© Гордієнко О.В., Гусак Є.В., Кіптенко Л.І., Грінцова Н.Б., Сікора В.З.

УДК: 616.71-001.5-003.93-053-092.9

Гордієнко О.В., Гусак Є.В., Кіптенко Л.І., Грінцова Н.Б., Сікора В.З.
Кафедра нормальної анатомії людини Сумського державного університету (вул. Римського-Корсакого, 2, м.Суми, 40007, Україна)

МОРФОФУКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАТУ ГУБЧАСТОЇ КІСТКИ У ВІКОВОМУ АСПЕКТІ

Резюме. *Репаративна регенерація кістки - генетично запрограмований процес, але стадійно-годинні характеристики його перебігу залежать від багатьох факторів - віку, статі, захворювань. У цьому повідомленні розглянуто репаративний остеогенез губчастої кістки у тварин різних вікових груп.*

Ключові слова: *губчаста кістка, репаративний остеогенез, морфометрія, скануюча мікроскопія, спектральний аналіз.*

Вступ

Фундаментальною властивістю тканин є здатність відновлення її цілісності після травми - репаративна регенерація. Проблема репаративної регенерації кісток у вік науково-технічного прогресу постає з новою силою. Інвалідність від травм опорно-рухового апарату стабільно залишається на третьому місці в нозологічній структурі первинної інвалідності в Україні.

Але, якщо переломам трубчастих кісток присвячені чисельні роботи, то губчасті кістки несвідомо "образили". Враховуючи, що вони мають певні особливості структури, знання їх репаративного остеогенезу дають багато нового і цікавого.

Відомо, що переломи в компактній та губчастій кістках різняться строками консолідації. Губчаста кісткова тканина більш сприятлива для зрощення переломів, тому що її структурна організація більш насичена елементами, необхідними для забезпечення формування регенерату. Передусім, міжтрабекулярні простори губчастої кістки містять кістковий мозок з поліпотентними стромальними клітинами, які приймають участь у формуванні клітин регенерата. На поверхні кісткових трабекул розташовується остеобластичний прошарок, клітини якого приймають участь у посттравматичній регенерації. Особливості організації судинної сітки губчастої кістки, яка пронизує кістковий мозок, сприяє ранньому ангіогенезу в ділянці пошкодження, стимулюючи таким чином остеогенез. У регенерації кістки також приймають участь перицити - клітини, які розташовуються біля кровоносних судин. Розуміння змін, що відбуваються при травмі губчастої кісткової тканини, дасть змогу регулювати репаративні процеси та уникати розвитку дисрегенерації.

Метою нашої роботи було вивчення реакції губчастої кістки на механічне пошкодження у тварин різних вікових груп відповідно стадійності репаративного остеогенезу.

Матеріали та методи

До досліду були залучені 18 білих щурів-самців лінії Вістар віком 3-х (молоді), 9-ти (зрілі) та 20-місячного віку (старечі). Під кітаміновим наркозом наносили дірчастий дефект з медіальної сторони тіла п'яткової кістки за допомогою стоматологічного бору діаметром 1 мм. Операційну рану закривали шкіряним швом, тварин виводили з наркозу та утримували в стаціонарних умовах віварію. Щурі знаходились на загальному раціоні віварію та були розподілені за терміном дослідження.

По завершенні терміну досліду проводили декапітацію щурів під ефірним наркозом через 3, 15 та 24 добу після операції відповідно до стадій репаративного остеогенезу [3] та вилучали п'яткову кістку. Проводили гістологічне дослідження з морфометрією препаратів, растрову електронну мікроскопію з мікроаналізом поверхні та визначенням хімічного складу п'яткової кістки методом полум'яневої спектрофотометрії.

Результати. Обговорення

В умовах проведеного експерименту при дірчастому дефекті п'яткової кістки відбувається порушення її цілісності, що призводить до розриву окістя, перелому кісткових трабекул, розриву ендосту, судин і нервів, травми тканин кісткового мозку. Менше пошкоджень зазнає сполучна тканина зі своїм судинним та нервовим апаратом, які оточують кістку.

На 3 добу досліду (рис. 1) у регенераті було виявлено мозаїчну картину стану клітинних та тканинних елементів. Рановий канал заповнений гематомою, котра виконує регуляторні функції. Помітною була інтенсивна васкуляризація дефекту, спостерігали переважно незрілу грануляційну тканину з низькою щільністю клітин, серед яких переважали фібробласти, лімфоцити, макрофаги, плазмоцити, нейтрофіли та малодиференційовані клітини кісткового мозку, тяжі фибріну та еритроцитарні клітини. При цьому чисельна більшість фібробластів і макрофагів знаходяться на стадії активного фагоцитозу, по периферії дефекту починають формуватися капіляри синусоїдного типу з великою кількістю периваскулоцитів та фібробластів навколо.

Констатуємо коливання показників клітинного складу регенерату тварин у залежності від віку. Фібробластів у тварин молодого віку 33,82±0,11%, у тварин зрілого та старечого віку - 29,78±0,07% та 27,90±0,06%, відповідно. Рівень лімфоцитів також коливається у віковому аспекті від 24,78±0,18% у молодих, 23,27±0,11% - у зрілих і до 21,07±0,13% - у старечих щурів. Показники рівня прозапальних клітин (макрофагів та нейтрофілів) регенерату вказують на тривалість першої стадії репаративного остеогенезу.

Таким чином, на 3 добу після нанесення дефекту основною складовою формування кісткової мозолі є морфофункціональні прояви лейкоцитарного-фібробластичного та макрофагального диферонів, нові міжклітинні взаємодії, що призводять до очищення зони ушкодження від клітин та міжклітинних структур. Все це разом з початком ангіогенезу та міграцією фібробластів до зони пошкодження передує розгортаню регенераційного гістогенезу.

На 3 добу досліду зі збільшенням віку відзначається пропорційне зменшення кількості води, що призводить до зниження вмісту заліза, калію та натрію при зростанні кількості мінеральних речовин (в основному кальцію).

Мікроскопічна картина регенерату (рис. 2) на 15 добу репаративного остеогенезу у молодих тварин характеризується утворенням у зоні ушкодження остеобластичної грануляційної, фіброретикулярної, а місцями (в основному на периферійних ділянках) і кісткових балок грубоволокнистої кісткової тканини. Це стадія переходу м'якої мозолі у превентивну кісткову мозоль. Новоутворені тканини, завдяки своїм клітинним елементам та волокнистим структурам, заповню-

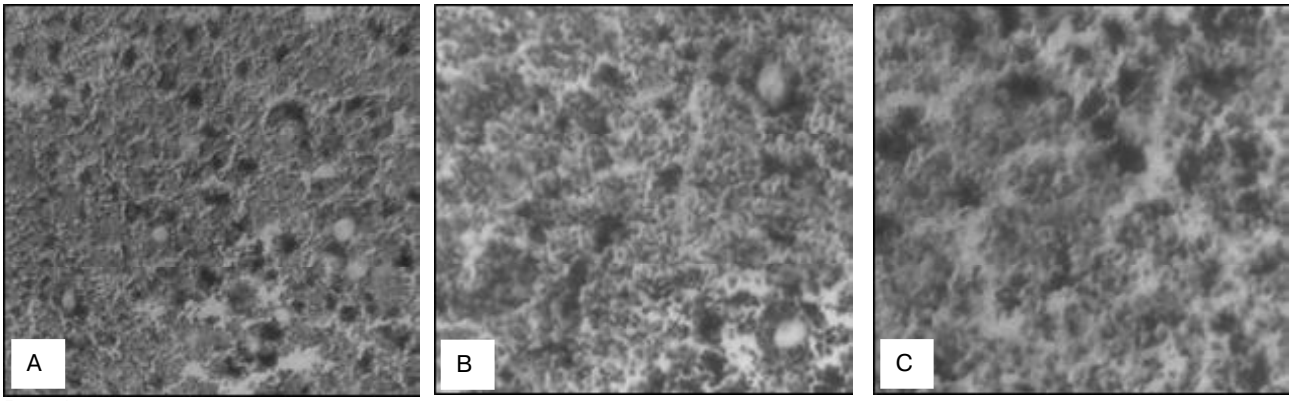


Рис. 1. Регенерат п'яткової кістки на третю добу. Гематоксилін - еозин. х200. А - молоді, В - зрілі, С - старечі.

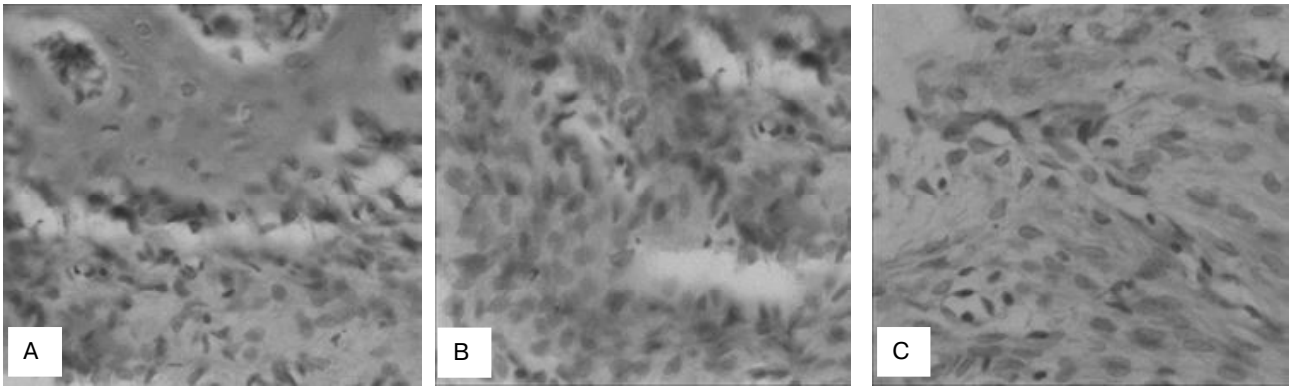


Рис. 2. Регенерат п'яткової кістки на 15 добу після травми. Гематоксилін-еозин. х400. А - молоді, В - зрілі,С - старечі.

ють весь просвіт дефекта травмованої кістки. Клітинні елементи характеризуються поліморфізмом та представлені, в основному, клітинами фібрабластичного та остеобластичного ряду, а також малодиференційованими клітинними елементами.

Як у молодих, так і у зрілих щурів спостерігається досить добра васкуляризація регенерата тонкостінними капілярами, що оточені недиференційованими клітинами грануляційної тканини. На периферії регенерату у фіброретикулярній тканині починається формування елементів грубоволокнистої кісткової тканини з формуванням великопетлястих балок. Матрикс балок зафарбований неінтенсивно, оксифільно, що надає балкам рожевого кольору рівномірного забарвлення. Це свідчить про початок осифікації та її гетеротопічність. Товщина та зрілість новоутворенних балок різна в різних полях зору. На периферії балок знаходяться активно проліферуючі остеобласти. Однак, необхідно зазначити все ж високий відсоток фіброретикулярної тканини в регенераті кісткової тканини зрілих щурів.

При дослідженні регенерату губчастої кістки старечих тварин було виявленно кісткові трабекули, що обмежовують замкнені простори різних розмірів. У цих просторах речовина кісткового мозку представлена, в основному, адипоцитами різного розміру. Між адипоцитами знаходяться гемопоетичні тяжі з кровотворними елементами, котрі диференціюються.

Отже, через 15 днів після нанесення травми, кістковий регенерат у щурів сформований за рахунок грубоволокнистої кісткової та фіброретикулярної тканини, з переважанням останньої. Площа грубоволокнистої кісткової тканини коливається від 38,16±0,16% - у молодих тварин, 38,72±0,18% - у зрілих та 40,38±0,21% - у старечих. Вміст фіброретикулярної тканини більший у особин старечого віку і складає 29,17±0,09%, а найменші показники у молодих тварин - 25,73±0,21%.

При дослідженні регенерату методом растрової електронної мікроскопії (рис. 3) на 15 добу експерименту візуалізуються кісткові трабекули з гомогенними масами поміж них. На новоутворених трабекулах добре виявляється кальцій та фосфор у межах 85,29±0,11% та 14,71±0,07% відповідно у молодих, 82,15±0,2% та 17,85±0,09% - у зрілих і 67,04±0,05% та 10,45±0,03% - у старечих щурів. Така картина є характерною для початку інтенсивної осифікації органічного матриксу та добре корелює з гістологічною картиною. Вміст кальцію та фосфору на границі дефекту стрімко знижується, що можно пояснити використанням кісткового кальцію для побудови новоутворених трабекул. Їх концентрації складають 78,29±0,15% та 14,71±0,08% - у молодих, 71,98±0,06% та 11,75±0,07% - зрілих і 64,18±0.14% та 7,86±0,4% - у старечих щурів відповідно. У порівнянні з інтактними тваринами [4], на ділянках материнської кістки в даний термін починає різко зменшуватись вміст остеогенних елементів, що

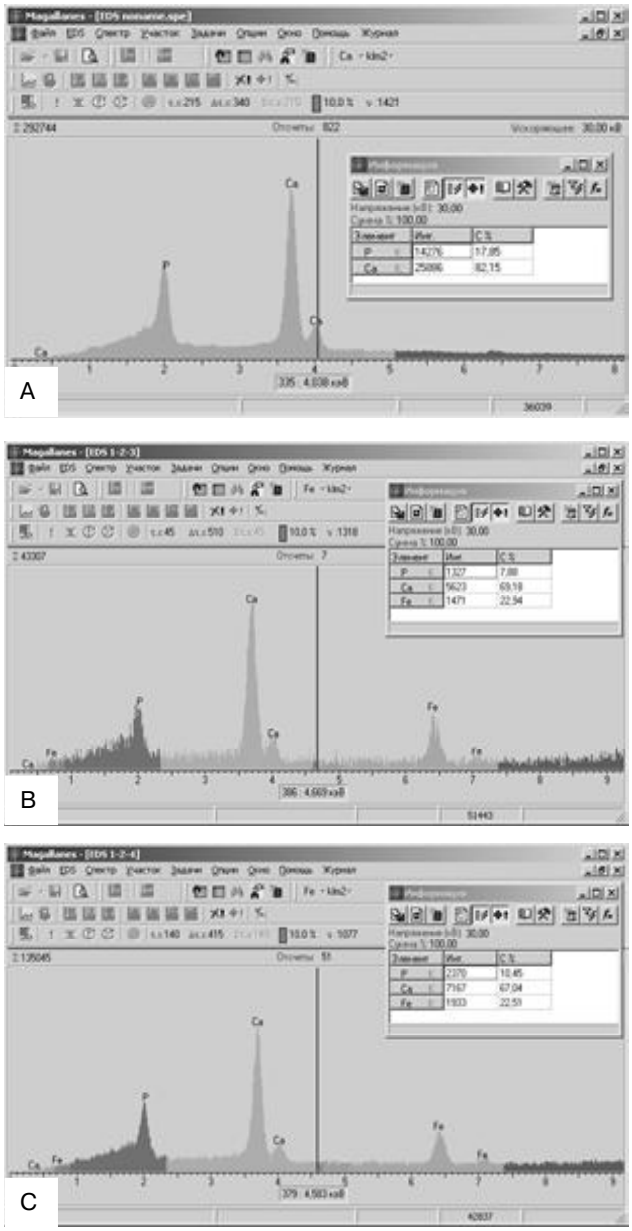


Рис. 3. Спектр регенерату з поверхні п'яткової кістки тварин на 15 добу. А - молоді, В - зрілі, С - старечі.

вказує на локальну реакцію не травмованих ділянок та використання ендогенного кісткового кальцію в процесі мінералізації органічного матриксу. Також, у порівнянні з нормою, вміст кальцію та фосфору на цих ділянках зменшується відповідно на 80,34±0,09% та 15,89±0,07% - у молодих, 74,56±0,13% та 13,53±0, 04% - у зрілих та 65,76±0,03% - у старечих тварин.

Порівняно з попередніми даними, хімічний склад ділянки дефекту на 15 добу дослідження характеризується зростанням вмісту кальцію з 250 до 330 мг/г на попіл, що свідчить про формування кісткової тканини та її мінералізацію. Характерним є різке зростання рівня магнію та цинку, що, скоріш за все, пов'язано з участю даних елементів в активації ферментів, які приймають участь в остеогенезі та відновленні травмованої кістки. Концентрації марганця та заліза залишаються незмінними в другій стадії репаративного процесу. У віковому аспекті відзначаємо у молодих та зрілих тварин більший відсоток вмісту мікроелементів, ніж у тварин старечого віку, що свідчить про вікову затримку формування кісткової мозолі.

На 24 добу дослідження регенерата губчастої кістки (рис. 4) зона дефекту заповнена кістковою тканиною, представленою дрібною та великою сіткою новоутворених трабекул з чисельними остеоцитами. Забарвлення балок рівномірне та наближається по інтенсивності до материнської кістки. На поверхні трабекул розташовується невелика кількість остеобластів, що свідчить вже про уповільнення процесу утворення нового матриксу. Основним компонентом у гістобудові регенерату є губчаста кісткова тканина. У молодих тварин її рівень досягає 45,58±0,23%, у зрілих- 39,69±0.17%, у старечих- 33,82±0,15%. Рівень грубоволокнистої тканини найбільших показників досягає у старечих особин і складає 20,08±0,13%. Судинна сітка регенерата представлена численними капілярами та венулами різного діаметру. Більшість судин різко розширені. У даний строк спостереження виявляється висока активність репаративних процесів, особливо у тварин молодого і зрілого віку. У щурів старечого віку перебудова ретікулофіброзної кісткової тканини у губчасту іде більш повільно. У молодих тварин ці процеси

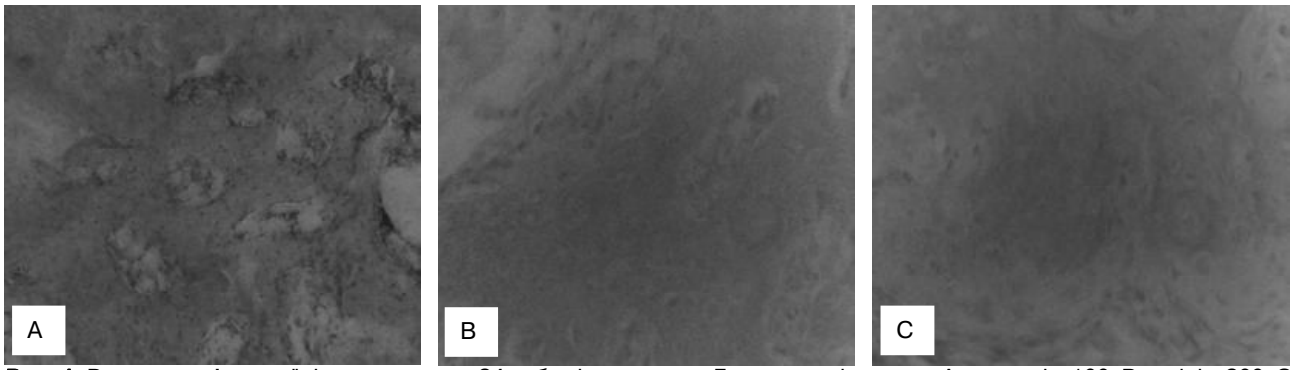


Рис. 4. Регенерат п'яткової кістки тварин на 24 добу після травми. Гематоксилін-еозин. А - молоді, х100; В - зрілі, х200; С - старечі. х200.

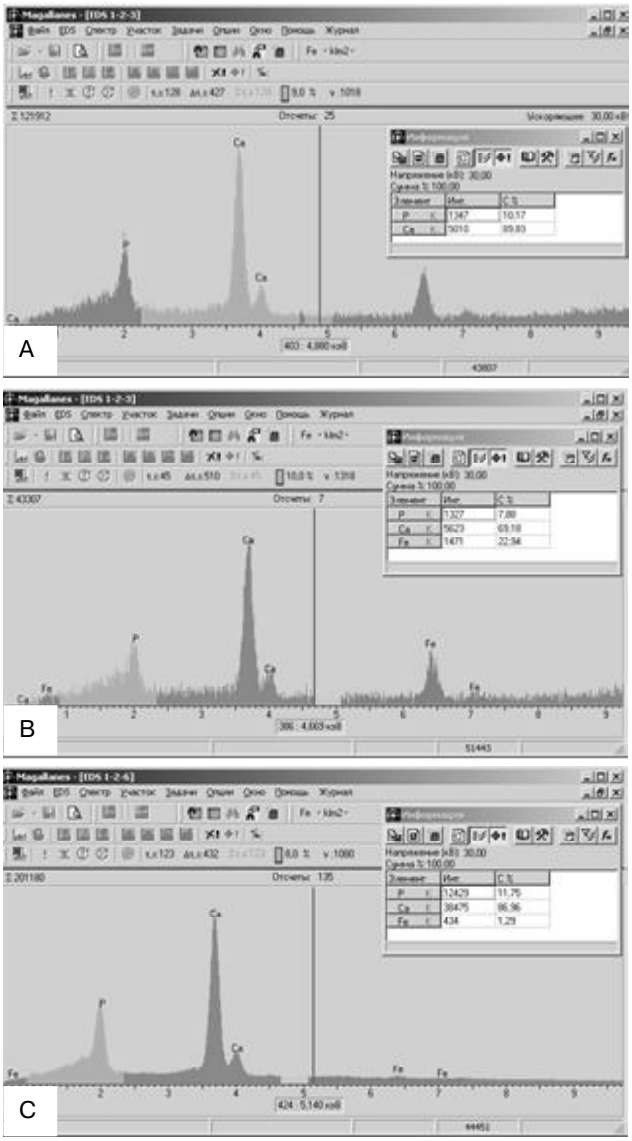


Рис. 5. Спектр регенерату з поверхні п'яткової кістки щурів на 24 добу. А -молоді, В - зрілі, С - старечі.

відбуваються найбільш швидко.

Проведений зондовий мікроаналіз кісткового регенерату на 24 добу (рис. 5) після ушкодження свідчить, що вміст у ньому остеотропних елементів кальцію та фосфору досяг свого максимального рівня. Найбільший відсоток кальцію і фосфору в ділянці перелому у щурів молодого віку. Концентрація кальцію і фосфору у тварин зрілого віку знаходиться посередині між такими ж показниками у щурів молодого та старечого віку. Їх концентрації складають 89,83±0,11% та 10,17±0,08% - у молодих тварин, 86,96±0,34% та 11,75±0,2% - у зрілих, 69,04±0,45% та 7,88±0,09% - у старечих особин.

Проведена атомно-абсорбційна спектрофотометрія п'яткових кісток в останній термін спостереження установила наявність мікроелементів у таких концентраціях (у мкг/г): Mn - 2,66±0.43, Mg - 30,70±0,18, Cu - 4,23±0,47, Fe - 127,47±1,26, Zn - 37,10±1,4.

На 24 добу спостереження хімічний склад травмованої п'яткової кістки характеризується зростанням кількості кальцію, особливо у молодих щурів, яке можна пояснити його ключовою роллю в процесах звапнення органічного матриксу. При цьому рівень мікроелементів також доволі високий.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Таким чином, отримані результати свідчать, що репаративний остеогенез губчастої кістки у тварин різних вікових груп послідовно проходить кілька стадій, які завершуються формуванням повноцінної кісткової мозолі.

2. Вікові відмінності закладаються на першій стадії регенерації і полягають у зменшенні активності та кількості остеогенних клітин в посттравматичній гематомі у щурів старечого віку.

У подальшому ці дані можна використовувати у подальшому при аналізі репаративного остеогенезу губчастої кістки при травмах.

Список літератури

1. Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования /А.С.Аврунин, Р.М.Тихилов, А.Б.Аболин [и др.] // Морфология.- 2005.- Т.127, №2.- С.78-82.
2. Горидова Л.Д. Репаративная регенерация кости в различных условиях /Л.Д.Горидова, Н.В.Дедух //Травма.- 2009.- Т.10, №1.- С.88-91.
3. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный вигляд на проблему. Стадии регенерации /Корж Н.А., Дедух Н.В. //Ортопедия, травматология и протезирование.- 2006.- №1.- С.76-84.
4. Погорєлов М.В. Морфофункціональна оцінка репаративного остеогенезу / М.В.Погорєлов, В.І.Бумейстер // Таврический медико-биол. вестник.- 2008.- Т.11, №3, Ч.1.- С.120-126.
5. Intercellular adhesion molecule I discriminates functionally different populations of human osteoblasts: characteristic involvement of cell cycleregulators //Y.Tanaka, A.Maruo, K.Fujii [et al.] //J. Bone Miner. Res.- 2000.- Vol.15(10).- P.1912-1923.
6. Suzuki R. Some osteocytes released from their lacunae are embedded again in the bone and not engulfed by osteoclasts during bone remodeling /R.Suzuki, T.Domon, M.Wakita //Anat. Embryol. (Berl.).- 2000.- №2.- P.121-128.

Гордиенко Е.В., Гусак Е. В., Киптенко Л.И., Гринцова Н.Б., Сикора В.З.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАТА ГУБЧАТОЙ КОСТИ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Резюме. *Репаративнная регенерация кости - генетически запрограммированный процесс, но стадийно-временные характеристики его протекания зависят от многих факторов - возраста, пола, заболеваний. В этом сообщении рассмотрен репарационный остеогенез губчатой кости у животных разных возрастных групп.*

Ключевые слова: *губчатая кость, репарационный остеогенез, морфометрия, сканирующая микроскопия, спектральный анализ.*

Gordienko E. V., Husak E. V., Kiptenko L.I., Grintsova N.B., Sikora V.Z.

MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTIC OF THE SPONGY BONE REGENERATE IN THE AGE ASPECT

Summary. *Reparative bone regeneration is genetically programmed process, but hour-phasic characteristics of its course depend on many factors - age, sex, diseases. In this report we reviewed the reparative osteogenesis of spongy bone in animals of different ages.*

Key words: *spongy bone, reparative osteogenesis, morphometry, scanning electron microscopy, spectral analysis.*

Рецензент: д.біол.н., професор Бумейстер В.І.

Стаття надійшла до редакції 18.11.2015

Гордієнко Олена Володимирівна - асистент кафедри нормальної анатомії людини Сумського державного університету; +38 099 663-70-07; gordienko1969@ukr.net

Гусак Євгенія Володимирівна - аспірант кафедри нормальної анатомії людини Сумського державного університету; +38 099 669-12-67

Кіптенко Людмила Іванівна - к. біол. н., доцент, доцент кафедри патоморфології Сумського державного університету; +38 066 962-88-29

Гринцова Наталія Борисівна - к. біол. н., асистент кафедри патоморфології Сумського державного університету; +38(095)3928837

Сікора Віталій Зіновійович - д. мед. н., професор, завідувач кафедри нормальної анатомії людини Сумського державного університету; +38 099 165-05-99