

УДК 591.4: [616.718.4–003.93–092.9:615.357]

© Н. О. Ашукіна, Н. В. Дєдух, М. М. Гелета, 2013

ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ В ДІАФІЗАРНИХ ДЕФЕКТАХ СТЕГНОВИХ КІСТОК ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ГІПОТИРЕОЗУ

Н. О. Ашукіна, Н. В. Дєдух, М. М. Гелета

Лабораторія морфології сполучної тканини (зав. – д. б. н. Дєдух Н. В.), ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». 61024 Україна, м. Харків, вул. Пушкінська, 80. e-mail: n_ashukina@mail.ru

FEATURES OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN FEMUR DIAPHYSEAL DEFECTS UNDER CONDITION OF HYPOTHYROIDISM MODELING

N. A. Ashukina, N. V. Diedukh, M. M. Geleta

SUMMARY

An experimental study has been carried out on 64 white laboratory female rats aged 6 months. It has been established that a decrease of the thyroid hormone level in the animals by introduction of Thiamazol (1 mg/100 g body weight, per os) causes a delay of the repair process in the femur diaphyseal defect for all the periods of the research. Abnormality of the bone repair was observed at the inflammation stage (on the 3rd day): reorganization of haematoma delayed and the amount of neutrophils increased as compared to the control group. A retardation of the bone formation was observed on the 7th day after the traumatic injury (the osteoid area decreased by a factor of 3.8 as compared to the control group) and was still in progress on the 21st day. The quality of the new-formed bone impaired because of secondary destructive changes in the bone trabeculae of the regenerate.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА В ДИАФИЗАРНЫХ ДЕФЕКТАХ БЕДРЕННЫХ КОСТЕЙ КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГИПОТИРЕОЗА

Н. А. Ашукіна, Н. В. Дєдух, М. М. Гелета

РЕЗЮМЕ

Експериментальні дослідження виконані на 64 самках білих лабораторних крыс віком 6 міс. Установлено, що зниження рівня тиреоїдних гормонів в організмі тварин шляхом введення «Мерказолила» (1 мг/100 г живої маси, *per os*) призводить до затримки процесів регенерації в діафізарному дефекті бедренної кістки на всі терміни дослідження. Наблюдено порушення регенерації зафіксовано вже на стадії запалення (3-ї доби): затримується перестройка гематоми і збільшується кількість нейтрофілів порівняно з контролем. Затримка кісткоутворення відзначена на 7 добу після травматичного пошкодження (площасть остеоїда була в 3,8 рази зменшена порівняно з контролем) і продовжувалась і на 21-ю. Погіршується якість новоутвореної кістки через розвиток вторинних деструктивних змін в кісткових трабекулах регенерата.

Ключові слова: регенерація кістки, діафізарний дефект, гіпотиреоз, стегнова кістка, щур.

Проблема дослідження репаративної регенерації кісток є однією з актуальних у біології, експериментальній і клінічній травматології та ортопедії. Важливою складовою для успішного результату репаративного остеогенезу є стан кістки на момент виникнення травми, який залежить від багатьох чинників. Серед них на особливу увагу заслуговує порушення ендокринного балансу організму, зокрема внаслідок дисфункції щитовидної залози. Гормони, які вона виробляє (трийодтиронін та тироксин), регулюють майже всі види обміну в організмі, зокрема і метаболізм кісткової тканини [10]. На сьогодні відомо, що дисбаланс тиреоїдних гормонів в організмі через гіпофункцію щитовидної залози спричиняє уповільнення осифікації, порушення формування кортексу та зниження мінералізації [5], негативно впливає на відновлення губчастої кістки [2]. Проте у випадку переломів довгих кісток найчастіше страждає діафіз, що потребує вивчення особливостей перебігу репаративного остеогенезу саме у цій ділянці.

Мета роботи: дослідити перебіг репаративного процесу в діафізарних дефектах стегнових кісток щурів на фоні зниженого рівня тироксину в організмі.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ

Роботу виконано на 64 самках білих лабораторних щурів (віком 6 міс. на момент початку експерименту) популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України». Вибір статі тварин обумовлений підвищеною частотою зустрічальності порушення функції щитовидної залози у жінок порівняно з чоловіками [6, 9], а віку — практичною зупинкою в щурів на цей момент росту скелета в довжину [7]. Гіпотиреоз викликали шляхом внутрішньошлункового введення «Мерказолілу» у дозі 1 мг на 100 живої ваги протягом двох місяців (32 щура) [3]. Контрольні тварини (32) отримували дистильовану воду. Через 2 міс. усім тваринам в умовах асептики під загальним наркозом (аміназин — 10 мг/кг, кетамін — 50 мг/кг) виконували дірчастий дефект (діаметром 1,3 мм) у середній третині діафіза стегнової кістки. Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування ефіру через 3, 7, 14 та 21 добу після операції. Протокол експериментів був затверджений комісією з біоетики ДУ «ІПХС ім. проф. М. І. Ситенка АМН України» відповідно

до правил «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються у експериментальних і інших наукових цілях».

Для гістологічного дослідження вилучали діяфізи стегнової кістки з ділянкою дефекту, фіксували у 10% нейтральному формаліні, проводили декальцинацію у 4% азотній кислоті, зневоднювали у спиртах висхідної концентрації та у суміші спирту з ефіром (1:1), заливали у целоїдин. Виготовлені гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином, пікрофуксином за Ван-Гізоном та аналізували під світловим мікроскопом «AxioStar Plus» (Carl Zeiss).

Гістоморфометрія. Відносний об'єм (%) утворених у зоні дефекту тканин визначали за допомогою квадратно-сітчастої окулярної вставки. У полі зору мікроскопа за потрібного збільшення підраховували число крапок, що попадали на структуру досліджуваного об'єкта — кісткова, фіброретикулярна, грануляційна тканини та кістковий мозок. Потім підраховували їх відсоткове співвідношення із загальною площею тканин у дефекті [1]. Отриманий цифровий матеріал опрацьовували методами варіаційної статистики за допомогою прикладної програми Excel. Результати вважали статистично значимими за $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час гістологічного дослідження через 3 доби (стадія запалення за Корж Н. А., Дедух Н. В. [4]) в дефектах тварин, які отримували «Мерказоліл», розташовувалася гематома без ознак перебудови (рис. 1). Вона займала майже всю територію кістково-мозкового каналу, а сітку фібринових волокон спостерігали лише у крайових його відділах, поблизу материнської кістки. Також виявляли ділянки клітинного детриту, випадіння гемосидерину як ознаки деструкції еритроцитів.

Водночас у щурів контрольної групи зона дефекту була представлена товстими фібриновими волокнами, між якими містилася значна кількість

еритроцитів, лейкоцитів, а також лімфоцити та залишки зруйнованих клітин (рис. 2 а). У крайових відділах дефекту поблизу материнського кортексу відмічені поодинокі фібробласти витягнутої форми (рис. 2 б) з великими еухромними ядрами, що містили 1–2 ядереця.

У центральній частині мозкового каналу спостерігали реактивні зміни у вигляді формування ділянок ретикулофіброзної тканини з великою кількістю кровоносних капілярів різного діаметра. З боку ендоста на незначних ділянках містилися великі остеобласти, що були розташовані в остеоді у вигляді «частоколу».

Через 7 днів після моделювання дефекту (формування тканинспецифічних структур [4]) у тварин контрольної групи ділянка поміж фрагментами коркового шару була заповнена сіткою молодих кісткових трабекул і фіброретикулярною тканиною. На кісткових трабекулах у лакунах зафіксовані великі остеоцити з ексцентричними ядрами та базофільною цитоплазмою. Щільність остеоцитів була високою. По поверхні молодих трабекул у вигляді «частоколу» містилися функціонально активні остеобласти з розвинутою базофільною цитоплазмою, що свідчить про біосинтез ними макромолекул кісткового матриксу. У міжтрабе-

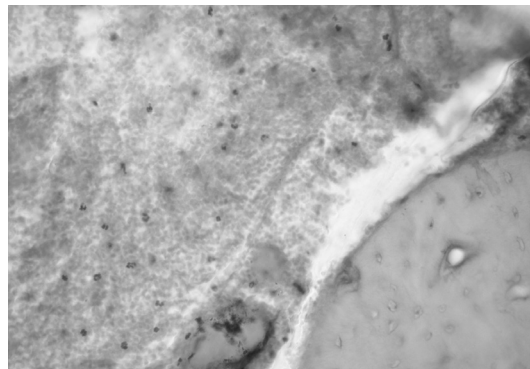
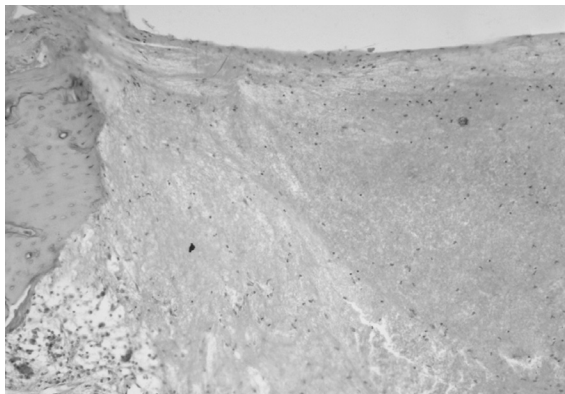
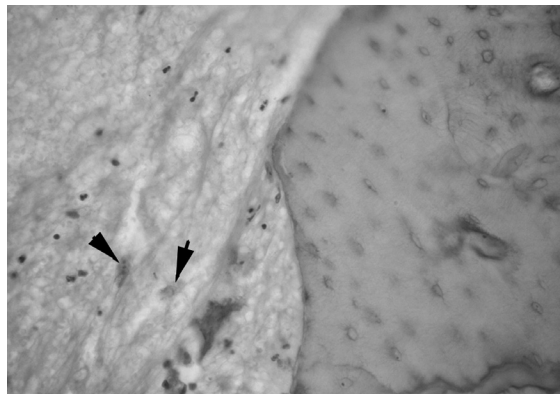


Рис. 1. Фотовідбиток з гістопрепарату. Залишки гематоми без ознак перебудови. 3-я доба. Дія «Мерказолілу». Гематоксилін та еозин. Зб. 150



а



б

Рис. 2. Фотовідбитки з гістопрепаратів: а) фібринові волокна, ділянки еритроцитів, поодинокі лейкоцити, лімфоцити, макрофаги; зб. 60; б) поодинокі фібробласти (стрілка), 3-я доба, зб. 150. Контрольна група. Гематоксилін та еозин

кулярних просторах розташовувалася ретикулофіброзна тканина. На зовнішній поверхні регенерату із кісткових трабекул знаходився зновсформований періост з високою щільністю колагенових волокон. Між ними виявляли фіброласти різної зрілості. На відстані від дефекту періост був потовщений як через активізацію остеогенного шару, що супроводжувалося активним періостальним остеогенезом, так і активізацію фіброзного шару.

У групі тварин, яким вводили «Мерказоліл», зона дефекту була виповнена переважно фіброретикулярною тканиною, що перемежовувалася з ділянками грануляційної тканини, остеїду та невеликими залишками кров'яного згустку.

У процесі морфометричного аналізу (табл. 1) встановлено, що у тварин, яким вводили «Мерказоліл», відносна площа гематоми була збільшеною у 7,97 рази, а відносна площа остеїду, навпаки, — зменшеною у 3,87 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин, що віддзеркалює затримку репаративного остеогенезу під впливом екзогенного «Мерказолілу».

На 14-у добу (стадія диференціації тканин та початок мінералізації [4]) в зоні кісткового діафізарного дефекту стегнової кістки щурів у обох досліджуваних групах спостерігали остеїд, молоду кісткову та фіброретикулярну тканини, залишки гематоми. Проте під час морфометричного аналізу було виявлено відмінності у кількісному складі тканин, які заповнювали дефект (табл. 2). Так, встановлено, що відносна площа кісткової тканини у ділянці дефекту тварин, які отримували «Мерказоліл», була у 1,18 рази меншою в порівнянні з контрольною групою.

Через 21 добу після травматичного ушкодження в зоні діафізарного дефекту щурів контрольної та дослідної груп мало місце формування кісткової тканини, яка з'єднувала краї материнської кістки. Морфометричний аналіз не встановив різниці між відносними площами кісткової тканини у ділянках дефектів тварин контрольної та дослідної груп (табл. 2).

Однак новоутворений кортекс чітко відрізнявся від материнської кістки за структурною організацією — наявністю широких резорбційних порожнин, які були заповнені червоним кістковим мозком, відсутністю характерних для материнської кістки пронизних каналців (рис. 2). Крім того, у кістковій тканині тварин, які отримували «Мерказоліл», кісткові трабекули мали зміни, які свідчать про вторинне порушення структури. Вони містили осередки, котрі відрізнялися від основного масиву матриксу кістки як структурною організацією, так і хаотично розташованими остеоцитами в розширених лакунах. Такі ділянки в кістці були відокремлені базофільними цементними лініями з потовщеними нерівними контурами (рис. 3). У мозковому каналі повної реорганізації кісткового регенерату не виявлено. Зберігалися кісткові трабекули, які подекуди формували великопетлясту сітку. Міжтрабекулярні простори були заповнені червоним кістковим мозком. У кортексі материнської кістки виявлялися порожні лакуни остеоцитів, розширені судинні канали та невеликі осередки лізису матриксу. Встановлені структурні особливості кісткового регенерату та материнської кістки дослідних тварин можуть негативно відбиватися на їх механічних властивостях.

Таблиця 1

Відносні площі гематоми та остеїду в діафізарних дефектах стегнової кістки щурів на 7 добу після операції

Серія експерименту	Відносні площі тканин		
	Гематома, %	ФРТ, %	Остеїд, %
Контроль, n = 8	2,512 ± 0,934	67,078 ± 2,886	30,410 ± 3,653
«Мерказоліл», n = 8	20,034 ± 5,163	76,274 ± 1,699	7,856 ± 1,187
	P < 0,01	P < 0,05	P * < 0,001

Примітка: * P – порівняно з контрольною групою

Таблиця 2

Відносна площа кісткової тканини (%) у діафізарних дефектах стегнової кістки щурів

Термін дослідження, доба	Група тварин	
	Контрольна, n = 8	Введення «Мерказолілу», n = 8
14-а	44,645 ± 1,981	37,633 ± 2,292 P* < 0,05
21-а	59,958 ± 2,582	63,092 ± 3,269 P** > 0,05

Примітка: * P – порівняно з контрольною групою

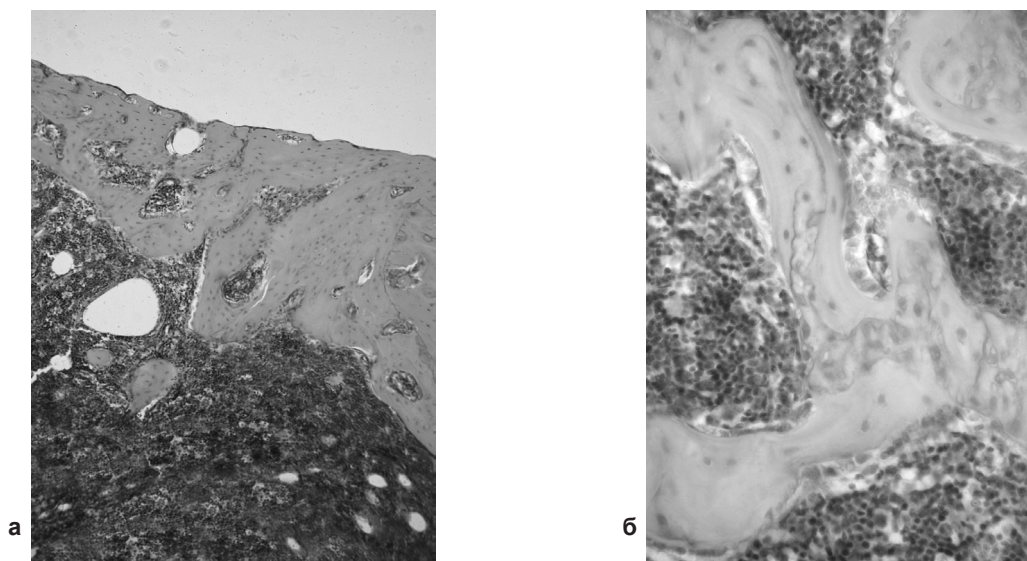


Рис. 3. Фотовідбитки з гістопрепаратів: а) новоутворений кортекс з резорбційними лакунами. Поодинокі невеликі кісткові трабекули у кістковомозковому каналі. Контроль. Зб. 60; б) осередки вторинної перебудови матриксу кісткових трабекул, ділянки з потовщеними базофільними цементними лініями з нерівними контурами. «Мерказоліл». Зб. 150. 21-а доба після операції. Гематоксилін та еозин

ВИСНОВКИ

Зниження рівня тиреоїдних гормонів в організмі білих лабораторних щурів шляхом введення «Мерказолілу» (1 мг/100 г живої ваги) призводить до уповільнення процесів репаративної регенерації у діафізарному дефекті стегнової кістки на всі терміни дослідження.

Порушення регенерації спостерігається вже на ранній термін дослідження (3-ю добу) та проявляється затримкою перебудови гематоми та підвищеною кількістю нейтрофілів. У подальшому (7 та 14-а доба) зафіксовано уповільнення кісткоутворення, що підтверджено зменшеними у порівнянні з контрольною групою площами на 7-у добу остеїду (в 3,8 рази) та на 14-у — кісткової тканини (в 1,18 рази). Якість новоутвореної кістки погіршена через розвиток вторинних деструктивних змін у кісткових трабекулах регенерату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия. Руководство/Г. Г. Автандилов — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Ашукіна Н. О. Морфологія кісткового дефекту в умовах моделювання гіпотиреозу/Н. О. Ашукіна//Український морфологічний альманах. — 2012. — Т. 10, № 2. — С. 6–8.
3. Доклінічне вивчення тиростатичних та тиростимулюючих засобів/О. С. Ром-Богуславська, Т. С. Божко, І. В. Комарова [та ін.]//Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації.— К., 2001. — С. 409–420.

4. Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации (сообщение 1)/Н. А. Корж, Н. В. Дедух//Ортопедия, травматология и протезирование. — 2006. — № 1. — С. 77–84.

5. A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism/J. H. D. Bassett, A. J. Williams, E. Murphy [et al.]/Mol. Endocrinol. — 2008. — Vol. 22, № 2. — P. 501–512.

6. Ashizawa K. Epidemiology of Basedow disease and other thyroid diseases/K. Ashizawa//Nippon Rinsho. — 2006. — Vol. 64, № 12. — P. 2194–2200.

7. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis/Roach H. I., Mehta G., Oreffo R. O. C [et al.]/J. Histochem. Cytochem. — 2003. — Vol. 51. — P. 373–383.

8. Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone/D. A. Stevens, C. B. Harvey, A. J. Scott [et al.]/Molecular Endocrinology. — 2003. — Vol. 17. — P. 1751–1756.

9. Vanderpump M. P. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism/M. P. Vanderpump, W. M. Tunbridge//Thyroid. — 2002. — Vol. 12, № 10. — P. 839–847.

10. Yen P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action//Physiological Reviews. — 2001. — Vol. 81, № 3. — P. 1097–1142.