

МОРФОЛОГІЯ КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ГІПОТИРЕОЗУ

Ашукіна Н.О.

ДУ „Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка НАМН України”, м. Харків

Ашукіна Н.О. Морфологія кісткового дефекту в умовах моделювання гіпотиреозу // Український морфологічний альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 6-8.

Експериментальні дослідження виконані на 50 самцях білих лабораторних щурів віком 6-8 місяців. Встановлено, що зниження рівня тиреоїдних гормонів у організмі тварин шляхом введення мерказолілу (1 мг/100 г живої ваги, per os) призводить до уповільнення процесів регенерації у метафізному дефекті стегнової кістки на всі терміни дослідження. На стадії запалення кількість нейтрофілів збільшується, а клітин фібробластичного диферону – зменшується. Уповільнення кісткоутворення та пригнічення ремоделювання регенерату призводить до зменшення порівняно з контролем відносною площі пластинчастої кісткової тканини через 30 днів після травми.

Ключові слова: регенерація кістки, гіпотиреоз, стегнова кістка щурів.

Ашукіна Н.А. Морфологія костного дефекта в условиях моделирования гипотиреоза // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 6-8.

Экспериментальные исследования проведены на 50 самцах белых лабораторных крыс возрастом 6-8 месяцев. Установлено, что снижение уровня тиреоидных гормонов в организме животных путем введения мерказола (1 мг/100 г живого веса, per os) приводит к замедлению процессов регенерации в метафизарном дефекте бедренной кости на все сроки исследования. На стадии воспаления количество нейтрофилов увеличивается, а клеток фибробластического дифферона – уменьшается. Замедление костеобразования и угнетение ремоделирования регенерата приводит к уменьшению в сравнении с контролем относительной площади пластинчатой костной ткани через 30 суток после травмы.

Ключевые слова: регенерация кости, гипотиреоз, бедренная кость крыс.

Ashukina N. Morphology of bone defect under condition of hypothyroidism modeling // Украинский морфологический альманах. – 2012. – Том 10, № 2. – С. 6-8.

Experimental study was carried out on 50 white laboratory female rats (age 6-8 months). It was determined that decrease of thyroid hormone in the animals' organism by introduce thiamazol (1 mg/100 g body weight, per os) causes the delay of the repair process in the femur metaphyseal defect for all the periods of the research. At the inflammation stage the amount of neutrophils increases, but the amount of the cells of the fibroblastic differon decreases. The retardation of the bone formation and inhibition remodeling of the regenerate causes the reduction of the relative area of lamellar bone as compared with the control at 30 days after the trauma.

Key words: bone repair, hypothyroidism, rat femur.

Вивчення особливостей перебігу репаративної регенерації кісток за умов дії ендогенних і екзогенних факторів залишається однією з актуальних проблем в біології, експериментальній і клінічній травматології та ортопедії. Важливою складовою репаративного остеогенезу є стан кістки на момент виникнення травми, котрий залежить від багатьох чинників. Одним з них є 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 [1]. На сьогодні відомо, що дисбаланс тиреоїдних гормонів в організмі в результаті гіпофункції щитовидної залози спричиняє уповільнення осифікації, порушення формування кортексу та зниження мінералізації [2]. Проте залишається нез'ясованим питання щодо особливостей перебігу репаративного остеогенезу в умовах зниження рівня тиреоїдних гормонів в організмі.

Ціль роботи: на основі морфологічного аналізу дослідити стадійно-часові характеристики репаративного остеогенезу в змодельованих метафізарних дефектах стегнових кісток щурів за умов моделювання гіпотиреозу.

Матеріал та методи дослідження. Роботу виконано на 50 самцях білих лабораторних щурів віком від 6 до 8 міс популяції експериментально-біологічної клініки ДУ “ПІХС ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України”. Вибір статі тварин обумовлений підвищеною частотою зустрічальності порушення функції щитовидної у жінок порівняно з чоловіками [3, 4]. Для експерименту обрано 6-ти – 8-ми місячні тварини, у яких практично зупиняється ріст скелету у довжину [5], а перебіг процесів кісткового ремоделювання, які відбуваються у метафізах довгих кісток, аналогічні до таких у людини [6]. Гіпотиреоз викликали шляхом

внутрішньоплункового введення мерказолілу у дозі 1 мг на 100 живої ваги протягом двох місяців [7]. Контрольні тварини отримували дистильовану воду. Для дослідження репаративного остеогенезу тваринам в умовах асептики під загальним наркозом (аміназін – 10 мг/кг, кетамін – 50 мг/кг) виконували транскортикальний дефект (діаметром 1,3 мм) у дистальному метафізі стегнової кістки. Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування ефіру через 3, 7, 14 та 30 днів після операції відповідно до стадій загосння метафізарного дефекту у щурів [8]. Протокол експериментів було затверджено Комісією з Біоетики Інституту відповідно з правилами “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що використовуються у експериментальних і інших наукових цілях” [9].

Для *гістологічного* дослідження вилучали дистальні метафізи 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), заклали у целофан. Виготовлені гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозинном, пікрофуксином за Ван-Гізон та аналізували під світловим мікроскопом «AxioStar Plus» (Carl Zeiss).

Гістаморфометрія. 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 [10]. Отриманий цифровий матеріал опрацьовували методами варіаційної статистики за допомогою прикладної програми Excel. Результати вважали статистично значимими за $P < 0,05$.

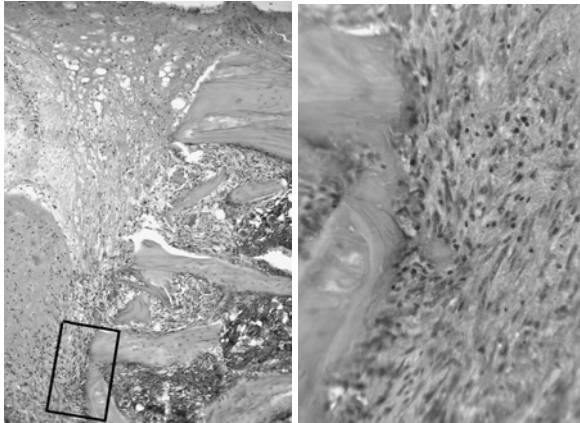


Рис. 1. Ділянка травматичного ушкодження. 3 доба. Гематома на стадії реорганізації та грануляційна тканина на межі з материнською кістковою Контроль. Гематоксилін та созин. а) Зб. 80, б) Активна перебудова країв материнської кістки. Зб. 320.

Результати та їх обговорення. На гістологічних

Таблиця 1. Клітинний склад регенерату в дефекті стегової кістки щурів через 3 доби після операції ($M \pm m$)

Типи клітин	Контроль	Гіпотиреоз
Лімфоцити	22,44±0,96	21,54±0,65; $P^* > 0,05$
Макрофаги	10,44±0,96	11,25±0,69; $P > 0,05$
Плазмоцити	5,11±0,93	5,93±0,46; $P > 0,05$
Нейтрофіли	21,0±0,67	26,31±1,39; $P < 0,01$
Фібробласти	33,56±0,9	23,15±2,06; $P < 0,001$
МСК	9,89±0,51	12,31±0,51; $P < 0,05$

Примітка: * P – порівняно з показниками контрольної групи

Встановлено розбіжності в структурі ушкодженої материнської кістки у контрольних та дослідних тварин. У контролі краї материнських кісткових трабекул на межі з порожниною дефекту були нерівними, безпосередньо на їх поверхні розташовувалися клітини (рис. 1, б), що свідчить про активну перебудову материнської кістки. У дослідних тварин, навпаки, краї материнських трабекул на межі з зоною дефекту зберігали рівномірність та «інертність» (рис. 2, б).

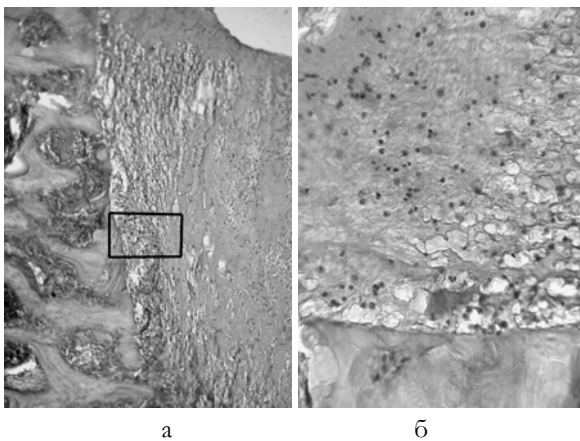


Рис. 2. Зона травматичного ушкодження. 3 доба. Гематома на стадії реорганізації та грануляційна тканина на межі з материнською кісткою. Гіпотиреоз. Гематоксилін та созин. а) Зб. 80, б) «інертність» материнських кісткових трабекул. Зб. 320.

Через 7 днів після операції в ділянці дефекту контрольних тварин виявлялася грануляційна тканина з великою щільністю клітин та кровоносних капілярів різного калібру; фіброретикулярна тканина остеогенного характеру, в якій переважали остеобласти з розвинутою базофільною цитоплазмою та крупни-

препаратах через 3 доби у ділянці дефекту визначали тяжкі фібрину, між якими розташовувалися еритроцити, а також клітини, які є невід'ємною ланкою стадії запалення – лімфоцити, плазмоцити та нейтрофіли (рис. 1, а, 2, а). Морфометричне дослідження клітинного складу регенерату у щурів, що отримували мерказоліл, встановило вірогідне збільшення (у 1,23 рази) кількості нейтрофілів порівняно з показниками контрольної групи (табл. 1), що може негативно впливати на проліферацію фібробластів [11], кількість яких була зниженою порівняно з контролем.

У ділянці дна дефекту контрольних і дослідних тварин виявлено утворення грануляційної тканини із значною кількістю кровоносних капілярів різного калібру. Проте відносна площа грануляційної тканини у дефекті контрольних тварин значно перевищувала аналогічну у досліді, що відбулося й на кількості представлених у ній клітин. Так, кількість малодиференційованих стовбурових клітин у контролі була більшою у 1,24 рази, а кількість фібробластів – у 1,45 порівняно з показниками групи тварин, що отримували мерказоліл (табл. 1).

ми ядрами, що свідчить про активність біосинтетичних процесів, спрямованих на утворення компонентів матриксу. З боку дна дефекту зафіксовані осередки активного остеогенезу у вигляді ділянок остеоїду і молодих кісткових трабекул з великою щільністю остеоцитів та функціонально активних остеобластів.

У дослідних тварин виявлено залишки гематоми на стадії реорганізації та грануляційну тканину, відносна площа якої була більшою у 4,7 рази порівняно з контролем (табл. 2), що свідчить про затримку фази формування тканиноспецифічних структур у кістковому регенераті на фоні змодельованого гіпертиреозу.

Через 14 днів після травми ділянка дефекту контрольних і дослідних тварин була виповнена фіброретикулярною та кістковою тканинами. Проте у контрольних тварин переважала кісткова тканина, площа якої збільшилася відносно попереднього терміну дослідження у 1,73 рази. У щурів, що отримували мерказоліл, більшу частину дефекту займала фіброретикулярна тканина, її відносна площа перевищувала у 2,94 рази показники у контролі (табл. 2).

У материнських кісткових трабекулах дослідних тварин, на відміну від контролю, зафіксовані значні ділянки без остеоцитів, деструктивні мікротріщини.

Через 21 добу після операції регенерат у тварин, які отримували мерказоліл, чітко відмежовувався від материнських кісткових трабекул, котрі мали ознаки деструкції – нерівномірно забарвлений матрикс, ділянки лізису, деструктивні щілини, значні території без клітин. Відносна площа кісткової тканини, яка була представлена потоншеними розрізненими кістковими трабекулами, збільшилася порівняно з попереднім терміном дослідження у 1,38 рази. У міжтрабекулярних просторах розташовувався червоний кістковий мозок, відсоток адипоцитів у якому був

високим, що може бути пов'язане з низькою концентрацією тиреоїдних гормонів в організмі [12]. Відносна площа пластинчастої кісткової тканини була ме-

ншою за показники контролю у 3,94 рази, що свідчить про затримку стадії ремоделювання регенерату.

Таблиця 2. Відносна площа (%) новоутворених тканин в регенераті кісткового дефекту стегнової кістки щурів, які отримували мерказоліл ($M \pm m$, %)

Серії експериментів	Тканини в зоні дефекту	Відносна площа тканин на різні терміни (%)			
		3 доба	7 доба	14 доба	21 доба
Контроль (n=20)	Гематома	77,42±5,12	-	-	-
	Грануляційна тканина	28,46±5,85	4,64±0,8	-	-
	Фіброретикулярна тканина	-	65,05±2,76	24,99±3,9	16,31±1,52
	Грубоволокниста кісткова тканина та остеоїд	-	27,03±3,36	44,87±2,63	31,82±2,4
	Пластинчаста кісткова тканина	-	-	1,93±0,17	16,18±1,23
	Кістковий мозок	-	2,47±1,2	30,36±3,23	37,38±1,36
Гіпотиреоз (n=20)	Гематома	100	78,1±5,4	-	-
	Грануляційна тканина	-	21,89±5,41 <i>P<0,001</i>	-	-
	Фіброретикулярна тканина	-	-	73,41±1,29 <i>P<0,001</i>	35,88±1,7 <i>P<0,001</i>
	Грубоволокниста кісткова тканина та остеоїд	-	-	25,25±1,48 <i>P<0,001</i>	30,64±1,3 <i>P>0,05</i>
	Пластинчаста кісткова тканина	-	-	-	4,26±0,39 <i>P<0,001</i>
	Кістковий мозок	-	-	1,24±0,5 <i>P<0,001</i>	27,63±2,56

Примітка. P – вірогідність порівняно з контрольною групою

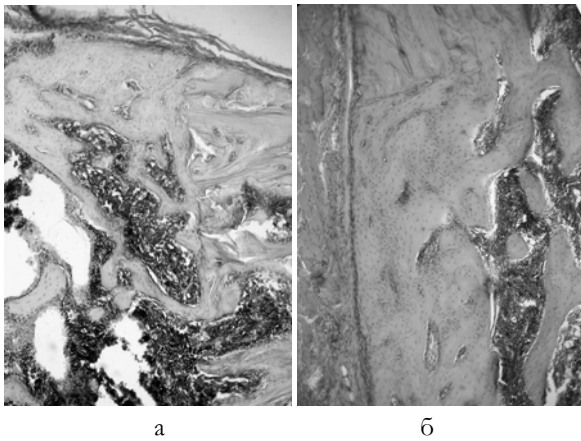


Рис. 3. Кісткова тканина регенерату через 30 днів після виконання травматичного ушкодження: а) контроль; б) введення мерказолілу. Материнська кістка з ознаками деструкції. Розширені судинні порожнини. Гематоксилін та еозин. 36.80.

30 доба. Ділянка дефекту у тварин обох груп була представлена кістковою тканиною. Однак у контрольних тварин спостерігали відновлення кортикального шару кістки на всій території дефекту (рис 3, а), а у дослідних кортекс був відновлений лише на ділянках. У зоні дефекту губчастої кістки тварин, що отримували мерказоліл, виявлені рідко розташовані потоншені кісткові трабекули з нерівними краями та з осередками лізису матриксу. У міжтрабекулярних просторах містився червоний кістковий мозок та розширені судинні порожнини (рис. 3, б). Вказані структурні особливості кісткового регенерату дослідних тварин можуть негативно відбиватися на його механічних властивостях.

Висновок: Таким чином, 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 метафізному кістковому дефекті стегнової кістки на всі терміни дослідження. На стадії запалення збільшується кількість нейтрофілів, зменшується кількість клітин фібробластичного диферону. Уповільнення кісткоутво-

рення починається з 7-ої доби. Пригнічення стадії ремоделювання регенерату відображується у зменшенні порівняно з контролем відносною площею пластинчастої кісткової тканини.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Yen P.M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action // Physiological Reviews. – 2001. – Vol. 81, № 3. – P.1097-1142.
2. 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.
3. 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.
4. Ashizawa K. Epidemiology of Basedow disease and other thyroid diseases / K. Ashizawa // Nippon Rinsho. – 2006. – Vol. 64, № 12. – P. 2194-2200.
5. Temporal analysis of rat growth plates: cessation of growth with age despite presence of a physis/ Roach H.L., Mehta G., Oreffo R.O.C [et al.] // J. Histochem. Cytochem. – 2003. – Vol. 51. – P. 373-383.
6. Iwaniec U.T. Animal models of osteoporosis / U.T. Iwaniec, R.T. Turner // In: Osteoporosis, 3rd ed. [editors: R Marcus, D. Feldman, D.A. Nelson, C.J. Rosen]. – Amsterdam: Elsevier, 2008. – P. 985–1110.
7. Доклінічне вивчення тиростатичних та тироїд-стимулюючих засобів / О.С. Ром-Богуславська, Т.С. Божко, І.В. Комарова [та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації.– К., 2001. – С. 409-420.
8. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации (сообщение 1) / Н.А. Корж, Н.В. Делух // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 77-84.
9. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
10. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство / Г.Г. Автандилов – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
11. Шехтер А.Б., Серов В.В. Воспаление, адаптивная регенерация и дисрегенерация (анализ межклеточных взаимодействий) // Архив патологии. – 1991. – Т.53, № 7. – С. 7-14.
12. 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.

Надійшла 25.05.2012 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін