т.7, № 4. – С. 153-155. *(Особистий внесок здобувача: пошук та участь у аналізі даних літератури, експеримент на щурах, гістологічний та ультраструктурний аналіз, формулювання висновків).*

3. Нікольченко О.А. Морфологічна характеристика діафіза стегнової кістки щурів при нетривалому моделюванні аліментарного дефіциту кальцію / О.А.Нікольченко // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету: зб. наук. праць. – Біла Церква, 2005. – Вип. 33. – С. 313-317.

4. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома (сообщение 3) / Н.А.Корж, Н.В.Дедух, О.А.Николюченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 2. – С. 93-99. *(Особистий внесок здобувача: пошук та участь у аналізі даних літератури).*

5. Нікольченко О.А. Вплив довготривалої низькокальцієвої дієти на структуру кісткової тканини щурів / О.А.Нікольченко, Л.М.Бенгус, Є.Ю.Валенчук // Український морфологічний альманах. – 2006. – Т. 4, № 3. – С. 49-54. *(Особистий внесок: пошук та аналіз даних літератури, експеримент на щурах, гістологічний, морфометричний, ультраструктурний аналіз).*
6. Нікольченко О.А. Гістоморфометричне дослідження впливу низькокальцієвої дієти на кісткову тканину щурів / О.А.Нікольченко // Таврический медико-биологический вестник. – 2006. – Т. 9, № 9. – С. 118-121.
7. Дедух Н.В. Изучение патогенетической взаимосвязи алиментарного остеопороза и остеоартроза на основе морфологических исследований / Н.В.Дедух, О.А.Нікольченко, З.Н.Данищук // Український морфологічний альманах. – 2006. – Т. 4, № 2. – С. 44-46. *(Особистий внесок: експеримент на щурах, гістологічний та морфометричний аналіз кісткової тканини).*
8. Нікольченко О.А. Вплив низькокальцієвої дієти на остеогенний потенціал клітин кісткового мозку у щурів різного віку: гістологічне дослідження кісткоутворення у пористому гідроксилапатиті / О.А.Нікольченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 2. – С. 52-57.
9. Дедух Н.В. Регенерація кістки при аліментарному остеопорозі (експериментальне дослідження) / Н.В.Дедух, О.А.Нікольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. -2009. - № 2. – С. 34-40.
10. Вікові особливості репаративного остеогенезу в умовах експериментального остеопорозу: матеріали V Української конф. молодих вчених, присвяченої пам'яті академіка В.В.Фролькіса, (Київ, 23 січня 2004 р.) / О.А.Нікольченко / АМН України, Інститут геронтології АМН України, Українське наукове медичне товариство геронтологів і геріатрів. – К.: Ін-т геронтології АМНУ, 2004. – С. 131-132.
11. Морфологическое исследование репаративного остеогенеза при нарушении метаболизма кальция в костной ткани: материалы 18-й научной конф. гистологов [«Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей»], (Санкт-Петербург, 7-8 апреля 2004 г.) / И.А.Батура, О.А.Нікольченко / Мин-во обороны России. – СПб: Военно-медицинская академия, 2004. – 174 с. *(Особистий внесок здобувача: пошук та аналіз даних літератури, експеримент із моделлю аліментарного дефіциту кальцію у щурів, гістологічний та морфометричний аналіз, статистична обробка результатів).*
12. Остеорепарация в условиях низкокальциевой диеты (экспериментально-морфологическое исследование): матеріали V Всеукраїнської науково-практичної конференції [«Морфогенез та патологія кісткової системи в умовах промислового регіону»], (Луганськ, 11-13 квітня 2005 р.) / О.А.Нікольченко / МОЗ України, Луганський державний медичний університет, Луганський остеологічний центр // Український морфологічний альманах. – 2005. – Т. 3, № 1. – С. 113.

13. Регенерация кости при остеопорозе : материалы Международной научно-практической конференции [«Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение»], (Евпатория, 5-8 сентября 2006 г.) / Н.В.Дедух, О.А.Никольченко / АМН Украины, МЗ Украины, Украинская ассоциация остеопороза, Российская ассоциация остеопороза, Литовский фонд остеопороза // Проблемы остеологии. – 2006. – Т. 9, додаток. – С. 40-41.

14. Регенерация кости при остеопорозе: материалы II Всеукраїнської школи [«Фізіологія та морфологія тканин опорно-рухової системи в нормі і при ішемічних ушкодженнях»], (Київ - Черкаси, 14-15 червня 2007 р.) / Н.В.Дедух, О.А.Никольченко, И.А.Батура / АМН України, МОЗ України, Інститут травматології та ортопедії АМНУ. – К.: Черкаси, 2007. – 92 с. (*Внесок автора: пошук та аналіз джерел літератури, експеримент із моделлю аліментарного дефіциту кальцію, гістологічний, морфо метричний і статистичний аналіз*).

15. Histologic research of osteogenic potential of rats' bone marrow cells under the conditions of low calcium diet: 8th European Congress on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, (Istanbul, 09-12 April 2008) / N.V.Dedukh, O.A.Nikolchenko / World Health Organization Collaborating Center, European Society on Clinical for Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis // Osteoporosis Int. – 2008. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. S138 (P325).

АНОТАЦІЯ

Нікольченко О.А. Морфологічні особливості репаративного остеогенезу в умовах аліментарного дефіциту кальцію (експериментальне дослідження). – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.11 – цитологія, клітинна біологія, гістологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2009.

У дисертації представлені результати експериментального дослідження морфологічних особливостей будови кісткової тканини, репаративної регенерації кістки та прояву остеогенних властивостей клітин кісткового мозку лабораторних щурів на фоні модельованого аліментарного дефіциту кальцію.

Утримання щурів з 1-місячного віку на низькокальцієвій (0,03 %) дієті впродовж 1, 5, 11 місяців призводить до виникнення структурних змін у кістковій тканині стегнової кістки, які пов'язані з посиленням процесів резорбції (остеокластичної, остеоцитарної, периканалікулярної, пазушної) та зменшенням відносної площі губчастої та компактною кістки. Темпи розвитку та ступінь прояву цих змін найбільш виражені у губчастій кістці самців після 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію.

Перебіг репаративного остеогенезу на фоні попереднього 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію досліджували на моделі травматичного ушкодження дистального метафіза стегнової кістки (наскрізний дірчастий дефект $d=1,3$ мм), оцінюючи кістковий регенерат щоденно

протягом 1-7 діб та через 14, 21, 28 діб після операції. У щурів дослідної групи на ранніх стадіях остеорепації виявлено уповільнення темпу катаболізму продуктів запалення та процесу диференціювання клітин фібробластичного та остеобластичного диферонів, що пов'язано з низькою функціональною активністю макрофагів, а також меншою кількістю макрофагів, тканинних базофілів і фібробластів порівняно з контрольною групою. На подальших стадіях репаративного остеогенезу спостерігається затримка реорганізації тканин регенерату, більш пізні формування остеоїду, кісткових трабекул та відновлення кортикальної кістки.

Ектопічна трансплантація клітин кісткового мозку на носії з пористого гідроксилапатиту довела, що при низькому вмісті кальцію у раціоні харчування щурів (як донорів, так і реципієнтів) пригнічуються остеогенні властивості цих клітин, через що після 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію ектопічно утворена кісткова тканина характеризується меншою площею та зрілістю порівняно з контролем, а після 11-місячного – вона не виявляється.

Ключові слова: репаративний остеогенез, низькокальційова дієта, стегнова кістка, клітини кісткового мозку, щури, морфологія.

АННОТАЦІЯ

Никольченко О.А. Морфологические особенности репаративного остеогенеза в условиях алиментарного дефицита кальция (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 – цитология, клеточная биология, гистология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2009.

В диссертации представлены результаты экспериментального исследования морфологии костной ткани, репаративной регенерации кости и проявления остеогенных свойств клеток костного мозга лабораторных крыс на фоне моделированного алиментарного дефицита кальция. Анализ проводили с помощью гистологического, электронно-микроскопического и гистоморфометрического методов.

Для моделирования алиментарного дефицита кальция белых крыс с 1-месячного возраста содержали на низкокальциевой (0,03 %) зерново-овощной диете в течение трех сроков (1, 5, 11 месяцев). На всех сроках исследования у животных опытной группы в диафизе и дистальном эпиметафизе бедренной кости выявлены структурные изменения, связанные с повышением резорбции костной ткани и уменьшением относительной площади губчатой и компактной кости. Отмечены остеокластическая, остеоцитарная, периканаликулярная и пазушная формы костной резорбции. У крыс обоих полов атрофические изменения прогрессируют прежде всего в губчатой кости, и после 5 месяцев диеты, они больше выражены у самцов по сравнению с самками. В результате гистологического анализа и морфометрической оценки ширины зон компактной кости выявлено, что в диафизе у самцов после 1-месячной низкокальциевой диеты выражена

periosteal resorption and that in both sexes of animals a decrease in the width of the osteonal layer (5-month diet) and a decrease in the width of the outer general plates (11-month diet).

Repair osteogenesis on the background of preceding 5-month alimentary calcium deficiency was studied on a model of a perforated defect of the distal metaphysis of the femur, which was reproduced with the help of a dental bur (d=1,3 mm). Animals were taken out of the experiment daily for 1-7 days and after 14, 21, 28 days after the operation. In the experimental group at the early stages of osteorepair a deceleration of the rate of catabolism of products of inflammation and the process of differentiation of fibroblastic and osteoblastic cells was observed, which is associated with a low functional activity of macrophages, as well as a smaller number of macrophages, tissue basophils and fibroblasts compared with the control group. In the subsequent stages of repair osteogenesis a delay in the reorganization of tissues of the regenerate, a later formation of osteoid, bone trabeculae and restoration of the cortical bone, of which testify the results of morphometric study of the ratio of areas of tissues, present in the zone of the bone defect. It is established that the regeneration of the metaphyseal defect on the background of alimentary calcium deficiency proceeds according to the type of a delayed primary union.

Testing of the influence of alimentary calcium deficiency on osteogenic properties of bone marrow cells as a source of repair osteogenesis was carried out by ectopic (subcutaneous) implantation on a carrier of porous hydroxylapatite for 2 months. It is shown that after a 5-month diet an ectopically formed bone tissue (areas of osteoid, coarse-fibered and plate-like bone tissue in the surface pores of implants) is characterized by a smaller area and maturity compared with the control, and after 11 months – it is not revealed. The results of the study testify that at a low content of calcium in the diet of mice (as donors, as well as recipients) osteogenic properties of bone marrow cells are suppressed.

Key words: repair osteogenesis, low-calcium diet, femur, bone marrow cells, mice, morphology.

SUMMARY

Nikolchenko O.A. Morphological features of repair osteogenesis at alimentary calcium deficiency (experimental research). – Manuscript.

Dissertation for scientific degree of candidate of biological sciences 03.00.11 – cytology, cell biology, histology. – Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, 2009.

The results of experimental research of morphological features of bone tissue, repair regeneration of bone and display of osteogenic properties of rat bone marrow cells at condition of model alimentary calcium deficiency are presented in this dissertation.

The keeping of 1-month-old rats on a low-calcium (0,03 %) diet during three explored terms (1, 5, 11 months) results in appearance of structural changes in femur bone tissue, which are related to increase in resorptive processes (lacunar, osteocyte osteolysis, perivascular and sine forms) and reduction of relative areas of spongy and compact bone. It was found out that development rate and expression degree of these changes are most shown in the male spongy bone after the 5-monthly alimentary calcium deficiency.

The course of repair osteogenesis at conditions of previous 5-monthly alimentary calcium deficiency was analyzed on the model of traumatic damage of distal femur metaphysis (through hole defect of $d=1,3$ mm), estimating bone regeneration daily during 1-7 days and in 14, 21, 28 days after the operation. At the experimental rats on the early osteoreparative stages the impaired rates of inflammatory product catabolism and differentiation of fibroblasts and osteoblasts are exposed, that it is related to low functional activity of macrophages, and also less of macrophages, tissues basophiles and fibroblasts on comparison with a control group. On the subsequent stages of repair osteogenesis there are delay of regenerate tissue reorganization, more lately forming the osteoid, bone trabecules and restoration of cortical bone.

Ectopic transplantation of bone marrow cells on the porous hydroxylapatite carrier proved that osteogenic properties of these cells are depressed at low maintenance of calcium in the feed ration of rats (both donors and recipients), as a result the ectopically formed bone tissue has less area and maturity on comparison with the control at the 5-monthly alimentary calcium deficiency, and it does not pronounced at 11-monthly alimentary calcium deficiency.

Key words: reparative osteogenesis, low-calcium diet, femur, bone marrow, rats, morphology.