

## РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ У ЩУРІВ З АЛІМЕНТАРНИМ ОСТЕОПОРОЗОМ ПІД ВПЛИВОМ ПРЕПАРАТУ АЛЬФА-D<sub>3</sub> ТЕВА

Побел Є.А., Дєдх Н.В., Бенгус Л.М.

*ДУ «Запорізька медична академія післядипломної освіти»,  
ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України»*

На цей час у науковій літературі є чимало даних стосовно впливу вітаміну D<sub>3</sub> на кісткову тканину та її регенерацію після переломів довгих кісток скелета [1, 2, 3]. Встановлено, що вітамін D<sub>3</sub> та його активні метаболіти позитивно впливають на загоєння переломів довгих кісток скелета та процеси мінералізації [1, 2, 4, 5].

Однак наукові розробки в цьому напрямку стосуються, головним чином, впливу вітаміну D<sub>3</sub> на клінічні, рентгенологічні, денситометричні та біомеханічні показники пацієнтів з переломами довгих кісток скелета. Стосовно морфологічних даних, то вони переважно пов'язані з експериментальними світлооптичними дослідженнями впливу комбінованих препаратів кальцію та вітаміну D<sub>3</sub> та активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub> на репаративний остеогенез [4–6]. Доведено, що активні метаболіти вітаміну D<sub>3</sub> забезпечують формування повноцінного регенерату та подальше ремоделювання губчастої кістки в зоні травматичного ушкодження й сприяють нормальним темпам кісткової консолідації [7].

Вплив активного метаболіту вітаміну D<sub>3</sub> на регенерацію кістки вивчали в умовах остеопорузу на моделі оваріоектомізованих щурів [8]. Нами було проведено дослідження регенерації кістки при моделюванні аліментарного остеопорузу [9]. Однак, глибокі ультраструктурні зміни, що відбуваються в зоні травматичного ушкодження довгих кісток під впливом активного метаболіту вітаміну D<sub>3</sub> – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, залишаються нерозкритими. У зв'язку із цим актуальним є дослідження клітинних та субклітинних механізмів, що мають місце в зоні перелому кістки під впливом активних метаболітів вітаміну D<sub>3</sub> та порівняння даних з морфологічними проявами як у ділянці травматичного ушкодження, так і в зонах, розташованих проксимально від ділянки перелому. Одним з ефективних сучасних препаратів, що містять активний метаболіт вітаміну D<sub>3</sub> – 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, є препарат «Альфа D<sub>3</sub>–Тева».

**Мета роботи** – на основі даних морфологічного дослідження встановити особливості перебігу процесу регенерації в зоні кісткового де-

фекту дистального метафіза стегна білих щурів з аліментарним остеопорозом після терапії препаратом «Альфа D<sub>3</sub>–Тева».

### **Матеріал та методи дослідження**

Модель аліментарного дефіциту кальцію відтворювали в білих лабораторних щурів 1 міс віку шляхом їх утримання на низькокальцієвій зерново-овочевій дієті. Добовий раціон харчування тварин містив 0,03% кальцію. Розрахунок вмісту кальцію в раціоні щурів був проведений з урахуванням вітчизняних норм [10] та міжнародних стандартів утримання лабораторних тварин [11, 12]. Робота зі щурами проводилася з дотриманням міжнародних та державних нормативів з біоетики [13, 14].

Для вивчення репаративного остеогенезу в умовах змодельованого аліментарного дефіциту кальцію (протягом 3 міс.) щурам-самцям у дистальному метафізі стегнової кістки виконували травматичне ушкодження у вигляді транскортикального дефекту діаметром 1,3 мм.

*Серії експерименту.* Дослідження включало три серії експерименту та було виконано на 55 білих лабораторних щурах.

1 серія – 5 інтактних тварин (для оцінки стану проксимального відділу стегнової кістки).

2 серія – 25 щурів зі змодельованим остеопорозом і травматичним ушкодженням без лікування, контроль.

3 серія – 25 щурів зі змодельованим остеопорозом і травматичним ушкодженням з подальшим лікуванням препаратом «Альфа D<sub>3</sub>–Тева», дослід.

Препарат вводили тваринам per os з розрахунку 0,1 мг/кг ваги тварини, починаючи із другого дня після операції та протягом термінів дослідження.

Тварин виводили з експерименту на 3, 7, 14, 21 і 28 добу після травматичного ушкодження. Обробку фрагментів стегнової кістки (із зоною травматичного ушкодження, а також проксимально від ділянки перелому) проводили стандартними гістологічними методами [15]. Зрізи забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еози-

ном, а також пікрофуксином за Ван-Гізон. Для оцінки колагенових волокон у регенераті була поставлена реакція з піросиріусом червоним [16, 17]. Морфометричний аналіз площ тканин регенерату проводили за допомогою методу Р. Г. Автандилова [18].

Матеріал був досліджений також за допомогою класичних електронно-мікроскопічних методів у трансмісійному електронному мікроскопі ЕМВ-100БР [19]. Цифрові негативи електроннограм виготовляли за допомогою фотокамери Canon EOS-300D.

### Результати дослідження та їх обговорення

Морфологічна оцінка перебігу репаративного остеогенезу в лікованих та нелікованих щурів. При морфологічній оцінці регенерату в тварин, пролікованих альфакальцидолом, виявлено, що у всі досліджені терміни мали місце відмінні риси структурної організації тканин, що заповнюють зону травматичного ушкодження.

На 3 добу в регенераті дослідної серії, поряд із клітинами запалення – нейтрофілами, лімфоцитами, макрофагами та поодинокими плазматичними клітинами зрідка були присутні фіброblastи та остеобласти (рис. 1). Для макрофагів дослідної серії була характерна висока фагоцитарна активність (рис. 2).

В регенераті контрольної серії тварин були виявлені тільки клітини запалення та поодинокі макрофаги.

У щурів контрольної та дослідної серій у регенераті присутні залишки кров'яного згустка, що були розташовані поміж фібриновими тяжа-

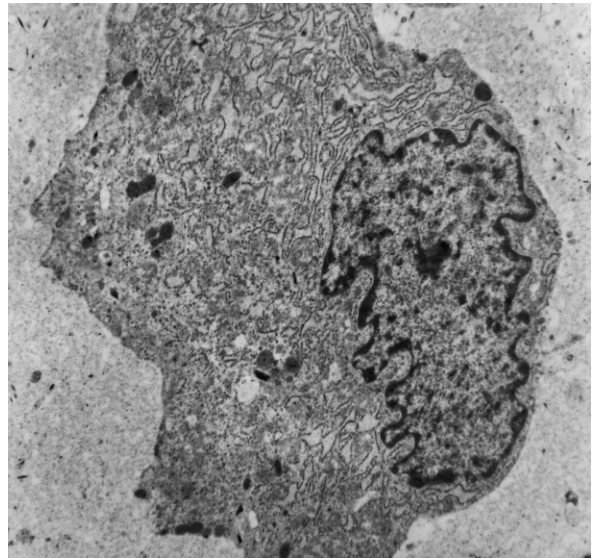


Рис. 1. Фотовідбиток з електроннограми. Остеобласти в ділянці травматичного ушкодження. Дослід. Контролювання за Рейнольдсом. Зб. 18000.

ми, однак площа таких ділянок була більшою в контрольній серії. Зона кортексу, прилегла до дефекта, в тварин дослідної групи містила ознаки остеокластичної резорбції (рис. 3), що свідчить про перебудову кісткових уламків. У контрольних тварин ознак перебудови уламків не виявлено.

На 7 добу в ділянці дефекту в тварин дослідної групи був присутній остеоїд з високою щільністю остеобластів (рис. 4а), розташованих серед колагенових волокон з ознаками кальцифікації (рис. 4б). Остеоїд межував з фіброре-

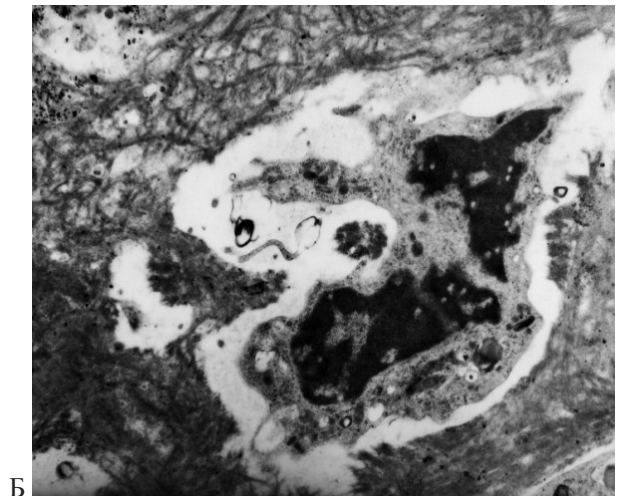
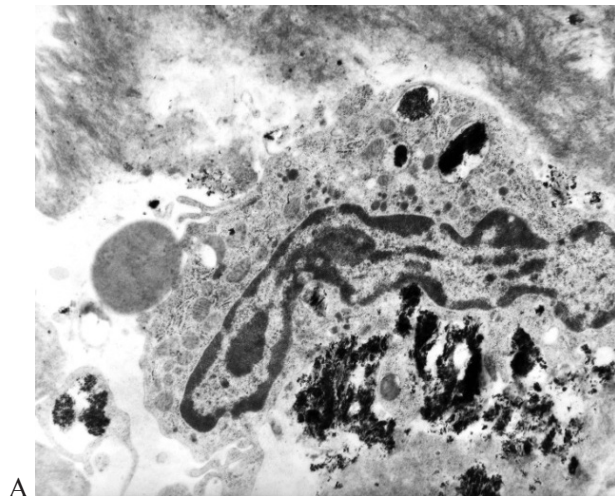
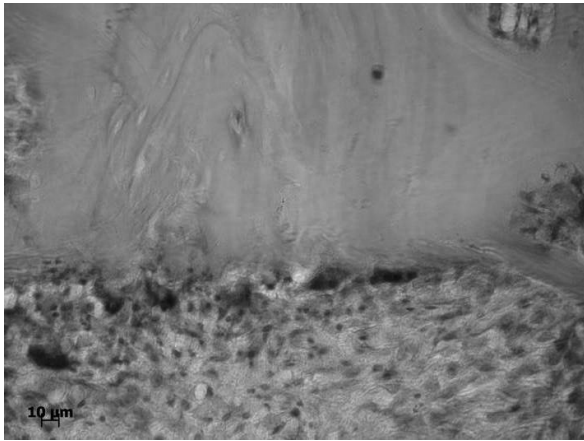


Рис. 2. Фотовідбитки з електроннограм.

Примітки: А – макрофаг, що фагоцитує. Фагосоми макрофага вміщують фагоцитовану кісткову стружку. Зб. 8000; Б – макрофаг, що фагоцитує фібрин. Інтенсивна гетерохроматизація та фрагментація лопатей клітинного ядра. Дослід. Зб. 6000. Контрастовано за Рейнольдсом.





**Рис. 3.** Фрагмент кістки, що прилягає до ділянки перелому. Остеокластична резорбція. Дослід. Гематоксилін та еозин. Зб. 400.

тикулярною тканиною, що містила функціонально активні фібробласти.

В літературі є дані, що D-гормон стимулює експресію трансформуючого фактора росту  $\beta$  та інсуліноподібного фактора росту-2, підвищує щільність рецепторів інсуліноподібного фактора росту-1, що обумовлює проліферацію остеобластів та їх диференціювання [20, 21]. У глибокій зоні дефекту розташовувалися грубоволокнисті кісткові трабекули. На поверхні материнської трабекулярної кістки, прилеглої до дефекту, виявлявся широкий шар новоутвореного остеоїда, що сприяло потовщенню кісткових трабекул.

Перебудова уламків кістки, прилеглих до зони травматичного ушкодження, тривала. В кортекс материнської кістки проростали судини, навколо яких формувалася фіброретикулярна тканина.

У тварин контрольної серії ділянки остеоїда виявлялися тільки в глибоких зонах дефекту, решта території була заповнена фіброретикулярною тканиною. Виявлялися слабо виражені ознаки перебудови кісткових відламків. Щільність остеобластів у регенераті тварин контрольної групи була значно нижчою порівняно із тваринами дослідної серії.

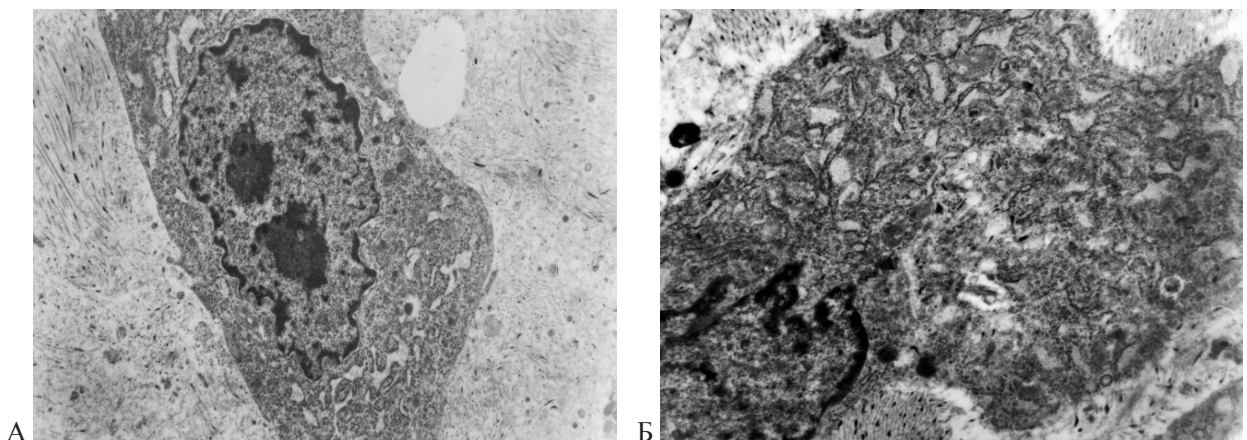
На 14 добу в регенераті дослідної серії тварин на ділянках, прилеглих до кортексу та трабекулярної кістки, розташовувалася кісткова тканина різного ступеня зрілості, яка межувала з невеликими острівцями фіброретикулярної тканини остеобластичного характеру (рис. 5).

У тварин контрольної серії в ділянці дефекту переважала фіброретикулярна тканина з фібробластами та макрофагами й грубоволокнисті кісткові трабекули, розташовані в основному в зоні материнської губчастої кістки.

На 21 та 28 добу дефект у тварин, пролікованих альфакальцидолом, був заповнений кістковою тканиною (рис. 6), при цьому на 28 добу в зоні кортексу переважала новоутворена кісткова тканина пластинчастої структури, в тварин контрольної серії – губчаста кістка.

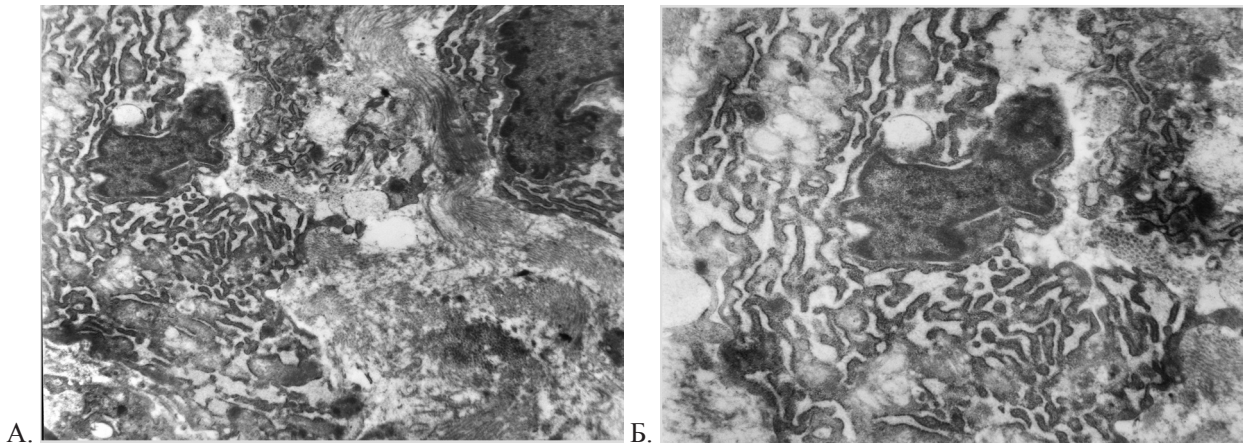
В зоні губчастої кістки, прилеглої до ділянки дефекту, виявлено формування остеоїда на поверхні кістки, що сприяло потовщенню кісткових трабекул. При поляризаційно-оптичному дослідженні колагену виявлена практично однакова зрілість у материнській кістці та регенераті (рис. 7).

При морфометричному дослідженні (28 доба) було встановлено, що в тварин, пролікованих альфакальцидолом, ділянка травматично-



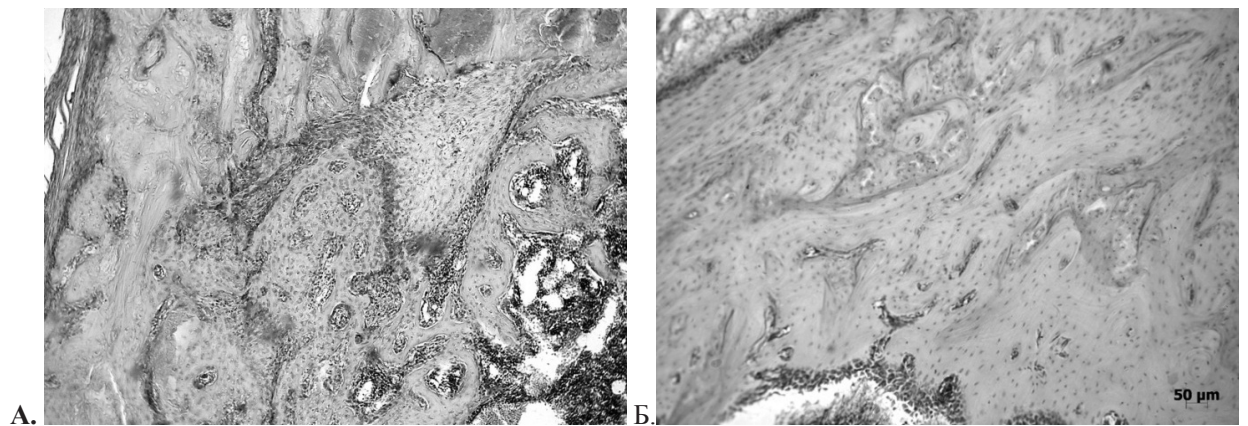
**Рис. 4.** Фотовідбитки з електронограм.

Примітки: А – остеобластоподібна клітина. Два крупних, центрально розташованих ядра в ядрі клітини. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки та численні вільні рибосоми й полісоми в цитоплазмі. Зб. 6000; Б – остеобласт. Мінералізація колагенових волокон. Дослід. Зб. 8000. Контрастовано за Рейнольдсом.



**Рис. 5. Фотовідбитки з електронограм.**

Примітки: А – скупчення функціонально активних остеобластів. Зб. 8000; Б – остеобласт із численними каналцями гранулярної ЕПС, комплексом Гольджі та мітохондріями. Дослід. Зб. 15600. Контрастовано за Рейнольдсом.



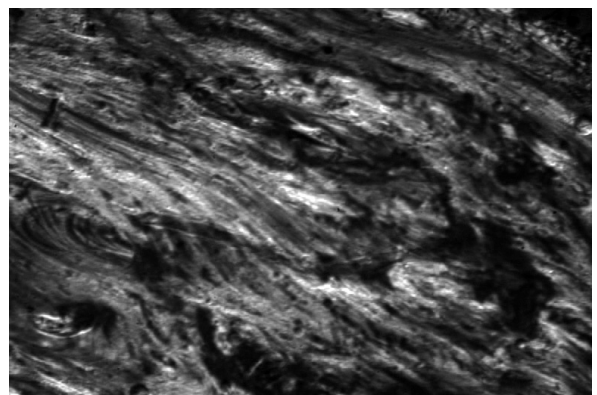
**Рис. 6. Кісткова тканина в зоні травматичного ушкодження.**

Примітки: А – на 21 добу. Зб. 80; Б – на 28 добу. Дослід. Зб. 200. Гематоксилін та еозин.

го ушкодження була заповнена кістковою тканиною, в той час як у нелікованих тварин поряд з кістковою тканиною зберігалися осередки фіброретикулярної тканини (65,7% і 24,2% відповідно) (рис. 8).

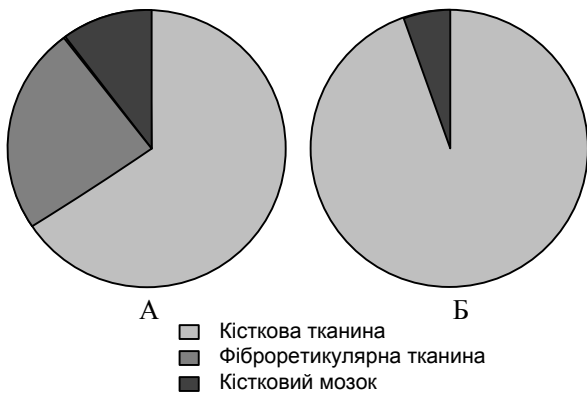
Стан кісткової тканини в умовах травматичного ушкодження. Наступним підрозділом дослідження було вивчення впливу травматичного ушкодження на стан кісткової тканини стегнової кістки шурів у ділянках кінцівки, розташованих проксимально до зони перелому. Виявлено, що в тварин із травматичним ушкодженням на тлі остеопорозу, пролікованих альфакальциолом, товщина кісткових трабекул у дослідженому відділі стегнової кістки була на 36% більшою в порівнянні з контрольною групою, а кількість кісткових трабекул у цій зоні була в 1,5 рази вищою. Після проведеної терапії остеointegraція губчастої кістки з компактною була підвищена в 2,2 рази, відношення обсягу дослідженої зони губ-

частої кістки до обсягу кісткових трабекул підвищилося на 22%; обсяг лакун резорбції кістки до обсягу кісткових трабекул зменшився в 2,8 рази (рис. 9, рис. 10).

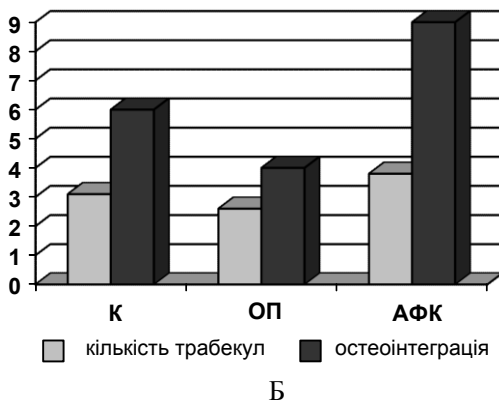
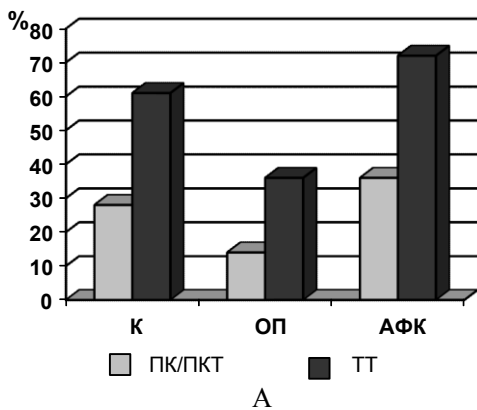


**Рис. 7. Колагенові волокна в материнській кістці та ділянці травматичного ушкодження. Дослід. Реакція з пікросиріусом червоним. Поляризоване світло. Мікроскоп Polmu-A. Зб. 80.**



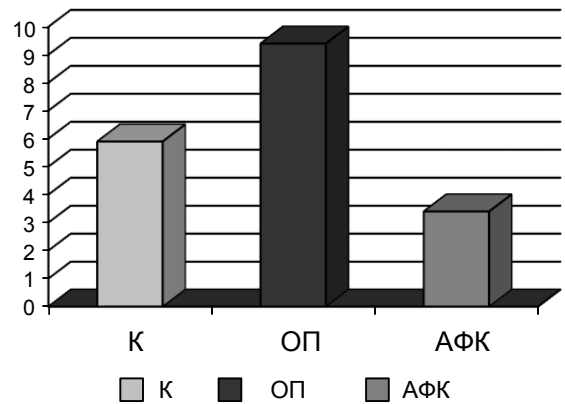


**Рис. 8.** Тканинний склад регенерату на 28 добу після травматичного ушкодження (%).  
Примітки: А – контрольні тварини; Б – дослідні тварини.



**Рис. 9.** Співвідношення площі кісткових трабекул до площі трабекулярної кістки (А) та кількість кісткових трабекул і остеointegraція з компактною кісткою (Б).  
Примітки: ПК – площа губчастої кістки, ПКТ – площа кісткових трабекул; ТТ – товщина кісткових трабекул; К – контроль; ОП – аліментарний остеопороз; АФК – альфакальцидол.

Таким чином, проведені дослідження показали, що лікування щурів з аліментарним остеопорозом та транскортикальним дефектом дистального метафіза стегна препаратом «Альфа D<sub>3</sub>-Тева» на ранніх термінах сприяло більш ак-



**Рис. 10.** Співвідношення площі кістки з лакунами резорбції до обсягу кісткових трабекул.

Примітки: ПЕК – площа кістки з лакунами резорбції, ПКТ – площа кісткових трабекул; К – контроль; ОП – аліментарний остеопороз; АФК – альфакальцидол.

тивному очищенню кісткової рани за рахунок високої фагоцитарної активності макрофагів.

У пролікованих альфакальцидолом тварин на 7 добу дослідження регенерат був представлений остеїдом з високою щільністю остеобластів, що межував з фіброретикулярною тканиною. В колагенових волокнах були виявлені ознаки кальцифікації. Глибока зона дефекту містила грубоволокнисті кісткові трабекули.

У тварин контрольної серії на цей термін ділянки остеїда виявлялися тільки в глибоких зонах дефекту, решта території була заповнена фіброретикулярною тканиною.

Регенерат пролікованих тварин на 14 добу дослідження був представлений кістковою тканиною різного ступеня зрілості, що межувала з невеличкими осередками фіброретикулярної тканини остеобластичного характеру.

У нелікованих тварин у ділянці дефекту переважала фіброретикулярна тканина з фібробластами та макрофагами й грубоволокнисті кісткові трабекули, розташовані в основному в зоні материнської губчастої кістки.

Зона дефекту в тварин, пролікованих альфакальцидолом, на 21 та 28 добу була заповнена кістковою тканиною. В зоні кортексу на 28 добу дослідження переважала новоутворена кісткова тканина пластинчастої структури, а в тварин контрольної серії – губчаста кісткова тканина.

Оскільки відомо, що травматичне ушкодження довгих кісток супроводжується розвитком остеопенії та остеопорозу або прогресуванням остеопорозу у вищерозташованих відділах кістки [22, 23], якщо перелом стався при остеопорозі, були проведені морфометричні дослідження ді-

лянки стегнової кістки, розташованої проксимально до зони дефекту тварин. Виявлено, що товщина та кількість кісткових трабекул, остеоінтеграція губчастої та компактної кістки, відношення обсягу зони губчастої кістки до обсягу кісткових трабекул у тварин, пролікованих альфакальцидолом, значно перевищували такі показники нелікованих тварин з остеопорозом.

## Література

1. Корж Н.А., Дедух Н.В. Профилактика остеопороза и остеопоротических переломов // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2010. – № 3. – С. 120–124.
2. Дедух Н.В. Кальций–D<sub>3</sub> Никомед в регенерации кости // Матеріали VI Українського симпозиуму «Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика та лікування». – 2005. – Т.8, №1–3. – С. 53–54.
3. Viapiana O., Gatti D., Rossini M. et al. Vitamin D and fractures: a systematic review // Reumatismo. – 2007. – Vol. 59, №1. – P. 15–19.
4. Ito M., Azuma Y., Ohta T., Komoriya K. Effects of ultrasound and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth factor secretion in co-cultures of osteoblasts and endothelial cells // Ultrasound in Medicine and Biology. – 2000. – Vol. 26. (Iss. 1). – P. 161–166.
5. Fu L., Tang T., Miao Y. et al. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on fracture healing and bone remodeling in ovariectomized rat's femur // Bone. – 2009. – Vol. 44. – P. 893–898.
6. Delgado-Martínez A.D., Martínez M.E., Carrascal M.T. et al. Effect of 25-OH-vitamin D on fracture healing in elderly rats // Journal of Orthopaedic Research. – 1998. – Vol. 16 (Iss. 6). – P. 650–653.
7. Brumbaugh P.F., Speer D.P., Pitt M.J.A. Metabolite of vitamin D that promotes bone repair // AJP. – 1982. – Vol. 106, №2. – P. 171–179.
8. Поворознюк В.В., Климовицкий В.Ф., Дедух Н.В. Морфологические особенности регенерации транскортикального метадиафизарного дефекта при лечении животных альфакальцидолом // Український медичний альманах – 2013. – Т.16, №1. – С. 35–39.
9. Корж Н.А., Дедух Н.В., Горидова Л.Д. и др. Альфакальцидол в регенерации кости // Ортопедия, травматология и протезирование – 2013. – №1. – С. 73–83.
10. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
11. Международные стандарты содержания лабораторных животных. – Электронный ресурс. – Точка доступа: www.labdiet.com.
12. Международные стандарты содержания лабораторных животных. – Электронный ресурс. – Точка доступа: www.teklad.com.
13. 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?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
14. Закон України №3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 26).
15. Саркисов Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника / М.: Медицина, 1996. – 542 с.
16. Figueiredo B.L., Sampo G.P., Ricardo C. et al. Picrosirius-polarization staining method as an efficient histopathological tool for collagenolysis detection in vesical prolapse lesions // Micron. – 2007. – Vol.38, №6. – P. 580–583.
17. Li X.J., Lei T., Gao J.H. Detection of collagens in hypertrophic scars by picrosirius polarization method // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. – 2002. – Vol.422, №3. – P. 217–219.
18. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: [руководство] / М.: Медицина, 1990. – 384 с.
19. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих // М.: Мир, 1975. – 324 с.
20. Van Driel M., Pols H.A.P., Leeuwem J.P.T.M. Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites // Curr. Pharm. Des. – 2004 – Vol.10. – P. 2535–2555.
21. Корж Н.А., Дедух Н.В., Побел Е.А. Альфакальцидол в лечении остеопороза и профилактике остеопоротических переломов // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2011. – №3. – С. 117–125.
22. Kanis J.A., Johnell O., De Laet C. et al. A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk // Bone. – 2004. – Vol. 35. – P. 375–382.
23. van Helden S., Cals J., Kessels F. et al. Risk of new clinical fractures within 2 years following a fracture // Osteoporos Int. – 2006. – Vol. 17. – P. 348–354.