

**М.В.Погорелов**

Сумський державний  
університет

**Ключові слова:** репаративна регенерація, гіпергідрія, гістологія, тривкість, хімічний склад.

*Надійшла:* 27.07.2008

*Прийнята:* 11.09.2008

УДК [616.718.5-001.5-089.2-06:616-089.811]-092.9

## **РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ЗРІЛОГО ВІКУ В УМОВАХ ГІПООСМОЛЯРНОЇ ГІПЕРГІДРІЇ ЛЕГКОГО СТУПЕНЯ**

**Робота виконана в відповідності з планом наукових досліджень Сумського державного університету медичного інституту і є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри анатомії людини "Морфофункціональні особливості перебудови скелета та внутрішніх органів в умовах порушеного гомеостазу" (№ держреєстрації 0107U001287).**

**Резюме.** В роботі вивчені особливості репаративного остеогенезу великогомілкової кістки в умовах гіпоосмолярної гіпергідратації легкого ступеню. В експерименті було використано 48 щурів зрілого віку, яким наносився дефект середньої третини великогомілкової кістки. Експериментальній групі моделювали гіпоосмолярну гіпергідрію, використовуючи препарат «Минирін» (Ferring). Для аналізу використовували методи опису гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином та за Ван-Гізона наступної їх морфометрією, біохімічний аналіз крові, вивчення тривкісних характеристик кісток, растрову електронну мікроскопію з зондовим аналізом поверхні та спектрофотометрію досліджуваних кісток. За умов проведеного експерименту виникають порушення клітинних та тканинних співвідношень у регенераті, що формується, не змінюючи при цьому стадійність перебігу процесів репаративного остеогенезу. Водночас порушення водно-сольового гомеостазу призводить до уповільнення формування повноцінної кісткової мозолі. Зміни органічної складової не супроводжуються порушенням мінерального гомеостазу кісткової тканини та регенерату, що підтверджується даними РЕММА та визначенням тривкісних параметрів.

**Морфологія.** – 2008. – Т. II, № 4. – С.31-36.

© М.В.Погорелов, 2008

### **Pogorelov M.V. Bone repair of the tibia in adult rats during hypoosmolar overhydration.**

**Summary.** We studied futures of the tibia repair during overhydration. We made tibia defect for 48 adult rats. Experimental group took "Minirin" (Ferring) for modeling overhydration. We used hystological, morphometric, biochemical, SEM methods for studies of the bone repair. Was detected that experimental rats has disorders in cells ant tissues relationships but this is not change stages of the bone repair. In same time disorders of aqua balance lowers processes of the forming of the new bone tissue. Changes of the organic compartment didn't change mineral homeostasis of the hew bone that detected by SEM.

**Key words:** Bone repair, overhydria, hystology, chemical compound.

### **Вступ**

Репаративний остеогенез можна описати як сукупність процесів, що призводять до повного відновлення будови та функцій травмованої кістки (Гололобов В.Г., 2001). Перелом викликає порушення цілісності кровоносних судин, м'язів, шкірних покривів. Послідовність процесів відновлення кістки умовно поділено на стадії (Гололобов В.Г. і соавт, 2003; Корж Н.А. та співавт, 2006). Більшість невдач у зрошенні переломів пов'язують саме з першою стадією регенерації (стадія запалення) на якій можливий "біологічний зрив" генетично закладеної програми відновлення: "активація клітин – пролі-

ферація та диференціювання – формування тканин", що в кінці не призводить до формування в ділянці дефекту достатнього об'єму хрящової та кісткової тканини (Корж Н.А. та співавт., 2006; Bostrom M.P.G. et al., 1998).

Гістологічний аналіз біопсійного й післяопераційного матеріалу показав принципову подібність гістологічних картин при різних варіантах дисрегенерацій – це наявність у регенератах великих вогнищ волокнистої сполучної тканини, що свідчить про порушення остеобластичного диференціювання клітин регенерату (Корж Н.А. та співавт., 2006а, 2006в). Тому, навіть при повноцінному лікуванні переломів, велике значення має

стан організму до моменту травми (Webb J.C., 2000).

Одним з недостатньо вивчених факторів, що здатний впливати на репаративний остеогенез є порушення водно-сольового обміну (Кладчекко Л.А. та співавт., 2001). Серед різноманітних варіантів дисбалансу водного сектору організму виділяється гіпоосмолярна гіпергідрія, яка призводить до порушення обміну води та електролітів як у позаклітинному, так, пізніше, і у внутрішньоклітинному секторі (Иванов С.И., 1990). Як відомо, гіпоосмолярна гіпергідрія характеризується зменшенням осмотичного тиску позаклітинної рідини при збільшенні загальної кількості води. Цей вид порушень може виникати при ентеральному введенні в організм великої кількості води («водне отруєння»), при гострій нирковій недостатності, синдромі Пархона (в результаті масивного викиду в кров АДГ). Інколи до цього може призвести введення навіть невеликої кількості води, наприклад через зонд для промивання шлунку, особливо якщо у хворого наявна недостатність функції нирок (Giammaro R., 1994).

#### **Мета**

Метою роботи є визначення особливостей перебігу репаративного остеогенезу у тварин зрілого віку в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню.

#### **Матеріали та методи**

Для проведення експерименту було використано 48 безпорідних щурів-самців 7-ми місячного віку, які були поділені на експериментальну та контрольну серії. Всім тваринам стоматологічним бором наносився дефект діаметром 2 мм в середній третині діафізу великогомілкової кістки (Hiltunen A. et al., 1993). Експериментальним тварин перед нанесенням травми моделювали гіпоосмолярну гіпергідратацію легкого ступеню. Для досягнення гіпергідрії тваринам протягом 10 днів зондово вводили дистильовану воду в кількості 10 мл тричі на добу. Також використовували виварені знесолені харчі для зменшення надходження солей в організм. Для запобігання фізіологічної підтримки водного гомеостазу та досягнення необхідного ступеню гідратації щурам вводили синтетичний аналог АДГ (вазопресину) – «Минирін» (Ferring). Препарат має виражену антидіуретичну дію і вводився тваринам зондово разом з питною водою 2 рази на добу у дозі 0,01 мг.

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом через 5, 10, 15, та 24 доби після травми, що відповідає стадіям регенерації (Корж Н.А. та співавт., 2006). На дослідження забирали кров та великогомілкові кістки. Для комплексної оцінки перебігу репаративного остеогенезу використовували методи опису гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином та за Ван-Гізон з наступ-

ної їх морфометрією, біохімічний аналіз крові, вивчення тривкісних характеристик кісток, растрову електронну мікроскопію з зондовим аналізом поверхні та спектрофотометрію досліджуваних кісток.

#### **Результати та їх обговорення**

В умовах змодельованої гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню відмічається незначні зрушення процесів регенерації кістки. Через 5 днів після нанесення дефекту в регенераті переважає молода добре васкуляризована грануляційна тканина, відсоток якої дорівнює  $22,85 \pm 0,17\%$ . Кількість та площа судин відповідають контрольній серії тварин. Серед клітин переважають фібробласти та макрофаги. Формування фібробластично-макрофагального диферона повинно сприяти оптимальному перебігу регенераторних процесів. Прогностично благоприємним фактором є широка внутрішньодиферонна гетероморфія клітин. В достатній кількості зустрічаються молоді, гинучі та секретуючі клітини. Площа гематоми зростає незначно – лише на 2,56%. Біля материнської кістки відмічається значна кількість секретуючих фібробластів, що формують тяжі колагенових волокон. Новоутворена фіброретикулярна тканина добре васкуляризована з великою кількістю периваскулоцитів навколо судин, однак її площа менше за контрольні показники на 6,78%. В периостальному шарі помітні мітози камбіальних елементів окістя, посилюється базофілія клітин.

Через 10 днів після нанесення дефекту помітна деяка затримка формування регенерату, що може бути результатом порушення міжклітинних взаємодій в першій фазі репаративного процесу (рис. 1).

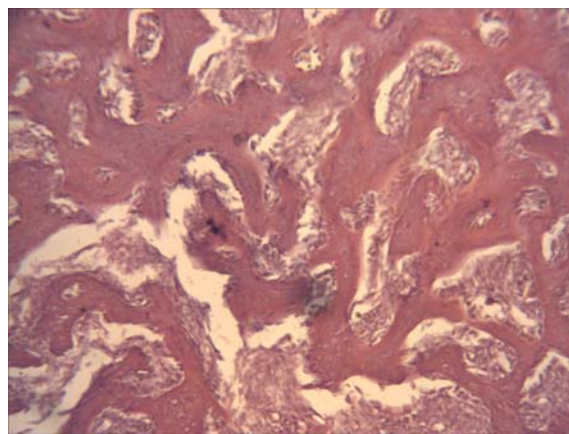


Рис. 1. Ділянка дефекту діафізу великогомілкової кістки через 10 днів після нанесення дефекту в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеню. Забарвлення гематоксилін-еозином.  $\times 400$ .

Якісно регенерат представлений фіброретикулярною та молодою грубоволокнистою кістковою тканинами. Поміж петлями останньої відмі-

чаються залишки грануляційної тканини, площа якої на 9,48% перевищує контрольні показники. Затримка регенераторних процесів виявляється також у зменшенні площі грубоволокнистої кісткової тканини на 12,94% (рис. 2). Серед судин регенерату зустрічається повнокров'я, що можливо пов'язано з гіпергідрією тканин. Остеобласти на поверхні трабекул якісно не відрізняють-

ся від контролю, але помітне зменшення кількості клітинних елементів. В останніх виявляється крупні світлі ядра з чіткими ядерцями, ядра деяких клітин займають ексцентричне положення в цитоплазмі. Зменшення кількості клітин свідчить про затримку проліферативних процесів та порушення міжклітинної кооперації.

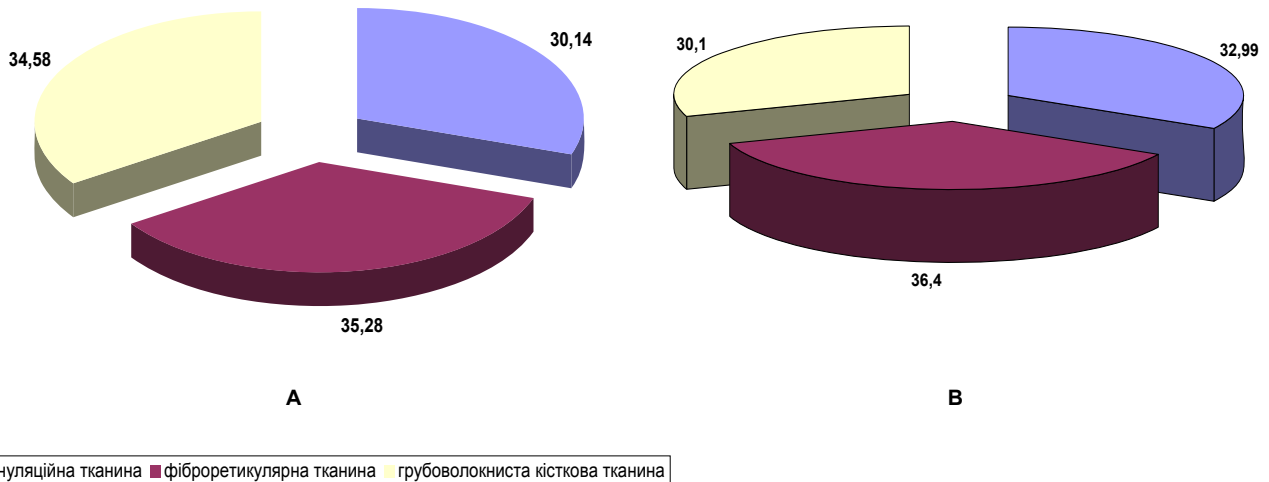


Рис. 2. Процентне відношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура зрілого віку через 10 діб після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеня).

Порушення тканинних співвідношень у попередній термін спостереження призводить до подальшої затримки формування регенерату. Через 15 днів після нанесення дірчастого дефекту відмічаються значні за площею масиви фібронетикулярної тканини, що не є характерним для даної стадії репарації. Різниця з контролем

складає 11,14%. Подібний феномен можна пояснити порушенням макрофагального ланцюга в першій стадії репаративного остеогенезу. Наряду з цим спостерігається зменшення вмісту пластинчастої кісткової тканини на 8,92%.

Як видно з графіку (рис. 3), вміст грубоволокнистої тканини майже не змінюється.

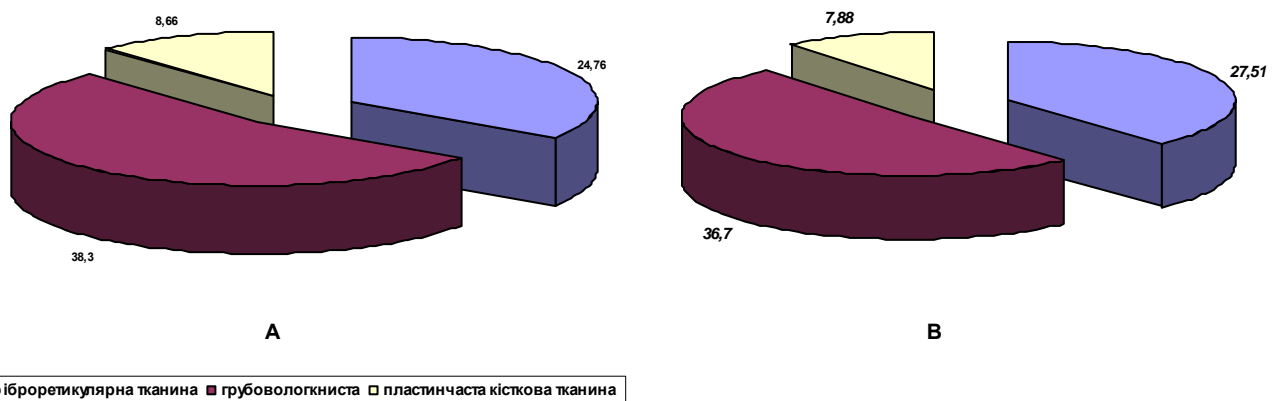


Рис. 3. Процентне відношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки щура зрілого віку через 15 діб після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеня).

На її поверхні зменшується кількість остеобластів (у порівнянні з контролем) та зростає мозаїчність забарвлення кісткових балок: відмі-

чається зростання їх базофілія по периферії. Товщина останніх також зменшується у порівнянні з контролем на 6,21% в периферичних відділах та

на 8,37% – в центрі дефекту. Таким чином, регенерат великогомілкової кістки на 15 добу після травми представлений характерним для даного терміну тканинним гістеоном, але спостерігається порушення кількісного складу новоутворених тканин.

Вищеописані процеси призводять до порушення тканинних співвідношень та морфології регенерату через 24 доби після нанесення дефекту. Кортикальна пластинка майже повністю відновлена за рахунок пластинчастої кістки, що утворена переважно первинними остеонами зі зменшеною кількістю остеоцитів на поверхні пластинок. Але площа пластинчастої кістки на 14,07% менше за аналогічний показник контролю. Місцями спостерігаються залишки грубоволокнистої кісткової тканини, що формує дрібнопетлясту сітку трабекул. Порушуються зв'язки новоутвореної кісткової тканини з материнською, місцями спостерігаються широкі розриви. На межі з регенератом відмічаються місця скопичення остеокластів, що не є характерною ознакою даної стадії та може свідчити про незавершеність процесів інтеграції регенерату та уповільнення його ремоделювання. Глибокі шари регенерату представлені в основному грубоволокнистою кістковою тканиною (рис. 4). Площа останньої перевищує контроль на 7,93% (рис. 5). Товщина трабекул менше за контроль на 8,34% на периферії та на 6,92% – в центрі дефекту. Кількість та площа судин не відрізняється від контролю, але спостерігаються повнокровні судини та периваскулярний набряк у кістковому мозку.

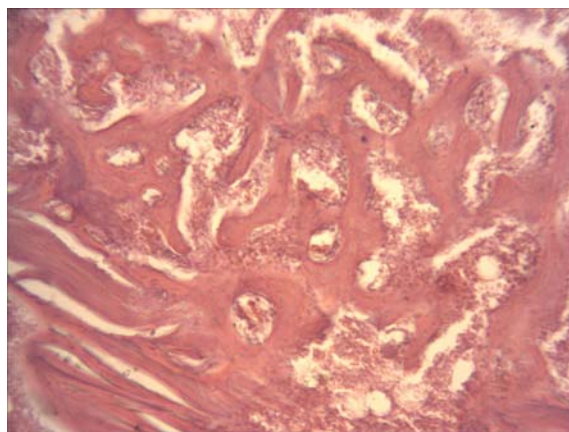


Рис. 4. Ділянка дефекту діафізу великогомілкової кістки через 10 днів після нанесення дефекту в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеня. Забарвлення гематоксилін-еозин.  $\times 400$ .

Починаючи з перших термінів спостереження, відбуваються зміни всіх досліджуваних біохімічних показників крові (рис. 6). Рівень кальцію крові достовірно зменшується через 10 днів на 8,03% та незначно відхиляючись, залишається меншим за контроль навіть через 24 доби. Подібна тенденція може характеризувати як гіпергідрію організму, так і зростання мобілізації кальцію з плазми за умов порушення ремоделювання кісткової тканини. Опосередковано на порушення процесів перебудови мінералізованого матриксу вказує зменшення рівню лужної фосфатази, що менше за показники контрольної серії відповідно на 6,79%, 5,97%, 6,89% та 6,29%.

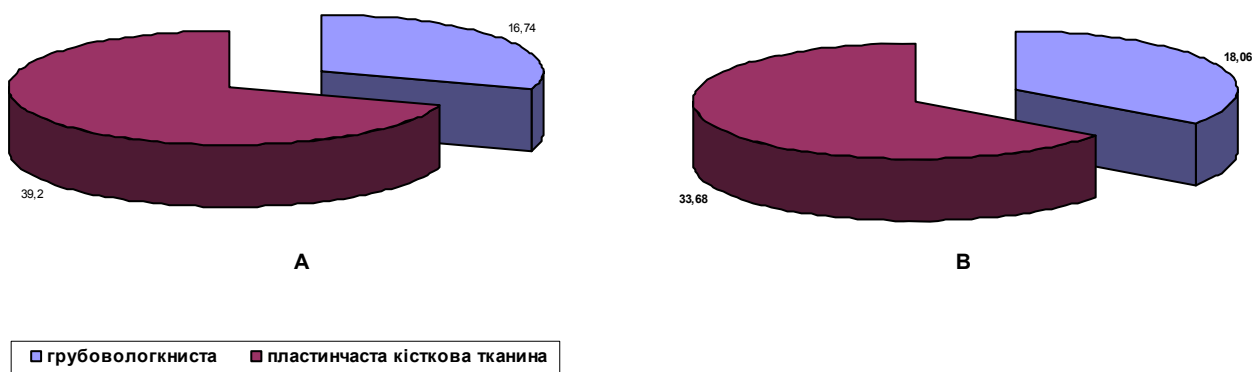


Рис. 5. Процентне відношення тканинного складу регенерату великогомілкової кістки через 24 доби після нанесення дефекту (А – контроль, В – за умов гіпоосмолярної гіпергідрії легкого ступеня).

Рівень білку крові змінюється недостовірно протягом всіх термінів спостереження, але має тенденцію до зростання. Зменшення рівню білка в контрольній серії характеризує переважання анаболічних процесів, що супроводжують процеси організації органічного матриксу кістки. Тому зростання білка у експериментальній серії

може свідчити про зниження синтезу колагенової складової регенерату.

Вивчення морфології регенерату методом растрової мікроскопії показало наявність змін, що відповідають гістологічній картині. В терміни 10 та 15 днів після нанесення травми спостерігається витончення новоутворених кісткових балок та

зростання площини міжбалочного простору. При збільшенні у 2000-4000 разів відмічається наявність порожніх остеоцитарних лакун як на поверхні новоутвореної кістки, так і в товщі материнського матриксу. Через 24 доби відмічається неоднорідність кортикальної пластинки,

що утворена як пластинчастою так і грубоволокнистою кістковою тканиною. Вивчення хімічного складу поверхні регенерату та материнської кістки методом зондового аналізу не показало достовірної різниці з контролем у всі терміни спостереження.

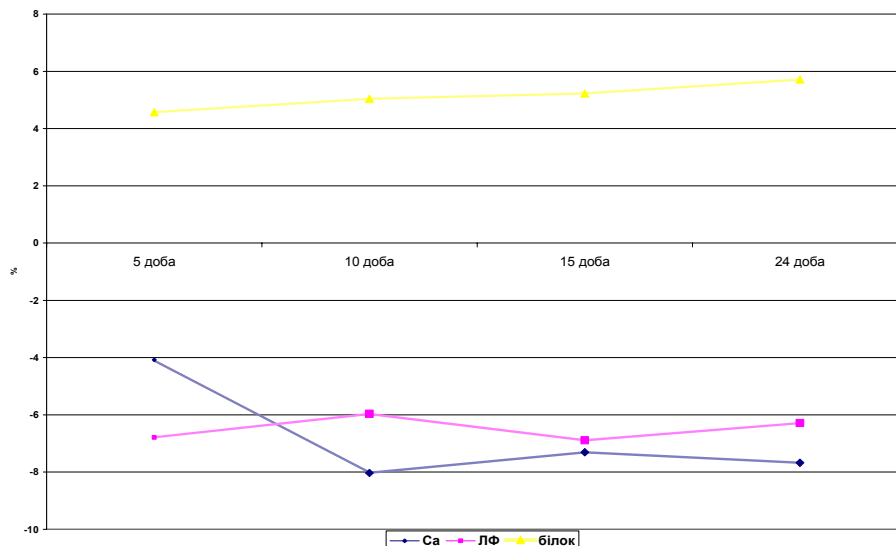


Рис. 6. Динаміка змін біохімічних показників крові щурів зрілого віку в умовах гіпоосмолярної гіпергідратації легкого ступеня в різні терміни репаративного остеогенезу.

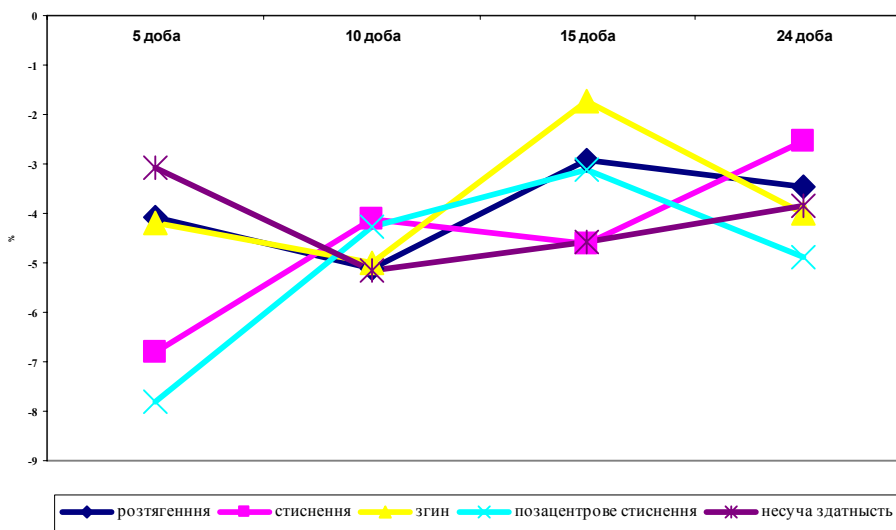


Рис. 7. Динаміка змін тривісних характеристик великогомілкових кісток щурів в умовах гіпоосмолярної гіпергідратації легкого ступеня в різні терміни репаративного остеогенезу.

Незначно відрізняються від контролю також показники тривкості досліджуваних кісток. Як видно з графіку (рис. 7), межа тривкості на розтягнення, згин та несуча здатність кістки залишаються незмінними протягом всього терміну спостереження, хоча і мають тенденцію до зменшення. Натомість відмічено зменшення тривкості на стиснення та позацентрове стиснення через 5 дб відповідно на 6,82% та 7,81%. В інші

терміни спостереження різниця з контролем є недостовірною. Ці данні добре корелюють з показниками мінералізації кісткового матриксу, що також не зазнають суттєвих зрушень протягом всіх термінів репаративного остеогенезу.

Визначення хімічного складу кісток щурів, що перебували в умовах гіпоосмолярної гіпергідрії, не показало зрушень у обміні основних макро- та мікроелементів кісткової тканини. Так

рівень кальцію, магнію, калію, марганцю та міді недостовірно відрізняється від контролю протягом усіх термінів спостереження.

#### **Підсумок**

Таким чином, гіпоосмолярна гіпергідрія легкого ступеню призводить до порушення клітинних та тканинних співвідношень у регенераті, що формується не змінюючи при цьому стадійність перебігу процесів репаративного остеогенезу. Водночас порушення водно-сольового гомеостазу призводить до уповільнення формуван-

ня повноцінної кісткової мозолі. Зміни органічної складової не супроводжуються порушенням мінерального гомеостазу кісткової тканини та регенерату, що підтверджується даними РЕММА та визначенням тривікісних параметрів.

#### **Перспективи подальших розробок**

В подальшому планується провести комплексне дослідження по вивченню особливостей репаративного осеогенезу у щурів різних вікових груп за умов гіпоосмолярної гіпергідрії різного ступеню важкості.

### **Літературні джерела**

Аксенов С. И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов / С. И. Аксенов. - М.: Наука, 1990. – 117 с.

Гололобов В. Г. Скелетные ткани. Посттравматическая регенерация : [руководство по гистологии. Т. I] / В. Г. Гололобов. – СПб. : СпецЛит, 2001. – С. 328-336.

Гололобов В. Г. Стволовые стромальные клетки и остеобластический клеточный дифферон / В. Г. Гололобов, Р. В. Деев // Морфология. – 2003. – № 1. – С. 9-19.

Особенности метаболизма компонентов регенерата кости при различных условиях репаративного остеогенеза / Л. А. Кладченко, Л. Д. Горидова, С. В. Малышкина, К. К. Романенко // Український медичний альманах. – 2001. – Т. 4, № 4. – С. 67-72.

Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Локальные факторы, влияющие на заживление перелома / Н. А. Корж, Л. Д. Горидова, К. К. Романенко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 2. – С. 99-105.

Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации / Н. А. Корж, Н. В. Дедух // Ортопе-

дия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 76-84.

Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Системные факторы, влияющие на заживление перелома / Н. А. Корж, Н. В. Дедух, О. А. Никольченко // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 2. – С. 93-99.

Корж Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости / Н. А. Корж, К. К. Романенко, Л. Д. Горидова // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006. – № 1. – С. 84-90.

Bostrom M. P. G. Transforming growth factor beta in fracture repair / M. P. G. Bostrom, P. Asnis // Clin. Orthop. – 1998. – Vol. 355 – S. – P. 124-131.

Giammaro R. Fluid, Electrolite and Acid-Base Physiology / R. Giammaro // Health Science Center, 1994. – V. 5. – № 3. – P. 1 - 6.

Hiltunen A. A. Standardized experimental fracture in the mouse tibia / A. Hiltunen, E. Vuorio, H. T. Ago // J. Orthop. Res. – 1993. – Vol. 11. – P. 305-312.

Webb J. C. A review of fracture healing / J. C. Webb, J. Tricker // Current orthopedics. – 2000. – Vol. 14. – P. – 457-463.

#### **Погорелов М.В. Репаративный остеогенез большеберцовой кости крыс зрелого возраста в условиях гипоосмолярной гипергидратации легкой степени.**

В работе изучены особенности репаративного остеогенеза большеберцовой кости в условиях гипоосмолярной гипергидрии легкой степени. В эксперименте использовано 48 крыс зрелого возраста, которым наносили дефект в средней трети большеберцовой кости. Экспериментальной группе моделировали гипоосмолярную гипергидрию с использованием препарата "Минирин" «Минирин» (Ferring). Для анализа использовали методы описания гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-еозином и по Ван-Гизон с последующей их морфометрией, биохимический анализ крови, изучение прочностных свойств, растровую электронную микроскопию с зондовым микроанализом поверхности. В условиях проведенного эксперимента возникают нарушения клеточных и тканевых соотношений в регенерате, не изменяя при этом стадийность процессов репаративного остеогенеза. Одновременно нарушения водноэлектролитного баланса приводят к замедлению формирования полноценной костной мозоли. Изменения органической составляющей не сопровождаются нарушением нимерального гомеостазу костной ткани и регенерата, что подтверждается данными РЕММА и определением прочностных свойств.

**Ключевые слова:** Репаративная регенерация, гипергидрия, гистология, прочность, химический состав.