

РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКИ ПРИ АЛІМЕНТАРНОМУ ДЕФІЦИТІ КАЛЬЦІЮ

Дєдх Н.В., Нікольченко О.А.

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

Епідеміологічні дані свідчать про недостатній вміст кальцію у раціоні харчування як дорослого, так і дитячого населення різних регіонів України [9], а також багатьох країн світу [14, 16]. В Україні проблема “кальцієвого голоду” та дизрегенерації кістки при остеопорозі набуває особливої актуальності. Низький вміст кальцію у раціоні харчування сприяє виникненню структурних порушень кістки, що доведено численними експериментальними та клінічними дослідженнями [3, 9, 13, 20, 21].

Відомо, що у експериментальних тварин на тлі модельованого аліментарного дефіциту кальцію спостерігається порушення перебігу остеорепації [4, 18, 19]. Ця проблема є актуальною для біології та медицини [7, 8]. Невисвітленими залишаються морфологічні особливості формування кісткового регенерату на ранніх стадіях в умовах низькокальцієвої дієти.

Мета дослідження – вивчити стадійно-часові характеристики репаративного остеогенезу на клітинному та тканинному рівнях в умовах аліментарного дефіциту кальцію в лабораторних щурів.

Матеріал та методи дослідження. Експерименти проведені на 140 нелінійних білих щурах популяції експериментально-біологічної клініки ДУ “ІПХС ім. проф. М.І.Ситенка АМНУ”.

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) [5, 10]. Всі оперативні втручання в щурів проведені під загальним знеболюванням (тіопентал, в/м, 25 мг/

кг живої маси) в умовах асептики та антисептики. Евтаназію тварин здійснювали шляхом передозування дієтилового 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.).

Модель аліментарного дефіциту кальцію відтворювали в щурів-самців з 1-місячного віку шляхом їх утримання на низькокальцієвій зерново-овочевій дієті впродовж 5 міс. Добовий раціон харчування тварин дослідної групи містив 0,03% кальцію (0,029% фосфору, 233 МО вітаміну D₂), а контрольної групи – 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 [8, 15, 17]. Для вивчення репаративного остеогенезу на тлі модельованого 5-місячного аліментарного дефіциту кальцію в щурів-самців у дистальному метафізі стегнової кістки 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 відповідно до стадій репаративного остеогенезу в щурів: щоденно впродовж 1-7 діб, потім через 14, 21, 28 діб після травматичного ушкодження. Дослідження кісткового регенерату провели гістологічним [11], електронно-мікроскопічним [12] та морфометричним [1]

методами. Для визначення достовірної різниці між вибірковими середніми застосовували критерій Ст'юдента.

Власні дослідження та обговорення. В зоні кісткового дефекту впродовж 1-3 діб після операції (запально-проліферативна стадія репаративного остеогенезу) в тварин контрольної та дослідної груп відзначені 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 “стільникоподібні” просвіти як прообрази формування синусоїдних капілярів (1 доба) та сформовані капіляри (3 доби), виявлялись малодиференційовані сполучнотканинні клітини (МДСК), а також фіброласти на різних стадіях диференціювання. Особливістю перебігу регенерації було те, що в ділянці дефекту в щурів контрольної групи відзначались скупчення макрофагів зі структурними ознаками активної секреції та фагоцитозу (рис. 1), тоді як грануляційна тканина дослідних тварин характеризувалась низькою чисельною щільністю макрофагів, будова яких свідчить про їх низьку активність функціонування (рис. 2).

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

У регенераті тварин з модельованим аліментарним дефіцитом кальцію через 3 доби після операції залишився високим відсоток нейтрофілів, а відсоток макрофагів зменшився та поступився показнику в контрольній групі в 1,9 рази (таблиця). Відомо, що макрофаги беруть участь у поєднанні ексудативної та проліферативної фаз запалення, тому зниження їх кількості та активності негативно впливає на бактерицидну функцію, детоксикацію та очищення ділянки ушкодження кістки від продуктів розпаду клітин і матриксу. Водночас, самі макрофаги є джерелом факторів росту, монокінів (відомо більше 40), які беруть участь у процесах проліферації та диференціації фіброblastів, гранулоцитів, лімфоцитів, моноцитів та ін. клітин, тобто макрофаги регулюють перебіг запального процесу, впливаючи на хемотаксис клітин та їх кооперацію [2, 3].

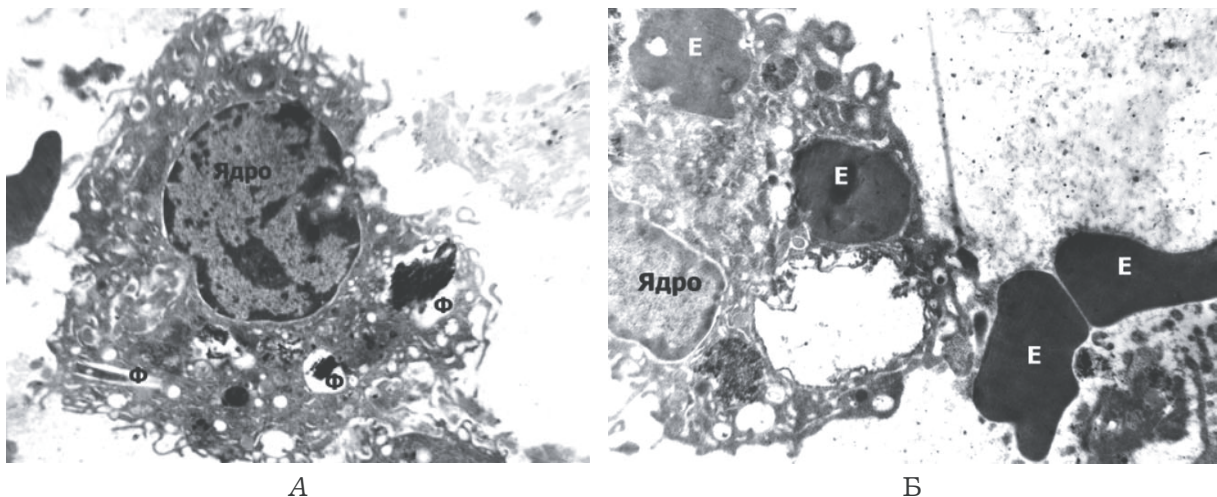


Рис. 1. Макрофаги фагоцитуючого типу із численними вакуолями та мікрровиростами цитоплазми. Регенерат щурів контрольної групи, 3 доби після операції. Трансмісійна електронна мікроскопія, контрастування за Рейнольдсом: А) фагосоми (Φ). Зб. 5900; Б) фагоцитоз еритроцитів (Е). Зб. 10400.

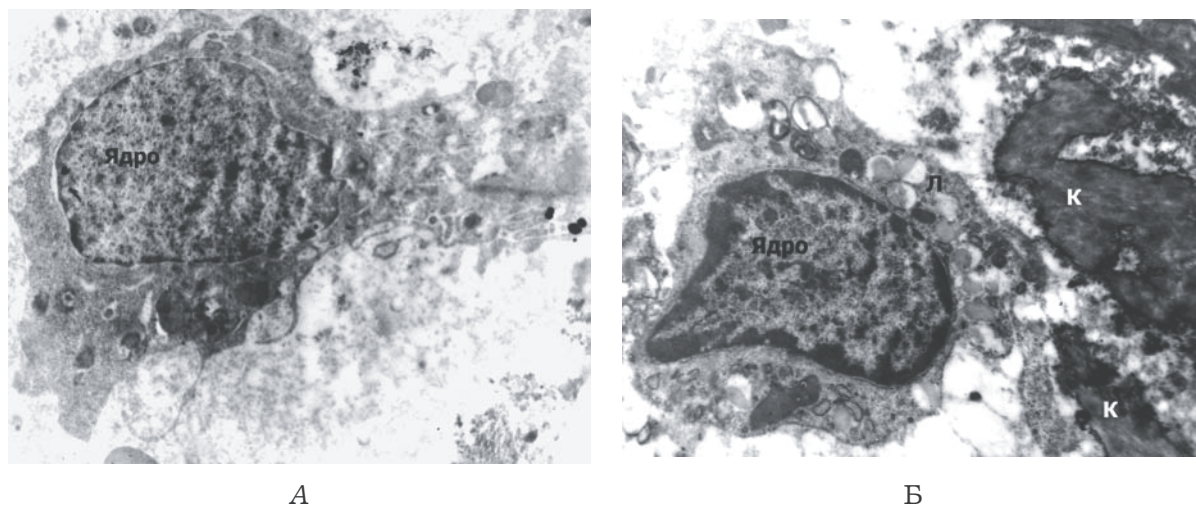


Рис. 2. Макрофаги з вузьким шаром цитоплазми та помірною кількістю її мікробіосом. Регенерат щурів дослідної групи, 3 доби після операції. Трансмісійна електронна мікроскопія, контрастування за Рейнольдсом: А) помірна кількість вакуолей у цитоплазмі. Зб. 9800; Б) скупчення гетерогенних лізосом (Л) у цитоплазмі макрофага, розташованого біля кісткових уламків (К). Зб. 9200.

Таблиця. Клітинний склад у дефекті метафіза стегнової кістки в щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 1 та 3 доби після операції (М±m, %)

Типи клітин	Контроль		Дослід	
	1 доба (n=5)	3 доби (n=5)	1 доба (n=5)	3 доби (n=5)
Нейтрофільні гранулоцити	32,4±4,6	16,7±1,1*	43,1±5,5	48,1±7,2
Лімфоцити	24,2±2,4	18,4±0,5*	22,5±4,0	15,7±3,5**
Макрофаги	19,0±0,6	20,7±2,4	16,4±2,0	10,8±0,9**
Плазмоцити	10,5±2,0	8,6±0,8	14,3±3,3	7,0±1,4**
Тканинні базофіли	2,1±0,4	6,2±1,2*	Не виявлені	2,9±0,6
Фібробласти	Не виявлені	25,4±2,1	Не виявлені	4,2±0,5
МДСК	11,8±0,7	4,0±0,6*	3,7±0,9	11,3±1,6**

Примітки: * - $p < 0,05$ при порівнянні 3 доби з першою добою в контрольних тварин; ** - $p < 0,05$ при порівнянні 3 доби з першою добою в дослідних тварин.

Меншим у 6 разів був і відсоток фібробластів у контролі при порівнянні з дослідом (таблиця). Ці клітини синтезують колаген 1 типу, який є основним компонентом матриксу фібронетикулярної тканини, остеїда та кісткової тканини.

Отримані дані свідчать, що в зоні травматичного ушкодження кістки відзначаються морфологічні ознаки фази запалення зі слабо вираженою проліферацією клітин і що в умовах аліментарного дефіциту кальцію в кістковому регенераті щурів уже на ранніх стадіях репаративного остеогенезу спостерігається порушення співвідношення клітин.

Через 5 діб (стадія початку диференціювання різних видів сполучних тканин регенерату) в щурів дослідної групи центральні ділянки дефекту містили за-

лишки фібринових мас та кісткові уламки, навколо яких розташовувались переважно грануляційна та фібронетикулярна тканини, а також поодинокі “профілі” новоутворених кісткових трабекул. Порівняно з контрольною групою площа грануляційної тканини була в 1,6 рази більшою, а фібронетикулярної й новоутвореної кісткової тканин відповідно в 1,4 та 2,9 рази меншою (рис. 3).

На подальших термінах дослідження (7 та 14 діб – стадії реорганізації регенерату та мінералізації кісткової тканини) в щурів обох груп спостерігалось зменшення площі грануляційної тканини та збільшення площі новоутвореної грубоволокнистої кісткової тканини порівняно з попередніми термінами. Проте в дефектах тварин дослідної групи ділянки грануляційної тканини за пло-

цею переважали показники контрольної групи в 2,3 та 2,27 рази відповідно до цих термінів, а кісткової тканини – поступались у 2,8 та 2,14 рази (рис. 3).

У щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 21 добу (стадія початку ремодельовання кісткового регенерату) після травматичного ушкодження значна територія дефекту представлена фіброретикулярною тканиною, площа якої перевищувала показник контролю в 1,55 рази (рис. 3). Новоутворена кісткова тканина представлена у вигляді трабекул переважно грубоволокнистої структури, її площа була в 1,4 рази меншою від відповідного показника в контролі.

Через 28 днів (стадія ремодельовання кісткового регенерату) в дефекті щурів контрольної та дослідної груп визначались новоутворені кісткові трабекули великопетлистої 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 рази відповідно), а площа пластинчастої кісткової тканини – менша в 1,9 рази (рис. 4). Склад тканин регенерату на даний термін репаративного остеогенезу свідчить, що в тварин, яких утримували на низькокальцієвій дієті, спостерігається уповільнення процесу кісткоутворення при порівнянні із тваринами контрольної групи.

Таким чином, особливістю кісткового регенерату в щурів із модельованим аліментарним дефіцитом кальцію на ранніх термінах є менша кількість клітин фібробластичного диферону та підвищена кількість клітин запалення. Виявлене нами при аліментарному дефіциті кальцію зменшення кількості макрофагів та їх низької функціональної активності в регенераті є передумовою для порушення диференціації клітин у фібробластичному та остеобластичному напрямках і стадійно-часової затримки перебігу репаративного остеогенезу.

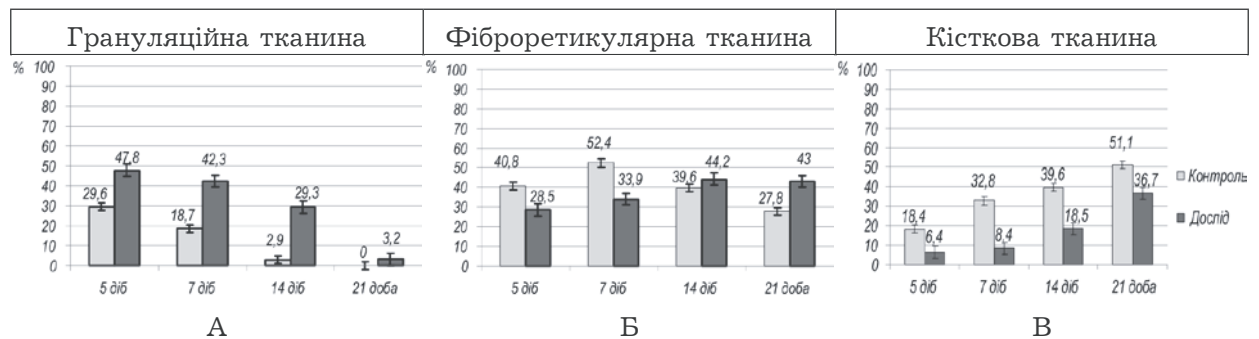


Рис. 3. Відносні площі новоутворених тканин у модельованому дефекті дистального метафіза стегнової кістки щурів на різних термінах дослідження репаративного остеогенезу.

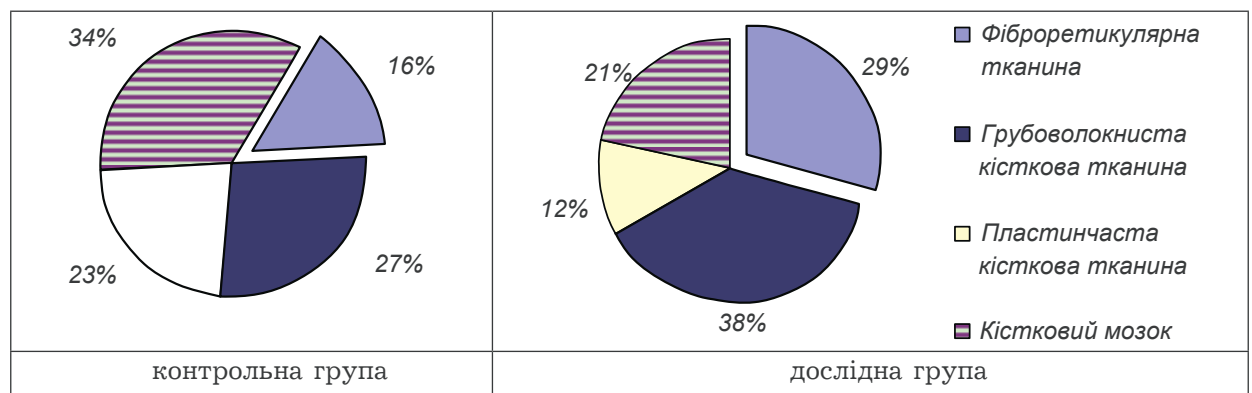


Рис. 4. Діаграма співвідношення площі тканин у складі регенерату метафізарного дефекту в щурів з аліментарним дефіцитом кальцію через 28 днів після операції.

Література

1. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия: [руководство] / Г.Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 384 с.
2. Воспаление: [руководство для врачей] / под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. - М.: Медицина, 1995. - 640 с.
3. *Дедух Н.В.* Гормональные и локальные регуляторы моделирования и ремоделирования кости / Н.В. Дедух, С.В. Малышкина // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение: [монография] / под ред. Н.А. Коржа, В.В. Поворознюка, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. - Харьков: Золотые страницы, 2002. - Глава 2. - С. 30-42.
4. *Дедух Н.В., Никольченко О.А., Побел А.М.* Регенерація кісткової тканини при остеопорозі (експериментальне дослідження) // Укр. медичний альманах. - 2003. - Т.6, №2. - С.66-69.
5. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року: офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. - Офіц. веб-сайт. - (Міжнародний документ Ради Європи). - Режим доступу до документа: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137
6. *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.
7. *Корж Н.А.* Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости (сообщение 2) / Н.А. Корж, К.К. Романенко, Л.Д. Горидова // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2006. - № 1. - С. 84-90.
8. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / [И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк]. - К.: Вища школа, 1983. - 383 с.
9. *Поворознюк В.В.* Фактическое питание и метаболизм костной ткани / В.В. Поворознюк, Н.В. Григорьева, Ю.Г. Григоров, Т.Н. Семесько // Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика и лечение: [монография] / под ред. Н.А. Коржа, В.В. Поворознюка, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. - Харьков: Золотые страницы, 2002. - Глава 38. - С. 410-424.
10. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. - Офіц. веб-сайт. - Режим доступу до документа : у <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=3447-15>.
11. *Саркисов Д.С.* Микроскопическая техника [Текст] / Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина, 1996. — 542 с.
12. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих: Пер. с англ. -1980. -220 с.
13. *Chen H.* Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur / Chen H. D. Hayakawa, S. Emura [et al.] // *Histol. Histopathol.* - 2002. - Vol. 17, № 4. - P. 1129-1135.
14. *Angus R.M.* Nutrition intake of pre- and postmenopausal Austrian women with special reference to calcium / R.M. Angus, N.A. Pocock, J.A. Eisman // *Eur. J. Clin. Nutr.* - 1996. - Vol. 63. - P. 950-953.
15. Harlan Teklad Global Diets® [Електронний ресурс]. - Режим доступу до сайту: <http://www.teklad.com/global.asp>.
16. *Hotzel D.* The contribution of nutrition to the pathogenesis of osteoporosis / D. Hotzel, A. Zittermann // *Z. Ernährungswiss.* - 1989. - Bd. 28, № 1. - S. 17-31.
17. LabDiet® [Електронний ресурс]. - Режим доступу до сайту: http://www.labdiet.com/products_frm.htm.
18. Osteoporosis influences on the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model // H. Namkung-Matthai, R. Appleyard, J. Jansen [et al.] // *Bone.* - 2001. - Vol. 28, № 1. - P. 80-86.
19. Osteoporosis influences on the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet / T. Kubo, T. Shiga, J. Hashimoto [et al.] // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 68. - P. 197-202.
20. *Pecker R.R.* Prevention of osteoporosis: calcium nutrition / R.R. Pecker // *Osteoporos Int.* - 1993. - № 3, suppl. 1. - P. 163-165.
21. Response of cortical and cancellous bones to mild calcium deficiency in young growing female rats: a bone histomorphometry study / J. Iwamoto, T. Takeda, Y. Sato, J.K. Yeh // *Exp. Anim.* - 2004. - Vol. 53, № 4. - P. 347-354.