

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Рябенко Тетяна Василівна

УДК 611.018.4:615.28(043.5)

**МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕПАРАТИВНОГО
ОСТЕОГЕНЕЗУ ЗА УМОВ ВИКОРИСТАННЯ
ПРОТИПУХЛИННОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ**

Спеціальність 222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Рябенко Т. В.

Науковий керівник – Кореньков Олексій Володимирович, доктор медичних наук, професор

Суми – 2022

АНОТАЦІЯ

Рябенко Т. В. Морфологічні аспекти репаративного остеогенезу за умов використання протипухлинної хіміотерапії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Сумський державний університет МОН України, Суми, 2022.

Дисертаційна робота присвячена встановленню морфологічних змін і порівнянню гістоморфометричних, імуногістохімічних, електронно-мікроскопічних, спектроскопічних, денситометричних, біомеханічних показників репаративної регенерації довгої кістки скелета залежно від впливу на організм протипухлинних хіміопрепаратів, які найбільш часто використовуються для лікування онкологічних захворювань, що супроводжуються розвитком кісткових ускладнень.

Розвиток в організмі злоякісних новоутворень спричиняє виникнення порушень кісткового метаболізму у вигляді остеопорозу та метастатичного ураження кісток, що значно підвищує ризик перелому у таких пацієнтів, навіть при незначній дії зовнішнього механічного фактору. При цьому загоєння перелому кістки у онкологічних хворих дуже часто може відбуватися на тлі дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів, оскільки вони призначаються на тривалий проміжок часу і є одним із основних методів лікування онкологічної патології. Проаналізувавши наукові джерела ми впевнилися у наявності наукових праць, присвячених дії протипухлинної хіміотерапії на фізіологічну регенерацію кісткової тканини, проте досліджень щодо її впливу на морфологію репаративної регенерації довгої кістки скелета ми не виявили. Тому метою нашої роботи стало встановлення морфологічних змін репаративного остеогенезу довгих трубчастих кісток за умов дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів.

Для реалізації поставленої мети ми провели експериментальне дослідження на 480 білих лабораторних щурах 7-го місячного віку. Усім тваринам за допомогою бормашини шароподібною фрезою за малих обертів і з охолодженням у середині діяфіза стегнової кістки наносився дефект діаметром 2 мм до кістковомозкового каналу. Далі щури були поділені на контрольну ($n = 24$, без уведення протипухлинних препаратів) і три експериментальні (I, II, III, $n = 72$) групи, яким після травми та через кожну наступну 21-шу добу (триразово) внутрішньовенно вводили відповідний протипухлинний хіміопрепарат: I-й групі – доксорубіцин (60 мг/м^2), II – 5-фторурацил (600 мг/м^2), III – метотрексат (40 мг/м^2). Дослідження травмованих кісток здійснювали на 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу загоєння дефекту за допомогою комп'ютерної томографії, растрової електронної мікроскопії з рентгенівською енергодисперсійною спектроскопією, гістоморфометричного, імуногістохімічного, біомеханічного та статистичного методів.

Проведене експериментальне дослідження дало можливість установити, що за умов дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів відбувається сповільнення формування ретикулофіброзної кісткової тканини з подальшою затримкою її перебудови у пластинчасту. При цьому на ранніх стадіях репаративного остеогенезу незріла кісткова тканина утворювала широкі міжтрабекулярні простори, заповнені сполучною тканиною, а також чітко простежувалася межа між материнською кісткою та регенератом. На 15-ту і 30-ту добу в ділянці травми встановлене збільшення кількості сполучної тканини з одночасним зменшенням ретикулофіброзної кісткової тканини. Так, на 15-ту добу експерименту площа незрілої кісткової тканини була нижчою, ніж у контролі, на $15,42 \%$ ($p = 0,006$) у I експериментальній, на $5,63 \%$ ($p = 0,33$) – у II групі, на $8,29 \%$ ($p = 0,04$) – у III групі. На 30-ту добу після травми прослідковувалася подальша тенденція до сповільненого формування кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини, про що свідчить зменшення її площі: в I експериментальній групі – на $32,36 \%$

($p = 0,002$), у II – на 30,04 % ($p = 0,75$) та в III – на 10,96 % ($p = 0,21$) порівняно з контрольною групою. Починаючи із 45-ї доби і до 60-ї доби експерименту спостерігалася затримка утворення пластинчастої кісткової тканини регенерату: у I групі на 56,35 % ($p < 0,0001$) та 49,59 % ($p < 0,0001$), у II групі – на 13,75 % ($p=0,02$) та 11,07 % ($p = 0,008$), у III групі – на 40,56 % ($p < 0,0001$) та 26,84 % ($p < 0,0001$) порівняно з контролем.

Поряд із цим на 15-ту і 30-ту добу експерименту під дією протипухлинних хіміопрепаратів у кістковому регенераті встановлено збільшення активності експресії маркера кісткової резорбції катепсину К на 7,00–9,37 % ($p < 0,05$) у I експериментальній групі, на 5,38–7,61 % ($p < 0,05$) – у II групі та на 9,13–11,12 % ($p < 0,05$) – у III групі. При цьому інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів була високою (+++). На 45-ту добу і в останній термін експерименту також спостерігалось збільшення активності катепсину К порівняно з контрольною групою на 17,20 % ($p = 0,0012$), 13,23 % ($p = 0,0011$), 18,50 % ($p = 0,0002$) та на 25,72 % ($p = 0,0002$), 17,64 % ($p = 0,003$), 22,76 % ($p < 0,0001$) відповідно, проте інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин визначалась як помірна (++)). У свою чергу динаміка експресії клітинними елементами регенерату маркера кісткоутворення остеопонтину у тварин усіх експериментальних груп мала протилежний характер і на початку експерименту була слабо виражена. Однак на 30-ту і 45-ту добу відбувалося поступове зростання експресії остеопонтину, проте вона була нижчою за відповідний показник контрольної групи: у I експериментальній групі на 16,80–20,13 % ($p < 0,05$), у II групі – на 11,19–13,87 % ($p < 0,05$), у III групі – на 15,98–19,46 % ($p < 0,05$). Імунопозитивні клітини зосереджувалися переважно по краям дефекту, а інтенсивність забарвлення їх цитоплазми визначалась як низька. В останній термін експерименту експресія остеопонтину у I групі становила $21,17 \pm 1,47$ %, у II групі – $22,17 \pm 1,47$ %, у III групі – $20,83 \pm 1,17$ %, однак це на 20,62 % ($p < 0,0001$), 18,87 % ($p < 0,0001$) та 21,89 % ($p < 0,0001$) було нижче, ніж у

тварин контрольної групи. При цьому інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин була помірною.

У проведеному експериментальному дослідженні було також встановлено, що в умовах дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів відбувається зниження рівня макроелементів (Са та Р) у травмованій кістці. Так, на 15-добу експерименту вміст Са та Р у кістковій тканині регенерату і прилеглої до нього материнської кістки був нижчим, ніж у контролі на 52,17 % ($p < 0,05$), 34,88 % ($p < 0,05$) та 14,79 % ($p < 0,05$), 24,52 % ($p < 0,05$) у I експериментальній групі, на 17,24 % ($p < 0,05$), 3,48 % ($p = 0,15$) та 18,52 % ($p < 0,05$), 22,60 % ($p < 0,05$) – у II групі, на 36,04 % ($p < 0,05$), 21,16 % ($p < 0,05$) та 22,24 % ($p < 0,05$), 13,64 % ($p < 0,05$) – у III групі. На 30-ту, 45-ту, 60-ту добу в усіх експериментальних групах встановлено поступове зростання вмісту Са та Р, проте їх кількість не досягала аналогічних показників контрольної групи на 53,90 % ($p < 0,05$), 37,91 % ($p < 0,05$), 54,02 % ($p < 0,05$) та 31,13 % ($p < 0,05$), 45,68 % ($p < 0,05$), 21,46 % ($p < 0,05$) – в I експериментальній групі, на 21,78 % ($p < 0,05$), 10,62 % ($p < 0,05$), 24,11 % ($p < 0,05$) та 6,60 % ($p < 0,05$), 26,03 % ($p < 0,05$), 17,07 % ($p < 0,05$) – в II групі, на 39,31 % ($p < 0,05$), 23,96 % ($p < 0,05$), 40,63 % ($p < 0,05$) та 21,87 % ($p < 0,05$), 40,66 % ($p < 0,05$), 25,20 % ($p < 0,05$) – в III групі. Поряд із цим зберігалось зниження рівня Са та Р у прилеглій до ділянки травми материнській кістці: в I групі – на 15,60 % ($p < 0,05$) і 18,58 % ($p < 0,05$), в II – на 20,45 % ($p < 0,05$) і 17,33 % ($p < 0,05$), в III – на 22,24 % ($p < 0,05$) і 14,59 % ($p < 0,05$).

Зменшення рівня кальцію і фосфору в новоутвореному регенераті позначилося й на його оптичній щільності. Так, на 15-ту добу після травми оптична щільність регенерату у тварин I експериментальної групи становила $444,30 \pm 31,94$ НУ, II групи – $503,50 \pm 17,75$ НУ, III групи – $398,00 \pm 30,58$ НУ, однак це на 31,27 % ($p < 0,001$), 22,12 % ($p < 0,001$) та 38,43 % ($p < 0,001$) було нижче, ніж у контрольних тварин. Далі відбувалося поступове підвищення оптичної щільності регенерату, однак у тварин I, II і III експериментальних груп вона не досягла аналогічного показника тварин

контрольної групи на 22,91 % ($p < 0,001$), 8,76 % ($p < 0,001$), 18,00 % ($p < 0,001$) – на 30-ту добу, на 24,89 % ($p < 0,001$), 6,49 % ($p < 0,001$), 9,23 % ($p < 0,001$) – на 45-ту добу та на 37,07 % ($p < 0,0001$), 23,02 % ($p < 0,001$), 27,86 % ($p < 0,001$) – на 60-ту добу експерименту. Разом із зниженням рівня кальцію, фосфору та оптичної щільності регенерату у тварин I, II, III експериментальних груп на 60-ту добу експерименту встановлене зменшення межі міцності на стиск діафіза травмованої кістки на 27,50 % ($p < 0,001$), 18,48 % ($p < 0,001$), 23,55 % ($p < 0,001$) та мікротвердості її регенерату на 21,35 % ($p < 0,001$), 11,93 % ($p < 0,001$), 16,12 % ($p < 0,001$) відповідно.

Таким чином, виходячи з наведених морфометричних показників найбільш виражена затримка формування, реорганізації та ремоделювання кісткового регенерату відбувається у разі застосування доксорубіцину, а потім метотрексату і 5-фторурацилу. При цьому всі досліджувані протипухлинні хіміопрепарати мали майже однаковий вплив на збільшення експресії катепсину К і зниження експресії остеопонтину, що в першому випадку є однією з ознак посиленої резорбції кісткової тканини регенерату, а в другому – зниженням темпів диференціювання остеобластів та інтенсивності мінералізації кісткового матриксу. Про останнє також свідчить зниження рівня кальцію, фосфору в регенераті, що у свою чергу призвело до зменшення його оптичної щільності, мікротвердості та межі міцності діафіза травмованої кістки. Водночас перелічені показники зазнали найбільших змін за умов впливу доксорубіцину, а найменших – за дії на організм метотрексату і 5-фторурацилу.

Ключові слова: протипухлинні хіміопрепарати, репаративна регенерація, щури, довгі трубчасті кістки, кістковий регенерат.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Рябенко Т. В., Понирко А. О. (Огляд літератури). Аналіз впливу злоякісних новоутворень на стан кісткової системи та з'ясування дії протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Буковинський медичний вісник*. 2020. Т. 24, № 1 (93). С. 243–249. DOI: <https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.1.93.2020.33> (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

2. Рябенко Т. В. (Огляд літератури). Сучасні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини та аналіз показників кісткового метаболізму. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т. 5, № 3 (25). С. 89–98. DOI: 10.26693/jmbs05.03.089. (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

3. Рябенко Т. В., Кореньков О. В. Комп'ютерно-томографічна оцінка динаміки загоєння дефекту діафіза стегнової кістки в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2020. Т. 20, № 2 (70). С. 165–170. DOI: 10.31718/2077-1096.20.2.165. (Особистий внесок: брала участь у плануванні експерименту, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

4. Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Понирко А. О., Теслик Т. П., Гула В. І. Імуногістохімічний аналіз експресії катепсину К та остеопонтину клітинними елементами кісткової тканини регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *Вістник проблем біології і медицини*. 2021. № 2 (160). С. 236–34. DOI: 10.29254/2077-4214-2021-2-160-236-241 (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

5. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2021. №9 (3): 295–307. DOI:

[https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9\(3\):295-307](https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9(3):295-307) (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

6. Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Ковалюк Т. М. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021. Т. 6, № 5 (33). С. 116–126. VI Міжнародна науково-практична конференція з міжнародною участю. Проблеми, досягнення та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук. Миколаїв, 29 вересня 2021 р. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116 (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

7. Riabenko T. V., Korenkov O. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Ponyrko A. A., Pernakov M. S., Hula V. I. Morphological features of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie. (Scopus)*. 2022. № 75 (3): P. 570–576. DOI: 10.36740/WLek202203102. (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

8. Riabenko T. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Pernakov M. S., Teslyk T. P., Ponyrko A. A., Gordienko O. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on mechanical properties of injured tubular skeletal bone. *Azerbaijan Medical Journal. (Scopus)*. 2022. № 1. P. 117–124. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.019>. (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

9. Рябенко Т. В. Вплив протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Збірник тез доповідей VII Конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України*. м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 р. С. 283.

10. Riabenko T. V. The effect of antitumor chemotherapy on the healing of the femoral defect according to the results of computed tomography. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy, 2020. October «Biomedical perspectives II». P. 29.

11. Рябенко Т. В. Зміни механічних властивостей травмованих трубчастих кісток при дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Збірник тез–доповідей*. м. Тернопіль, 11 червня 2021 р. С. 176–178.

12. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on bone metabolism in the area of long bone diaphysis defect. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy. 2021. October «Biomedical perspectives III». P. 24.

13. Рябенко Т. В. Особливості репаративної регенерації щурів та зміни рівня мікроелементів травмованих довгих трубчастих кісток в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *II міжнародна наукова конференція «Здобутки та досягнення прикладних та фундаментальних наук XXI століття»*. Збірник тез доповідей. м. Рівне, 5 листопада 2021 р. С. 65–66.

ABSTRACT

Ryabenko T. V. Morphological aspects of reparative osteogenesis using antitumor chemotherapy. Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine". – Sumy State University of the Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2022.

The dissertation work is aimed at establishing morphological changes and comparing histomorphometric, immunohistochemical, electro-microscopic, spectroscopic, densitometric, biomechanical indicators of reparative regeneration of long skeletal bone depending on the impact on the body of antitumor chemotherapeutics, which are often treated.

The development of malignancies in the body causes the formation of bone pain in the form of osteoporosis and metastatic impact of bones, which greatly causes the risk of fracture in such purposes, even with such an external mechanical factor. At the same time exacerbation of bone fractures in medical doctors often occurs against the background of exposure to one antitumor chemotherapy, they can be observed for three periods of time and are one of the main methods of cancer treatment. Analyzed scientific sources, we made sure that there are scientific papers on the effects of antitumor chemotherapy on physiological regeneration of bone tissue, but research on its effect on the morphology of reparative regeneration of long skeletal bone, we did not know. Because of this, our work established morphological changes in the reparative osteogenesis of long tubular bones under the influence of antitumor chemotherapeutics.

To achieve this goal, we conducted an experimental study on 480 white laboratory rats at 7 months of age. All animals with the help of a drill with a ball mill at low speed and with cooling in the middle of the femoral shaft was applied a defect with a diameter of 2 mm to the bone marrow canal. Next, rats were divided into control (n = 24, without the introduction of anticancer drugs) and three

experimental (I, II, III, n = 72) groups, which after injury and the creation of the next 21 days (three times) intravenously administered antitumor chemotherapy : I group - doxorubicin (60 mg /m²), II - 5-fluorouracil (600 mg /m²), III - methotrexate (40 mg /m²). Examination of injured bones was performed on the 15th, 30th, 45th, 60th day of healing of the defect using computed tomography, scanning electron microscopy with X-ray energy dispersive spectroscopy, histomorphometric, immunohistochemical, biomechanical and statistical methods.

The conducted experimental study made it possible to establish that under the influence of antitumor chemotherapeutics on the body there is a slowdown in the formation of reticulofibrous bone tissue with an experimental delay in its reorganization into lamellar. At the same time, in the early stages of reparative osteogenesis, immature bone tissue formed wide intertrabecular spaces, which were filled with tissue, and the boundary between maternal bone and regenerate was clearly traced. On the 15th and 30th received in the area of injury increases the amount of connective tissue with a simultaneous decrease in reticulofibrous bone tissue. Thus, on the 15th achieved experiment the area of immature bone tissue was lower in control by 15.42 % (p = 0.006) in the I experimental, by 5.63 % (p = 0.33) - in the II group, by 8.29 % (p = 0.04) – in group III. On the 30th day after the injury there was a further tendency to complete the formation of beads of reticulofibrous bone tissue, which reduces its area: in the experimental group – by 32.36 % (p = 0.002), in the II – by 30.04 % = 0.75) and on III – by 10.96 % (p = 0.21) interaction with the control group. From the 45th onwards on the 60th day as a result of the experiment there was a delay in the formation of lamellar bone regenerate: in group I by 56.35 % (p < 0.0001) and 49.59 % (p < 0.0001), in group II – 13.75 % (p = 0.02) and 11.07 % (p = 0.008), in group III – 40.56 % (p < 0.0001) and 26.84 % (p < 0.0001) compared with the control.

In addition, on the 15th and 30th day under the action of antitumor chemotherapeutics in bone regenerate there is an increase in the expression of markers of bone resorption of cathepsin K by 7.00–9.37 % (p < 0.05) in experimental groups I, by 5.38–7.61 % (p < 0.05) – in group II and 9.13–11.12 %

($p < 0.05$) – in group III. The intensity of staining of the cytoplasm of osteocytes was high (+++). In the 45th achievement in the last term of the experiment there is also an increase in the activity of cathepsin Compared with the control group by 17.20 % ($p = 0.0012$), 13.23 % ($p = 0.0011$), by 18.50 % ($p = 0.0002$) and 25.72 % ($p = 0.0002$) 17.64 % ($p = 0.003$), 22.76 % ($p < 0.0001$), respectively, but the intensity of staining of the cytoplasm of immunoactive cells was determined as moderate (++)). In turn, the dynamics of expression of cellular elements of bone marker regeneration the formation of osteopontin in animals of all experimental groups was the opposite and at the beginning of the experiment was weak. However, on the 30th and 45th day there was a gradual increase in osteopontin expression, but it was lower than the corresponding control group: in the first experimental group by 16.80-20.13 % ($p < 0.05$), in In the second group - by 11.19–13.87 % ($p < 0.05$), in the third group - by 15.98–19.46 % ($p < 0.05$). Immunopositive cells were concentrated mainly at the edges of the defect, and the color intensity of their cytoplasm was defined as low. In the last term of the experiment, the expression of osteopontin in group I was 21.17 ± 1.47 %, in group II – 22.17 ± 1.47 %, in group III – 20.83 ± 1.17 %, however this was 20.62 % ($p < 0.0001$), 18.87 % ($p < 0.0001$) and 21.89 % ($p < 0.0001$) lower than in control animals. The intensity of the cytoplasm color of immunoactive cells was moderate.

In the conducted experimental research it was also established that in the conditions of action on an organism of antitumor chemotherapeutics there is a decrease in level of macronutrients (Ca and P) in the injured bone. Thus, on the 15th day of the experiment, the content of Ca and P in the bone tissue of the regenerate and adjacent maternal bone was lower than in the control by 52.17 % ($p < 0.05$), 34.88 % ($p < 0.05$)) and 14.79 % ($p < 0.05$), 24.52 % ($p < 0.05$) in experimental group I, by 17.24 % ($p < 0.05$), 3.48 % ($p = 0.15$) and 18.52 % ($p < 0.05$), 22.60 % ($p < 0.05$) - in group II, by 36.04 % ($p < 0.05$), 21.16 % ($p < 0.05$) and 22.24 % ($p < 0.05$), 13.64 % ($p < 0.05$) - in group III. On the 30th, 45th, 60th day in all experimental groups there was a gradual increase in the content of Ca and P, but their number did not reach the same indicators of the

control group by 53.90 % ($p < 0.05$), 37.91 % ($p < 0.05$), 54.02 % ($p < 0.05$), 31.13 % ($p < 0.05$), 45.68 % ($p < 0.05$), 21.46 % ($p < 0.05$) - in the I experimental group, by 21.78 % ($p < 0.05$), 10.62 % ($p < 0.05$), by 24.11 % ($p < 0.05$), 6.60 % ($p < 0.05$), by 26.03 % ($p < 0.05$), 17.07 % ($p < 0.05$) - in group II, by 39.31 % ($p < 0.05$), 23.96 % ($p < 0.05$), 40.63 % ($p < 0.05$), 21.87 % ($p < 0.05$), 40.66 % ($p < 0.05$) and 25.20 % ($p < 0.05$) - in group III. Along with this, there was a decrease in the level of Ca and P in the maternal bone adjacent to the site of injury: in group I - by 15.60 % ($p < 0.05$) and 18.58 % ($p < 0.05$), in II - by 20.45 % ($p < 0.05$) and 17.33 % ($p < 0.05$), in III - by 22.24 % ($p < 0.05$) and 14.59 % ($p < 0, 05$).

The decrease in the level of calcium and phosphorus in the newly formed regenerate also affected its optical density. Thus, on the 15th day after injury, the optical density (OS) of the regenerate in animals of experimental group I was 444.30 ± 31.94 HU, group II - 503.50 ± 17.75 HU, group III - $398.00 \pm 30, 58$ HU, however, it was 31.27% ($p < 0.001$), 22.12% ($p < 0.001$) and 38.43% ($p < 0.001$) were lower than in control animals. Then there was a gradual increase in OS regenerate, but in animals of I, II and III experimental groups, it did not reach a similar rate in animals of the control group by 22.91% ($p < 0.001$), 8.76% ($p < 0.001$), 18.00% ($p < 0.001$) - on the 30th day, by 24.89% ($p < 0.001$), 6.49% ($p < 0.001$), 9.23% ($p < 0.001$) - on the 45th day and on 37.07% ($p < 0.0001$), 23.02% ($p < 0.001$), 27.86% ($p < 0.001$) - on the 60th day of the experiment. Along with the decrease in the level of calcium, phosphorus and optical density of the regenerate in animals of I, II, and III experimental groups on the 60th day of the experiment there was a decrease in compressive strength of the diaphysis of the injured bone by 27.50% ($p < 0,001$), 18, 48% ($p < 0.001$), 23.55% ($p < 0.001$) and microhardness of its regenerate by 21.35% ($p < 0.001$), 11.93% ($p < 0.001$), 16.12% ($p < 0.001$) respectively.

Thus, based on the above morphometric parameters, the most pronounced delay in the formation, reorganization and remodeling of bone regenerate occurs in the case of doxorubicin, followed by methotrexate and 5-fluorouracil. All studied

antitumor chemotherapeutics had almost the same effect on increasing cathepsin K expression and decreasing osteopontin expression, which in the first case is one of the signs of increased resorption of bone regenerate, and in the second - a decrease in osteoblast differentiation and mineralization intensity. The latter is also evidenced by a decrease in the level of calcium and phosphorus in the regenerate, which in turn led to a decrease in its optical density, microhardness and tensile strength of the diaphysis of the injured bone. At the same time, these indicators underwent the greatest changes under the influence of doxorubicin, and the least - when exposed to methotrexate and 5-fluorouracil.

Key words: antitumor chemotherapeutics, reparative regeneration, rats, long tubular bones, bone regenerate.

List of publications

1. Ryabenko T. V., Ponirko A. O. (Literature review). Analysis of the impact of malignant neoplasms on the bone system and elucidation of the effect of antitumor chemotherapeutics on bone regeneration. *Bukovynian Medical Bulletin*. 2020. Vol. 24, № 1 (93). P. 243-249. DOI: <https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.1.93.2020.33> (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing of material).
2. Ryabenko T. V. (Literature review). Modern aspects of reparative bone regeneration and analysis of bone metabolism. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports*. 2020. Vol. 5, № 3 (25). P. 89-98. DOI: 10.26693/jmbs05.03.089. (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing of material).
3. Ryabenko T. V., Korenkov O. V. Computed tomography assessment of the dynamics of healing of the femoral shaft defect under the action of antitumor chemotherapeutics. *Current issues of modern medicine*. 2020. Vol. 20, № 2 (70). P. 165-170. DOI: 10.31718 / 2077-1096.20.2.165 (Personal contribution: participated in the planning of the experiment, writing an article, statistical processing of the material).

4. Ryabenko T. V., Korenkov O. V., Ponyrko A. O., Teslik T. P., Gula V. I. Immunohistochemical analysis of cathepsin K and osteopontin expression by cellular elements of regenerated bone tissue under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Bulletin of Biology and Medicine*. 2021; № 2 (160). P. 236-34. DOI: 10.29254 / 2077-4214-2021-2-160-236-241 (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing of material).

5. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2021; № 9 (3). – P. 295-307. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9\(3\):295-307](https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9(3):295-307). (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing).

6. Ryabenko T. V., Korenkov O. V., Kovalyuk T. M. Morphological aspects of reparative regeneration of bone tissue under the influence of antitumor chemotherapy. *Ukrainian Journal of Medicine, Biology and Sports*. 2021. Vol. 6, № 5 (33). P. 116-126. VI International scientific-practical conference with international participation. Problems, achievements and prospects of development of medical-biological and sports sciences. Mykolaiv, 2021, September 29. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116.

7. Riabenko T. V., Korenkov O. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Ponyrko A. A., Pernakov M. S., Hula V. I. Morphological features of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Medical News*. 2022. № 75 (3). –P. 570-576. DOI: 10.36740 / WLek202203102. (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing of material).

8. Riabenko T. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Pernakov M. S., Teslyk T. P., Ponyrko A. A., Gordienko O. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on mechanical properties of injured tubular skeletal bone. *Azerbaijan Medical Journal*. 2022. № 1. P. 117–124. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.019>. (Personal contribution: participated in data processing, article writing, statistical processing of material).

9. Ryabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on bone regeneration. *Collection of abstracts of the VII Congress of the Scientific Society of Anatomists, Histologists, Embryologists, Topographers of Ukraine*. Odesa, 2019. P. 283.

10. Riabenko T. V. The effect of antitumor chemotherapy on the healing of the femoral defect according to the results of computed tomography. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy, 2020, October. «Biomedical perspectives II». P. 29.

11. Ryabenko T. V. Changes in the mechanical properties of injured tubular bones under the action of antitumor chemotherapeutics. *Collection of abstracts. Achievements of clinical and experimental medicine*. Ternopil, 2021, June 11. P. 176–178.

12. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on bone metabolism in the area of long bone diaphysis defect. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy, 2021. October «Biomedical perspectives III». P. 24.

13. Ryabenko T.V. Features of reparative regeneration of rats and changes in the level of microelements of injured long tubular bones under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Collection of abstracts. II International Scientific Conference Achievements and Achievements of Applied and Basic Sciences of the XXI Century*. Rivne, November 5, 2021. Ukraine. P. S. 65-66.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	19
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	27
1.1 Сучасні уявлення про репаративну регенерацію кісток.....	27
1.2 Зміни кісткового метаболізму в онкологічних пацієнтів	45
1.3 Вплив протипухлинних хіміопрепаратів на кістковий метаболізм.....	51
РОЗДІЛ 2	60
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	60
2.1 Загальна характеристика експериментального матеріалу	60
2.2 Методика проведення експерименту	60
2.3 Методи дослідження.....	62
2.3.1 Гістологічне дослідження та морфометрія	62
2.3.2 Імуногістохімічне дослідження.....	63
2.3.3 Растрова електронна мікроскопія з рентгенівською енерго- дисперсійною спектроскопією	64
2.3.4 Комп'ютерна томографія	65
2.3.5 Дослідження біомеханічних властивостей	65
2.3.6 Статистичний аналіз.....	67
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	69
3.1 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діяфіза стегнових кісток щурів контрольної групи.....	69
3.1.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту	69
3.1.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту	73
3.1.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту.....	76
3.1.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту	79

3.2 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафіза стегнових кісток щурів в умовах впливу доксорубіцину	83
3.2.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту	83
3.2.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту	86
3.2.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту	89
3.2.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту	92
3.3 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафіза стегнових кісток щурів за умов впливу 5-фторурацилу	96
3.3.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту	96
3.3.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту	99
3.3.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту	103
3.3.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту	106
3.4 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафіза стегнових кісток щурів за умов впливу метотрексату	111
3.4.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту	111
3.4.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту	115
3.4.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту	120
3.4.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту	123
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	130
ВИСНОВКИ	154
ДОДАТКИ	184

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- RANKL – receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (мембранний білок, цитокін родини фактору некрозу пухлин);
- RANK – receptor activator of nuclear factor kB (активатор рецепторів ядерного фактора kB);
- OPG – osteoprotegerin (остеопротегерин) ;
- PTHr – parathyroid hormone-related protein (паратгормонподібний білок);
- CSF-1 – colony stimulating factor 1 (колонієстимулюючий фактор 1);
- M-CSF – macrophage colony-stimulating factor (колонієстимулюючий фактор макрофагів);
- BMP – bone morphogenetic protein (кісткові морфогенетичні білки);
- МСК – мезенхімальні стромальні клітини;
- ІХ – імуногістохімічне дослідження;
- КТ – комп'ютерна томографія;
- ОЩ – оптична щільність;
- МК – материнська кістка;
- HU – Hounsfield units (одиниці Хаунсфілда);
- МПа – мегапаскаль;
- IGF – Insulin like growth factor (інсуліноподібний фактор росту);
- PGFs – fibroblast-derived factor (фактор росту фібробластів);
- TGF- β – transforming growth factor beta (трансформуючий фактор росту);
- TNF- α – tumor necrosis factor alpha (фактор некрозу пухлин α);
- PDGF – platelet-derived growth factor (тромбоцитарний фактор росту);
- VEGF – vascular endothelial growth factor (судинний ендотеліальний

- фактор росту);
- IL – Interleukin (інтерлейкін);
- PG E² – Prostaglandin E2 (простагландин E²);
- TRAP – tartrate-resistant acid phosphatase (тартрат-резистентна кислотна фосфатаза).

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Найбільш поширеним ураженням кісткової системи є переломи кісток. У зв'язку із значним зростанням на сьогодні рівня онкологічних захворювань відмічається збільшення відсотка виникнення переломів саме серед пацієнтів цієї групи. Розвиток злоякісних новоутворень спричиняє зміни кісткового метаболізму у онкологічних пацієнтів у вигляді остеопорозу, метастатичного ураження кісток та патологічних переломів [1, 2, 3]. Ще до початку лікування раку онкологічні хворі мають підвищений ризик прискореної втрати кісткової тканини, про що свідчить зниження мінеральної щільності кісткової тканини у хворих на рак, незалежно від його типу. Особливо часто виникнення переломів кісток зустрічається при раку молочної, передміхурової, щитоподібної залоз, нирок та легенів [4, 5].

Втрата кісткової маси у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями відображає як наслідки самого раку, так і скелетну відповідь на терапію, яка в даний час використовується для його лікування, включаючи широкий спектр таких хіміотерапевтичних засобів, як глюкокортикоїди, інгібітори ароматази та стероїдні антиандрогени [6, 7].

Одним з основних методів лікування раку на сьогодні є протипухлинна хіміотерапія. Особливістю її проведення є призначення протипухлинних хіміопрепаратів курсами, на тривалий проміжок часу. Враховуючи тривалий період загоєння переломів кісток, процеси репаративної регенерації в онкологічних пацієнтів часто протікають на фоні застосування протипухлинних хіміопрепаратів [8, 9].

Переломи кісток спричиняють зниження якості життя пацієнтів, призводять до тривалої та значної втрати працездатності, а, зокрема, в онкологічних хворих впливають на прогноз онкологічного захворювання через вимушену необхідність відтермінування або навіть припинення лікування первинного захворювання [10].

На сьогодні проведено велику кількість досліджень щодо вивчення впливу різних груп протипухлинних хіміопрепаратів на процеси фізіологічної регенерації кісткової тканини [11, 12, 13]. Проте, слід зазначити, відсутність досліджень саме щодо особливостей процесів репаративної регенерації за умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів.

Дослідження особливостей репаративної регенерації при застосуванні протипухлинної хіміотерапії дозволить розробити відповідні ефективні профілактичні та лікувальні заходи щодо повноцінного швидкого відновлення цілісності кісток в онкологічних хворих, що покращить якість життя пацієнтів із злякисними новоутвореннями.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету МОН України і є складовою частиною науково-дослідної теми кафедри морфології «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму», номер державної реєстрації 0118U006611.

Мета дослідження – встановлення морфологічних змін репаративного остеогенезу довгих трубчастих кісток за умов впливу на організм протипухлинних хіміопрепаратів.

Для досягнення поставленої мети були визначені наступні задачі:

1. Установити та порівняти вплив доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату на виразність формування й дозрівання тканиноспецифічних структур регенерату та їх якісні мікроскопічні характеристики в експериментальному дефекті діафіза стегнової кістки.

2. Установити та порівняти вплив доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату на експресію маркера резорбції (катепсину К) і синтезу (остеопонтину) кісткової тканини в регенераті травмованої стегнової кістки.

3. Установити та порівняти вплив доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату на вміст кальцію і фосфору в травмованій стегновій кістки та її регенераті.

4. Установити та порівняти вплив доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату на структуру та інтенсивність (швидкість) формування кісткової мозолі за допомогою комп'ютерної томографії.

5. Установити та порівняти вплив доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату на особливості змін біомеханічних властивостей травмованих довгих кісток щурів.

Об'єкт дослідження – репаративна регенерація довгих трубчастих кісток скелета.

Предмет дослідження – морфофункціональні зміни травмованих довгих трубчастих кісток скелета щурів зрілого віку в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів.

Методи дослідження:

- гістоморфометрія – вивчення структури регенерату стегнових кісток та визначення площі його тканиноспецифічних структур на світлооптичному рівні;
- імуногістохімічне дослідження (ІГХ) – визначення наявності та локалізації клітинних і тканинних компонентів (антигенів) маркера резорбції (катепсину К) та синтезу кісткової тканини (остеопонтину) у мікропрепаратах;
- растрова електронна мікроскопія з рентгенівською енергодисперсійною спектроскопією – визначення структури та макроелементного складу (кальцію й фосфору) травмованих стегнових кісток щурів;
- комп'ютерна томографія – рентгенологічний метод дослідження динаміки загоєння травмованих кісток із денситометрією (вимірювання оптичної щільності кісток);
- біомеханічний метод – визначення міцності діафіза травмованих довгих трубчастих кісток скелета;
- статичне мікроіндентування – установлення твердості кісткової тканини регенерату;

– статистичний – об’єктивне визначення відмінностей одержаних кількісних показників і оцінки їх взаємозв’язків.

Наукова новизна одержаних результатів. У результаті проведеного дослідження на білих лабораторних щурах за допомогою сучасних морфологічних методів дослідження були встановлені та порівняні гістоморфометричні, імуногістохімічні, електронно-мікроскопічні, спектроскопічні, денситометричні, біомеханічні показники загоєння експериментального дефекту діафіза стегнової кістки залежно від дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів – доксорубіцину, метотрексату і 5-фторурацилу, які найчастіше використовують для лікування онкологічних захворювань.

Уперше встановлено, що вплив на організм усіх досліджуваних протипухлинних хіміопрепаратів призводить до сповільнення диференціювання клітинних елементів регенерату, формування, реорганізації та ремоделювання його тканинспецифічних структур. Найбільш виражений ефект у цьому напрямку виявляє доксорубіцин, менш виражений – метотрексат і 5-фторурацил.

Уперше доведено, що дія на організм доксорубіцину, метотрексату і 5-фторурацилу майже однаково впливає на підвищення експресії клітинними елементами регенерату катепсину К і зниження експресії остеопонтину.

Експериментально встановлено, що введені в організм протипухлинні препарати доксорубіцин, метотрексат і 5-фторурацил призводять до зниження кількості кальцію і фосфору, оптичної щільності й твердості кісткової тканини регенерату, а також зменшення межі міцності на стиск діафіза травмованої стегнової кістки. При цьому, найбільших змін перелічені показники зазнали за дії на організм доксорубіцину, а найменших – за умов впливу метотрексату і 5-фторурацилу.

Практичне значення одержаних результатів. Проведене експериментальне дослідження дало можливість установити і порівняти вплив протипухлинних хіміопрепаратів доксорубіцину, метотрексату та

5-фторурацилу на морфологічні, морфометричні, імуногістохімічні, спектроскопічні, денситометричні і механічні показники репаративного остеогенезу в експериментальному дефекті діафіза стегнової кістки. Встановлені нові факти є морфологічною основою для прогнозування морфологічних змін динаміки загоєння дефекту діафіза довгої кістки скелета за умов дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів.

Отримані експериментальні дані можуть бути використані в лекційних курсах кафедр нормальної і патологічної анатомії, гістології; навчальних закладах медичного профілю.

Результати експериментальних досліджень впроваджені в навчальний процес морфологічних кафедр провідних ЗВО України: кафедри анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського; кафедри анатомії людини імені М. Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету; кафедри нормальної анатомії людини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького; кафедри анатомії людини Волинського національного університету імені Лесі Українки; кафедри патологічної анатомії Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету.

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Автором здійснений інформаційний пошук літературних даних за темою дисертації, самостійно виконані всі експериментальні дослідження, проведене статистичне опрацювання даних експерименту, узагальнення та аналіз отриманих результатів, сформульовані висновки. Дисертантом підготовлені всі праці до друку та виступів на конференціях. Поставлення мети і завдань дисертаційної роботи, обговорення результатів проведено разом із науковим керівником.

Апробація результатів дослідження. Результати досліджень, що включені до дисертації, обговорені на: VII Конгресі наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України (м. Одеса, 2–4

жовтня, 2019 р.), Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Biomedical perspectives II» (м. Суми, Україна, 20–22 жовтня 2020 р.), Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих наук «Biomedical perspectives III» (м. Суми, Україна, 26–28 жовтня 2021 р.), підсумковій LXIV науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, Україна, 11 червня 2021 р.), VI Міжнародній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Проблеми, досягнення та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук» (м. Миколаїв, Україна, 29 жовтня 2021 р.), II Міжнародній науковій конференції «Здобутки та досягнення прикладних та фундаментальних наук XXI століття» (м. Рівне, Україна, 5 листопада 2021 р.).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковані у 8 статтях, із яких 6 статей у фахових наукових виданнях України (2 – оглядового характеру, 2 статті з кількістю співавторів більше двох) і 2 статті в закордонних наукових виданнях (Польща, Азербайджан), що індексуються наукометричною базою Scopus і відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank належать до четвертого квартиля (Q4). Також опубліковано 5 тез у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертаційна робота викладена українською мовою на 196 сторінках, із яких 149 сторінки (6,2 авторських аркуша) займає основний текст. Дисертаційна робота містить анотацію і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків. Дисертація ілюстрована 73 рисунками, 3 таблицями. Список цитованої літератури налічує 252 джерела, з яких 56 кирилицею і 196 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Сучасні уявлення про репаративну регенерацію кісток

Велика кількість досліджень щодо особливостей репаративної регенерації кісткової тканини на сьогоднішній день привели до помітного успіху у лікуванні травм кісток. Проте зростання частоти виникнення переломів, наявність значних дефектів кісток при травмі, розвиток ускладнень при їх загоєнні, зокрема у вигляді незрощень, втрата працездатності людини на тривалий проміжок часу обумовлюють необхідність подальшого вивчення особливостей репаративного остеогенезу для успішного швидкого відновлення цілісності кісток у пацієнтів [14].

Відомо, що кістки – це високоваскуляризований та динамічний природний композит, які постійно оновлюються протягом усього життя. На думку Пікалюка В. С., Мостового С. О., кістки є «універсальним» матеріалом, оскільки вони одночасно виконують багато різнопланових функцій, а саме: захищають внутрішні органи від пошкоджень, мають високі механічні властивості, функціонують як ендокринний орган, відіграючи важливу роль у гомеостазі мінералів, зокрема іонів Ca та P [15]. На відміну від інших тканин та органів, кісткова тканина зазвичай має кращу здатність до самовідновлення, оскільки пошкоджена частина може відновити свою початкову структуру та механічну міцність, не залишаючи фіброзних рубців [16, 17]. Однак великий розмір кісткових дефектів, інфекція, резекція пухлини кісток, а також необхідність призначення певних груп лікарських засобів (глюкокортикоїди, цукрознижувальні препарати з групи тіоглітазонів) для лікування супутніх хвороб є факторами, що перешкоджають самостійному повноцінному загоєнню кісток та вимагають стороннього розумного клінічного втручання [18]. Згідно з епідеміологічним дослідженням у 2010–2025 рр. установлене зростання частоти виникнення

переломів кісток в Європі на 28 % щорічно з додатковим економічним навантаженням на 25 %, що привертає велику увагу досліджень медицини для відновлення кісток [19].

Відповідно до сучасних уявлень репаративна регенерація кістки — це каскад клітинних та молекулярних реакцій, що призводять до утворення в ділянці перелому кісткової тканини, ідентичної початковій [20].

На думку Ткаченко С. С. та Руцького В. В., репаративна регенерація — це складний процес, спричинений руйнуванням кісткових структур, що кількісно перевищує допустимі межі фізіологічної регенерації і спрямований на відновлення анатомічної цілісності та забезпечення функції кістки [21].

Claes L. та співавтори стверджують, що загоєння переломів є складним, суворо регульованим процесом із послідовними й тісно пов'язаними трьома фазами — запалення, відновлення та ремоделювання. Оптимальне загоєння перелому вимагає відповідних біологічних, а також біомеханічних умов. Зокрема, механічне середовище істотно впливає на диференціацію тканин під час загоєння кістки: стабільна фіксація перелому викликає пряме утворення кістки, помірна стабільність стимулює ендохондральне окостеніння, в той час як нестійка фіксація гальмує загоєння кісток [22].

Pivonka P., Dunstan C. R. вважають, що загоєння переломів кісток — це складний процес, що включає чотири основні фази: відновлення, двофазної репарації з утворенням м'якої мозолі, утворення твердої мозолі та ремоделювання або анаболічної / катаболічної моделі [23].

На підставі системних спостережень Бруско А. Т., Гайко Г. В. при загоєнні переломів виділяють наступні чотири стадії репаративного остеогенезу: репаративна реакція, формування зрощень кісткових відломків, зрощення кісткових відламків, функціональна перебудова кісткової мозолі та зрощених відломків з формуванням органної структури кістки [24]. Зокрема, у I стадії (стадії репаративної реакції) розрізняють такі чотири фази: 1 — гострі посттравматичні циркуляторні порушення тканиного кровопостачання; 2 — дегенерація, некроз клітин та дезорганізація

міжклітинних структур; 3 – проліферація мезенхімальних стовбурових клітин, які втратили життєздатність; 4 – диференціювання проліферуючих клітин у напрямку утворення кісткового диферону (мезенхімальна стовбура клітина – преостеобласт – остеобласт – остеоцит) [25].

Корж Н. А. та Дєдх Н. В. на основі результатів досліджень морфології, імуноморфології, молекулярної біології, біохімії, та генетики виділили п'ять стадій репаративного процесу [26, 27, 28]:

- 1) запалення;
- 2) диференціювання клітин і формування тканинспецифічних структур в ділянці травми;
- 3) реорганізація тканинних структур і мінералізація;
- 4) ремоделювання;
- 5) завершення.

Після виникнення перелому в ділянці кісткового дефекту внаслідок травми кровоносних судин, кісток та оточуючих м'яких тканин розвивається гематома, яка зберігається в місці перелому до декількох днів. Вона має важливе значення для подальшого перебігу репаративного остеогенезу, оскільки є джерелом остеогенних клітин, нейтрофілів, макрофагів й тромбоцитів, що беруть участь в ініціюванні запальної реакції, а також факторів росту (PDGF, VEGF, TGF- β), які стимулюють дозрівання кісткової тканини [29, 30].

За допомогою досліджень, проведених Linda Vi та співавторами (2014) встановлено, що саме макрофаги відіграють важливу роль під час запалення в ділянці перелому. Вони секретують IL-1, IL-6, TNF- α , які є прозапальними цитокінами, що визначають перебіг запалення у вогнищі тканиної деструкції. Зазначені цитокіни ініціюють запалення в ділянці перелому за рахунок розширення судин, посилення місцевого кровотоку, що забезпечує міграцію лейкоцитів із крові до місця запалення. Також макрофаги посилюють диференціацію мезенхімальних клітин-попередників до остеобластів, беруть участь у мінералізації кісткового матриксу остеобластами та відкладенні

колагену I типу під час відновлення кісткових дефектів. Це сприяє в подальшому повноцінному загоєнню переломів кісток [31].

У подальшому в гематомі відбувається деградація формених елементів крові та формується багата на фібрин грануляційна тканина, в межах якої утворюється м'яка кісткова мозоль. Реорганізація згустка з утворенням судин, міграцією та проліферацією малодиференційованих клітин відбувається впродовж перших 10–14 діб після перелому [32].

Наступна стадія – стадія диференціювання клітин і формування тканиноспецифічних структур у ділянці травми – характеризується активними процесами перебудови (резорбції) грануляційної тканини за рахунок високої активності остеокластів та появою в регенераті дрібнопетлястих кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини [33]. Репаративний остеогенез нерозривно пов'язаний з ангиогенезом, який на цій стадії регулюється ангиопоетином-1. Остеогенні клітини, розміщені ближче до кровоносних судин в ділянці перелому, диференціюються в остеобласти, що активно синтезують новоутворені кісткові трабекули. На формування кісткової мозолі впливає кількість мезенхімальних стовбурових клітин, адже вони є джерелом утворення остеобластів. При цьому відмічається зниження рівня трансформуючого фактору росту (TGF- β) та інтерлейкінів (IL-1, IL-6), що активують остеокластогенез, і підвищення активності кісткових морфогенетичних білків (BMP-5 і -6), які індукують клітинну проліферацію [34].

Третя стадія репаративної регенерації – реорганізація тканинних структур та їх мінералізація, триває від 9–25 діб до 16 тижнів після травми. Вона характеризується подальшим активним формуванням кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини та появою, переважно по краям дефекту, ділянок пластинчастої кісткової тканини з остеонами різного ступеня зрілості. При цьому відбуваються активні процеси мінералізації новоутвореного кісткового матриксу, що забезпечують остеобласти. Регулюється третя стадія репаративного остеогенезу макрофаг-

колонієстимулюючим фактором (M-CSF), TNF- α , RANKL і OPG, що ініціюють резорбцію міжтрабекулярних проміжків, заповнених сполучною тканиною, та стимулюють активність кісткових клітин, прискорюючи формування кісткової тканини. Так, TNF- α стимулює диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин в остеогені. У цей період знижується активність факторів росту TGF- β та підвищується активність кісткових морфогенетичних білків (BMP-3, -4, -7, -8), що регулюють процеси резорбції та мінералізації кісткової мозолі. Судинний ендотеліальний фактор росту забезпечує ріст та розвиток судин у кістковому регенераті в цей період [35].

Четверта стадія – ремоделювання, або функціональна адаптація – займає близько 70 % усього терміну консолідації перелому та може тривати від кількох місяців до 6–9 років. Ремоделювання є балансом між процесами резорбції, що забезпечуються остеокластами, та формуванням нової кістки остеобластами. У центрі кісткової мозолі в кінцевому підсумку утворюється компактна кістка, а її краї замінюються пластинчастою кісткою. Оскільки новоутворений кістковий регенерат має губчасту структуру і не здатний повною мірою забезпечити опорну функцію, то в подальшому відбувається адаптаційна перебудова кісткового регенерату з утворенням компактною кістки відповідно до дії сил внутрішнього напруження, що виникають під час функціонального навантаження на кістки [36].

П'ята стадія – завершення – характеризується наявністю істинного остеогенезу і формуванням кісткової тканини, яка не відрізняється від оточуючої непошкодженої кістки з відновленням її форми і функції [37].

На сьогодні досліджено багато різних факторів, що впливають на репаративний остеогенез. Зокрема, важлива роль під час загоєння переломів кісток належить мезенхімальним стовбуровим клітинам (МСК), які потрапляють у ділянку травми з кісткового мозку, оточуючих м'яких тканин та диференціюються в клітини мезенхімальної лінії, зокрема остеобласти, хондробласти та адипоцити. МСК необхідні для підтримання фізіологічного гомеостазу кісткової тканини і регенерації кісткових дефектів. Процеси

міграції МСК у зону дефекту регулюють кісткові морфогенетичні білки, зокрема BMP-7 та BMP-2 [38].

Результати останніх досліджень Claudia Loebel та співавторів (2018) свідчать про застосування МСК, отриманих із кісткового мозку та стовбурових клітини, для виготовлення біоміметичних і біоактивних інженерних каркасів кісткової тканини [39]. Кістково-тканинна інженерія стала перспективною стратегією лікування великих дефектів кісток, що стимулюють відновлення скелетно-м'язової тканини при лікуванні великих дефектів кісток та сприяють процесу загоєння [40, 41, 42].

Grayson W. та співавтори стверджують, що нові методи лікування, засновані на застосуванні МСК, отриманих з жирової тканини та кісткового мозку, можуть бути особливо плідними для розвитку скелетно-регенеративної медицини з метою лікування дефектів черепно-лицевих кісток, незрощення великогомілкової кістки та остеонекрозу головки стегнової кістки [43].

Згідно з даними Suskin J., Shapiro C. L. контроль за здоровою кістковою масою передбачає два рівні: на «макрорівні» регулювання здійснюється за допомогою системних гормонів (наприклад, андрогенів, естрогенів, кальцитоніну, паратиреоїдного гормону) і механічних сил, створюваних силою тяжкості. "Мікрорівень" забезпечується динамічним балансом між функцією остеобластів та остеокластів. Остеобласти, що походять із мезенхімальних клітин-попередників, відповідальні за формування нової кістки, тоді як остеокласти, що походять із гемопоетичних клітин-попередників, забезпечують резорбцію кістки [44].

За даними сучасної літератури, регенерація кісткової тканини безпосередньо залежить від функціональної активності остеогенних клітин, а саме остеобластів, остеоцитів та остеокластів [45, 46]. Зокрема, на початковій стадії репаративного остеогенезу остеокласти забезпечують резорбцію некротизованих фрагментів кістки в зоні дефекту та беруть участь у подальшому ремодельованні кісткової тканини [47]. Остеобласти утворюють

первинні кісткові балки, побудовані з колагенових фібрил. Вони синтезують кістковий матрикс, забезпечують його мінералізацією за рахунок утворення кристалів гідроксіапатиту, продукують неколагенові білки. Остеоцити здійснюють передавання механічного і хімічного сигналів остеобластам та остеокластам через покривні клітини, що запускає процеси ремоделювання в кістках [48].

Остеобласти становлять 4–6 % від загальної кількості клітин у кістках. МСК, що знаходяться в стромі кісткового мозку, внаслідок стимуляції місцевими факторами росту та кістковими морфогенетичними білками проліферують з утворенням преостеобластних клітин, які потім диференціюються в зрілі остеобласти та секретують кістковий матрикс для заповнення порожнин резорбції з подальшою мінералізацією новоутвореного остеїда. Після цього остеобласти вбудовуються в кістковий матрикс та розвиваються в остеоцити [49].

Остеокласти становлять 1–4 % від загальної кількості клітин у кістках, походять із моноцитів, наявних у кістковому мозку та відповідають за процеси резорбції кістки. Необхідно зазначити, що остеокласти мають унікальну будову, що оптимізує процеси резорбції кісток. Зокрема, клітинна мембрана остеокластів утворює хвилясту межу з поверхнею кісткового матриксу. Це збільшує площу поверхні мембрани, через яку відбувається секреція ферментів, що руйнують кістку, таких як тартрат-резистентна кислотна фосфатаза (TRAP), колагенази, еластази. Під час резорбції кісткового матриксу вивільняються різні фактори росту (наприклад, кісткові морфогенні білки (BMP), фактор росту пухлини-бета (TGF- β), фактор росту інсуліну (IGF), цитокіни та хемокіни, які потрапляють у мікросередовище [50].

За сучасними науковими даними, основними регуляторами диференціювання остеокластів є активатор рецептора ліганду NF- κ B (RANKL), що продукується остеобластами. За його наявності кілька моноцитів зливаються разом з утворенням зрілого багатоядерного остеокласта [51].

Інший ключовий цитокін, що регулює остеокластогенез – це CSF-1 або M-CSF (фактор, що стимулює колонії макрофагів). CSF-1 являє собою фактор росту поліпептиду, який зв'язується зі своїм плазматичним мембранним рецептором (CSF-1R), що кодується геном *c-fms*. CSF-1 був спочатку ідентифікований як регулятор макрофагів та їх попередників кісткового мозку. На сьогодні, CSF-1 (M-CSF) є важливим для розвитку та виживання преостеокластів [52]. Він індукує фосфорилування тирозину цитоплазматичного домену рецептора та ініціює різні сигнальні каскади, включаючи каскад MAP-кінази, які призводять до проліферації та диференціювання остеокластів [53, 54]. У дослідженнях Ming J. та співавтори встановили, що миші з дефіцитом CSF-1 є остеопетротичними. Це зумовлено порушенням резорбтивної функції остеокластів та призводить до збільшення склерозованої кісткової маси, що має знижені механічні властивості [55].

Згідно з даними Schaffler B. та співавторів, основним організатором скелетної діяльності визнані остеоцити, які утворюють взаємозв'язані мережі через невеликі тунелі, що називаються каналцями. Остеоцити становлять 90–95 % усіх клітин у кістці і здатні відчувати та інтегрувати механічні й хімічні сигнали з навколишнього середовища, щоб регулювати формування та резорбцію кістки. Нещодавні дослідження встановили, що механізми, за допомогою яких остеоцити відчують подразники та регулюють ефektorні клітини (наприклад, остеобласти та остеокласти), безпосередньо пов'язані із середовищем, у якому вони живуть (мінералізований матрикс кістки), та з'єднані один з одним у багатоклітинних мережах як через контакти клітина-клітина на щілинних з'єднаннях, так і через паракринну передавання сигналів, що виділяються. Передавання цих сигналів залежить від руху як розчинених речовин, так і через простір, що безпосередньо оточує остеоцити (тобто лакунарно-каналікулярну систему). Також досліджено, що регуляторні можливості остеоцитів виходять за межі кісток, включаючи роль в ендокринному контролі системного метаболізму фосфатів. Остеоцити, на які припадає 90–95 % усіх клітин у кістках, важливі для виявлення механічних

сил та взаємодії з остеобластами й остеокластами, щоб у відповідь спричинити формування або резорбцію кістки [56].

На думку Литвишко А. К. та співавторів, чим більший кістковий дефект, тим менша ймовірність утворення суцільного фібрин-кров'яного згустка. Тому центральна зона міжвідламкового дефекту залишається заповненою сироваткою з еритроцитами. У цій зоні спочатку утворюється хондроїд, а потім у нього вростають судини, навколо яких формуються кісткові трабекули. Для цього необхідний певний час, який залежить від об'єму хрящової частини регенерату. Тому третя стадія процесу загоєння діафізарного перелому (реорганізація тканинних структур та їх мінералізація) може тривати 2–4 міс. залежно від площі руйнування кістково-м'язового футляра. Завершення третьої стадії виначають на підставі відсутньої кутової рухомості відламків під час проведення мануального дослідження за наявності суцільного кісткового періостального регенерату на рентгенограмах [57].

На сьогодні, ключовими регуляторами процесів репаративної регенерації є декілька сигнальних шляхів, зокрема система RANK/RANKL/OPG, кісткові морфогенетичні білки та Wnt-сигналізація [58, 59].

Остеобласти формують нові кісткові структури та контролюють активність остеокластів за допомогою системи RANK / RANKL / OPG. Вона включає RANK–рецептор активатора ядерного транскрипційного фактора NF- κ B, його ліганд–RANKL та природній блокатор лігандрецепторної взаємодії остеопротегерин (OPG). Активність остеокластів і ступінь кісткової резорбції залежать від балансу між RANKL та OPG. У кістковій тканині RANKL експресується кількома типами клітин, включаючи остеобласти та Т-лімфоцити. RANKL – це трансмембранний білок II типу, що розщеплюється ферментами матричними металопротеїназами, та вивільняється в позаклітинне середовище у вигляді розчинного RANKL. Як мембрано-зв'язаний, так і розчинний RANKL зв'язуються з RANK, що запускає остеокластогенез та

призводить до посилення резорбції кісткової тканини [60]. Нещодавно Xiong J. та співавтори дослідили, що розчинний дефіцит RANKL не впливав на тяжкість втрати кісткової тканини. Це свідчить про роль зв'язаного з мембраною RANKL у патології остеопорозу [61].

Matsumoto T. та співавтори (2021) встановили, що рецепторний активатор ліганду ядерного фактора каппа В (RANKL)-RANK відіграє ключову роль у регуляції остеокластичної резорбції кістки, а пригнічення системи RANKL-RANK стало важливою терапевтичною мішенню для лікування остеопорозу, що характеризується порушенням міцності кісток та спричиняє підвищений ризик переломів. Здатність моноклонального антитіла IgG2 людини (деносумабу) пригнічувати активність RANKL і, тим самим, зменшувати остеокластогенез, стали широко використовувати для лікування остеопорозу впродовж останнього десятиліття в багатьох країнах [62]. Поряд із цим, у сучасній медицині RANKL широко використовується як маркер метастатичного ураження кісток скелета в людей з онкологічними захворюваннями. Високі рівні RANKL дозволяють виявити пацієнтів із порушенням кісткового метаболізму з посиленою резорбцією кісток. Це дає можливість завчасно розпочати профілактичне лікування та попередити розвиток подальших кісткових ускладнень у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями [63].

На відміну від RANK OPG є фактором інгібування остеокластогенезу. Він належить до суперродини рецепторів фактору некрозу пухлини, секретується остеобластами. OPG діє як рецептор-пастка для RANKL, зв'язуючи RANKL, що пригнічує проліферацію й диференціювання остеокластів, і таким чином знижує інтенсивність остеокластичної резорбції кісткової тканини [64].

Згідно з дослідженнями останніх років, важлива роль у регуляції остеобластогенезу належить також кістковим морфогенетичним білкам (BMP, bone morphogenetic protein). Це група сигнальних факторів росту (цитокіни), що стимулюють формування енхондральної кісткової тканини та

регулюють різні клітинні процеси (проліферацію, диференціювання, апоптоз, хемотаксис, ангиогенез і продукцію позаклітинного матриксу в тканинах). BMP запускають процес утворення кісткової тканини за рахунок експресії генів, що регулюють процеси диференціації мезенхімальних стовбурових клітин із подальшим утворенням остеобластів [65, 66].

Згідно із сучасними даними наукових досліджень порушення регуляції сигнальної системи BMP дуже часто виявляються при ракових захворюваннях. На сьогодні відомо 47 білків підродина BMP, що взаємодіють із специфічними BMP-рецепторами (BMPs). Зокрема, в кістковій тканині в процесі міжклітинних взаємодій особливо важливі наступні: BMP 2 (стимулюють диференціювання остеобластів), BMP 3 (стимулює формування кісткової тканини), BMP 7 (активує диференціювання остеобластів, стимулює утворення SMAD1), а також BMP 8a (бере участь у розвитку кістки і хряща) [67, 68]. За останніми науковими даними, BMP широко використовують для стимуляції процесів регенерації. Їх уводять у кістковий імплант, звідки вони потрапляють до місця перелому для поліпшення остеогенезу [69].

Важливим регулятором процесів кісткового ремоделювання є трансформуючий фактор росту- β 1 (TGF β 1), який виділяють у міжкістковий матрикс кісткові клітини. Він активує диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин за остеобластичним і хондральним типом, стимулює процеси репаративної регенерації кісток скелета, посилює проліферацію і синтез колагену [70].

Установлено, що на процеси, пов'язані з морфогенезом клітин, впливає зокрема Wnt-сигналізація. Це група білків, які були відкриті на початку 80-х років XX ст. як маркери багатьох видів ракових захворювань. Вони є також ключовими регуляторами процесів ремоделювання та регенерації кісток, диференціювання мезенхімальних стовбурових клітин [71].

Досліджені два основні шляхи Wnt-сигналізації в кістковій тканині – канонічний та неканонічний (β -катеніннезалежний). В основі канонічного

шляху лежить стабілізація білка цитоплазми β -катеніну. Встановлено, що за відсутності сигналу він є неактивним та швидко руйнується. Під час активації β -катеніну Wnt зв'язується з поверхневими рецепторами клітин, представленими трансмембранним білком Фрізельда (Frizzled). Внаслідок цього гальмується руйнування β -катеніну, що накопичується в цитоплазмі та проникає в ядро, де взаємодіє з білками TCF / LEF (T-клітинний фактор / лімфоїдний фактор, що посилює зв'язування внутрішньоядерних компонентів), які вибірково зв'язуються з певними білками-активаторами. Внаслідок цього відмічається активація генів, які блокують апоптоз остеобластів та підтримують їх життєздатність, а також стимулюють проліферацію та диференціювання стовбурових клітин, що посилює регенерацію кісткової тканини [72].

Інший, неканонічний (β -катеніннезалежний), шлях Wnt-сигналізації стимулює метаболізм кальцію, регулює полярність клітин та реорганізацію цитоскелета [73].

Результати досліджень Shang S. та співавторів установили участь β -катеніну в пухлинній трансформації та прогресії деяких злоякісних пухлин, зокрема, раку щитоподібної, передміхурової залоз, товстого кишківника. Продовження досліджень у цьому напрямку дозволить не лише використовувати β -катенін як потенційний предиктор злоякісних пухлин, а й розробити в подальшому підходи до їх таргетної терапії [74].

Einhorn T., Gerstenfeld L. зазначають, що сімейство сигнальних молекул Wnt на сьогодні перебуває в центрі уваги досліджень, спрямованих на покращення загоєння скелета. Встановлено, що в людини до активації Wnt-сигналів залучено 22 Wnt-ліганди. Канонічна активація сигналізації Wnt стимулює остеобластогенез та інгібує адипогенез біпотенціальних мезенхімальних попередників [75]. Grigorie D. та співавтори встановили, що Wnt 1, Wnt 3a, Wnt 6 і Wnt 10b є стимуляторами канонічного передавання сигналів Wnt у багатьох типах клітин, включаючи остеобласти. Вони індукують диференціацію остеобластів, що призводить до збільшення

трабекулярної та кортикальної кісткової маси в довгих кістках, хребцях і збільшення міцності кістки. Проте окремі стимулятори неканонічної сигналізації Wnt, а саме Wnt 4, Wnt 5a, Wnt 7b, також посилюють утворення кістки, одночасно зі зниженням резорбції кістки. Досліджено, що передавання Wnt-сигналів стимулює продукцію OPG, який зв'язується з RANKL і пригнічує взаємодію з RANK, що приводить до зниження резорбції кісткової тканини [76].

Антагоністами Wnt/ β -катенін-сигнального шляху є склеротин-глікопротеїд, що продукується остеоцитами непошкодженої кістки і гальмує формування кісток шляхом пригнічення в мезенхімальних стовбурових клітинах Wnt-сигналу, перешкоджаючи їх диференціюванню [77]. В експериментальних дослідженнях Udagawa N. та співавторів (2020) встановлено, що експресію склеростину пригнічують наступні фактори: механічна стимуляція, паратгормон, простагландин E2 та інтерлейкін IL-6, онкостатин M, фактор інгібування лейкемії і кардіотропін-1. Крім того, кілька досліджень на людях і мишах продемонстрували, що експресія склеростину була знижена в умовах посиленої резорбції кісткової тканини, наприклад при остеопорозі [78].

Нещодавно були відкриті наступні регулятори міжклітинних взаємодій між остеобластами й остеокластами. Це семафорини та їх рецептори алексини, які утворюють родину молекул із 8 основних класів секреторних і трансмембранних білків, що відповідають за передавання сигналів по аксонах [79]. Семафорини забезпечують регуляцію росту, розвитку та функціонування клітин опорно-рухової, нервової, серцево-судинної, дихальної та імунної систем. Зокрема, Semaphorin 4D (Sema4D), який є похідним остеокластів, діє на мембранний рецептор Plexin-B1, що розташований на поверхні остеобластів, пригнічуючи тим самим їх функцію. Це спричиняє активацію резорбції кісткової тканини та посилену її втрату. Семафорин 3B також сприяє активації остеокластів, проте семафорин 3 A,

навпаки, стимулює кісткоутворення. За останніми науковими даними встановлено, що для зупинки розвитку остеопенії має важливе значення інгібування семафорину 4D та семафорину 3B [80].

Відповідно до сучасних уявлень важлива роль у регуляції процесів репаративної регенерації належить білку SLIT3, що є секреторним похідним остеокластів. Він є остеопротективним фактором, що одночасно стимулює проліферацію остеобластів завдяки активації β -катенінового шляху та інгібує резорбцію кістки шляхом пригнічення диференціювання преостеокластів [81]. У експериментальних працях Koh J. M. встановлено, що тварини з відсутністю SLIT3 або його рецептора мають низькі показники утворення кісткової тканини та високу активність її резорбції [82].

Сучасним методом швидкої оцінки інтенсивності процесів кісткового ремоделювання (остеобласто- і остеокластогенезу) є дослідження біохімічних маркерів кісткового ремоделювання. Крім того, їх визначення дає можливість виявити пацієнтів із ризиком зниження кісткової маси, провести раннє оцінювання ефективності призначеного лікування, спрогнозувати ризик виникнення ускладнень та діагностувати на ранніх термінах появу кісткових метастазів [83, 84].

Відомо дві групи показників кісткового метаболізму. Це маркери резорбції кісткової тканини (тартратрезистентна кисла фосфатаза (TRAP), гідроксипролін, оксипролін, кальцій, продукти розпаду колагену I типу, піридинолін і дезоксипіридинолін та маркери синтезу кісткової тканини: остеокальцин (ОК), кісткова лужна фосфатаза (КЛФ), кістковий сіалопротейн (BSP), аміно- й карбоксикінцеві фрагменти проколагену I типу (АКФ, ККФ) [85, 86].

Біохімічні маркери резорбції кістки представлені продуктами руйнування колагену I типу (N- і C-телопептиди, піридинолін, дезоксипіридинолін) та ферментами, що беруть участь у руйнуванні кісткового матриксу під впливом остеокластів, зокрема це кісткова кисла фосфатаза [87].

Тартратрезистентна кисла фосфатаза (TRAcP) є ферментом, що секретується остеокластами. Вона представлена двома ізоформами – 5α (містить сіалову кислоту) і 5β (не містить сіалової кислоти), що експресуються різними тканинами (кістки, передміхурова залоза, селезінка) і клітинах (тромбоцити, еритроцити, макрофаги). Під впливом дії паратгормону відмічається зростання рівня TRAcP остеокластів, проте кальцитонін спричиняє його зменшення. Дослідження цього маркера використовують для моніторингу лікування препаратами, що пригнічують резорбцію кісткової тканини (бісфосфонатами, естрогенами та іншими) при онкологічних захворюваннях із метастазами в кістки, остеомалачії, хворобі Педжета, гіпертиреозі, множинній мієломі, хворобі Іценка-Кушинга [88, 89].

Важливим маркером кісткової резорбції є також катепсин К. Він виділяється зі зрілого остеокласта в міжклітинне середовище і є єдиною протеазою, здатною розщеплювати як потрійну спіраль, так і телопептиди колагенових волокон I типу, що становить приблизно 90 % органічного матриксу кісток. Також катепсин К може розщеплювати колаген типу II, переважний матриксний білок у хрящі, та активувати матрикс-металопроїназу-9, необхідну для деградації кісткового матриксу [90, 91]. Крім того, катепсин К бере участь у дефосфорилуванні остеопонтину за рахунок активації остеокластів тартратрезистентною кислотою фосфатазою. Це спричиняє пригнічення кісткової резорбції. Отже, катепсин К здійснює ауторегуляцію своєї активності через кислоту фосфатазу. Таким чином, катепсин К необхідний для резорбції кісток, опосередкованої остеобластами [92, 93, 94].

Згідно з останніми літературними даними, високі рівні активатора рецептора ліганду ядерного фактору κ -(RANKL), необхідного для остеокластогенезу, посилюють експресію катепсину К [95]. Це призводить не лише до втрати ендостальної кістки, а й обмежує формування окістя, спричиняючи деградацію періостину, та ще більше сприяє крихкості кісток [96, 97].

Наступна група маркерів кісткового ремоделювання – це маркери синтезу кісткової тканини, що характеризують опосередковано активність остеобластів. Вони беруть участь у формуванні кісткової тканини, продукції колагену I типу та інших компонентів остеоїда, процесах мінералізації кісткового матриксу гідроксіапатитом [98, 99].

Найбільш поширеним серед них є остеокальцин – вітамін-К-залежний неколагеновий білок кісткової тканини, що бере участь у процесі зв'язування кальцію та гідроксіапатиту з колагеном і подальшій мінералізації остеоїда під час формування кістки [100, 101, 102].

Остеопонтин також є структурним елементом кісткового матриксу. Він утворює міцні зв'язки на межі поділу мінерал–колаген, що можуть протистояти відокремленню мінералізованих колагенових фібрил і підвищувати в'язкість кісток. Тому зниження рівня остеопонтину спричиняє виникнення тріщин у кістковій тканині та їх поширення, що погіршить в'язкість кісток у подальшому. Необхідно зазначити про важливий вплив остеопонтину на регуляцію, диференціацію, міграцію та активацію остеокластів, оскільки він відіграє ключову роль у прилипанні остеокластів до кістки та утворенні пошкодженої зони під час процесу активної резорбції [103, 104, 105].

Результати останніх досліджень довели, що остеопонтин діє як пригнічувач мінералізації у своєму фосфорильованому стані. Холлінг Ліндер та співавтори продемонстрували, що фосфорильований остеопонтин зменшує мінералізацію, тоді як дефосфорильований – не зменшує. Згідно з цими дослідженнями, остеопонтин повинен дефосфорильоватися TRAcP під час резорбції, щоб забезпечити нову мінералізацію кісткової тканини остеобластами [106].

Проте необхідно зазначити, що остеопонтин є пізнім маркером мінералізації кісток, оскільки він регулює утворення та ріст мінеральних кристалів кісток [107, 108, 109, 110].

Результати досліджень Столярової О. Ю. свідчать про активне використання на сьогодні остеокальцину та остеопонтину, зокрема як онкоасоційованих маркерів при раку легень. Підвищений рівень зазначених маркерів свідчить про прогресування цього онкологічного захворювання з розвитком метастатичного ураження кісток [111].

За сучасними науковими даними, важливим маркером кісткоутворення є лужна фосфатаза. Відомо дві ізоформи лужної фосфатази – кісткова та печінкова. Досліджено, що в дорослої здорової людини кістковий і печінковий ізоферменти присутні в сироватці крові приблизно у рівному співвідношенні, проте в зростаючому організмі дітей та підлітків рівень кісткової лужної фосфатази становить 90 % від рівня загальної лужної фосфатази. Концентрація кісткового ізоферменту лужної фосфатази (остази) визначає стан метаболізму остеобластів та корелює з рівнем формування кістки. Помірне зростання активності лужної фосфатази в літніх хворих може відображати порушення мінералізації або бути пов'язаним із впливом деяких лікарських препаратів, що збільшують утворення печінкових ізоферментів [112, 113].

Наступний маркер формування кісткової тканини – кістковий сіалопротеїн II (BSP). Це кальційзв'язуючий глікопротеїн кістки, що містить сіалові кислоти, виробляється зрілими остеобластами, остеоцитами і тромбоцитами. BSP забезпечує мінералізацію кісткового матриксу та стабілізацію структури колагену [114]. Проте Wang L. та співавтори встановили важливу роль зазначеного маркера в розвитку метастазування клітин раку молочної залози, зокрема в кістки, завдяки з'язуванню BSP з інтегрином $\alpha\upsilon\beta3$ [115].

До важливих показників кісткового ремоделювання відносять також матриксні металопротеїнази, зокрема 4-го та 10-го типів [116]. Garcia-Garcia P. та співавтори дослідили, що з віком відмічається зниження протеолітичної активності матриксних металопротеїназ 4 і 10 типів, що свідчить про участь цих ферментів у процесах формування кісткової тканини [117]. Цю думку

підтверджують дослідження Мао L. та співавторів, в яких встановлена роль матриксної металопротеїнази-10 у стимулюванні BMP2-опосередкованої диференціації остеобластів [118].

Ключову роль у молекулярній регуляції остеокластогенезу відіграє також система RANKL та OPG. Унаслідок зв'язування RANKL із специфічним рецептором RANK, розташованому на остеокластах і дендритних клітинах, активується утворення зрілих остеокластів. Тому збільшення експресії RANKL призводить до посиленої резорбції кісткової тканини, а отже, до втрати кісткової маси [119, 120, 121].

OPG, рецептор фактору некрозу пухлини, інгібує зв'язування RANK і RANK-ліганду, що пригнічує диференціацію та активацію остеокластів і тому має велике значення в попередженні резорбції кісткової тканини. [122, 123, 124].

Характер ремоделювання кісткової тканини багато в чому залежить від балансу між продукцією RANKL та OPG. Підвищене співвідношення RANKL / OPG асоціюється зі здатністю підтримувати формування й активацію остеокластів. Коли клітини диференціюються, співвідношення RANKL / OPG зменшується. Дисбаланс системи RANKL / RANK / OPG призводить до серйозних порушень ремоделювання кістки, що лежить в основі руйнування кістки [125, 126].

Таким чином, репаративна регенерація кісткової тканини безпосередньо залежить від функціональної активності остеогенних клітин – остеобластів, остеоцитів та остеокластів. Важливими регуляторами репаративного остеогенезу є система RANK / RANKL / OPG, кісткові морфогенетичні білки та Wnt-сигналізація. Визначення біохімічних маркерів кісткового ремоделювання дає можливість швидко оцінити інтенсивність процесів кісткового ремоделювання (остеобласто– та остеокластогенез), виявити пацієнтів із ризиком зниження кісткової маси, провести ранню оцінку ефективності призначеного лікування, прогнозувати ризик

виникнення ускладнень та діагностувати на ранніх термінах появу кісткових метастазів.

1.2 Зміни кісткового метаболізму в онкологічних пацієнтів

Відповідно до сучасних уявлень розвиток онкологічного захворювання в організмі спричиняє порушення процесів кісткового метаболізму. Їх виникнення зумовлене як безпосереднім, так і опосередкованим впливом онкоклітин на кісткову систему [127].

Пухлинні клітини сприяють остеолізу кісткової тканини, опосередкованому остеокластами, за допомогою кількох механізмів. Онкоклітини можуть індукувати диференціювання остеокластів безпосередньо через експресію RANKL або можуть побічно стимулювати остеокластогенез через активацію остеобластів [128]. Зокрема, онкоклітини продукують широкий спектр факторів росту, таких як пептид, пов'язаний із паратиреоїдним гормоном – (PTHrP), який індукує експресію RANKL на остеобластах, що, у свою чергу, призводить до диференціювання багатоядерних остеокластів від мієлоїдних попередників [129, 130]. Зрілі остеокласти потім резорбують кістковий матрикс і дозволяють пухлинним клітинам рости і поширюватись у тканині [131, 132].

Sisay M., Mengistu G., Edessa D. дослідили, що онкоклітини, потрапляючи в мікросередовище кістки, виробляють широкий спектр цитокінів та факторів росту. Зокрема, це паратгормоноподібний білок (PTHrP, parathyroid hormone-related protein), під впливом якого остеобласти починають виробляти RANK-ліганди, що стимулює остеокластогенез і запускає процес резорбції кістки. Внаслідок цього в кістковий матрикс вивільняються цитокіни і наступні фактори росту: інсуліноподібний фактор росту-1 (IGF-1), трансформуючий фактор росту (TGF- β), фактор некрозу пухлин (TNF- α), тромбоцитарний фактор росту (PDGF) [133]. Крім того, самі онкоклітини продукують інтерлейкіни IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-11, простагландин E2 (PGE2),

що стимулюють проліферацію пухлинних клітин та спричиняють зростання продукції PTHrP і факторів росту в організмі. Ці множинні взаємодії між пухлинними клітинами та кістковим середовищем сприяють подальшому росту пухлини і розвитку метастазів. Таким чином, утворюється замкнене коло між остеолізісом та поширенням пухлини в організмі [134, 135].

За даними сучасних літературних джерел, розвиток в організмі злоякісного новоутворення спричиняє порушення кісткового метаболізму, що проявляється гіперкальціємією, остеопорозом, метастатичним ураженням кісток та виникненням патологічних переломів [136, 137, 138].

Розвиток гіперкальціємії в онкохворих зумовлений зростанням рівня не загального, а іонізованого кальцію в сироватці крові (вище ніж 2,6 ммоль/л). Існує два основних механізми розвитку гіперкальціємії. Перший виникає при остеолізі (вогнищевій кістковій деструкції) внаслідок секреції онкоклітинами факторів росту та цитокінів, що активують остеокласти і запускають процес резорбції кістки [139, 140, 141]. При цьому в судинне русло надходить така кількість іонів кальцію, яка перевищує екскреторні можливості нирок, і тому концентрація кальцію у плазмі крові зростає. Зазначений тип гіперкальціємії спостерігається при раку молочної залози з метастатичним ураженням кісток [142].

Другий, найбільш поширений механізм гіперкальціємії, – паранеопластичний, або гуморальний, пов'язаний із гуморальними факторами, що продукують онкоклітини. Основна роль серед них належить паратгормону, що активізує резорбцію кісткової тканини. Зазначений тип гіперкальціємії розвивається за відсутності метастатичного ураження скелета, зокрема, при недрібноклітинному раку легень [143].

За даними Hain В. А. в онкологічних хворих відмічається розвиток остеопорозу внаслідок прискореної втрати кісткової тканини, що призводить до зниження її мінеральної щільності, порушення міцності скелета, підвищуючи ризик виникнення переломів [144]. Це підтверджують дослідження Sturgeon К. М., в яких зростання частоти виникнення переломів

обумовлене низькою кістковою масою, змінами мікроархітектури кісток та підвищеною крихкістю скелета. Крім того, автор зазначає, що переломи крихкості (переломи, що протікають без травм), зазвичай, виявляються в хребті (компресійні переломи хребців), стегні та зап'ястку [145].

Крім того, в наукових працях Висоцького А. О. встановлено, що наявні в організмі онкоклітини пригнічують функцію остеобластів, які синтезують переважну більшість компонентів органічного матриксу, а саме: колаген I типу, лужну фосфатазу, остеокальцин, остеопоонтин, остеонектин, кістковий сіалопротейн. Унаслідок цього при зниженні активності остеобластів сповільнюється мінералізація кісток [146].

Поряд із цим кісткова тканина є об'єктом метастазування. Поширеність кісткових метастазів при раку молочної та передміхурової залоз становить 65–75 % випадків, щитоподібної залози – 60 %, легень – 40 %, нирок – 40 % [147].

За даними сучасної літератури, кісткові метастази займають третє місце щодо поширення метастазів злоякісних новоутворень після печінки та легень [148, 149]. Результати досліджень Coleman R. та співавторів свідчать, що метастатичне ураження хребта спостерігається в 59 % серед усіх кісткових метастазів, кісток таза – 49 %, ребер – 30 %, трубчастих кісток – 25 %, кісток черепа – 18 % [150].

Кісткова тканина є одним із найбільш поширених місць утворення метастазів, зокрема при раку легень, передміхурової, молочної, щитоподібної залоз, колоректальному раку, раку яєчників та злоякісній меланомі. Крім того, у двох третин пацієнтів із раком передміхурової та молочної залоз на II/III стадії розвиваються метастази в кістки [151].

Поява кісткових метастазів пов'язана з поширенням онкоклітин по кровоносних судинах. Понад 100 років тому Paget створив seed-and-soil теорію, згідно із якою онкоклітини метастазують у ті органи, де є сприятливі для них умови [152]. Метастази поширюються переважно по осі скелета, що відображає особливості розподілу червоного кісткового мозку [153]. Coleman R. E. та співавтори пов'язують такий розподіл з високою васкуляризацією

кісток (близько 10 % об'єму серцевого викиду припадає на кістки) та відносно низькою швидкістю кровотоку в них [154]. Так, онкоклітини мігрують через венозно-вертебральні сплетення Watson, які знаходяться в хребті, черепі, тазовому і плечовому поясах та характеризуються низьким тиском, відсутністю клапанів. Онкоклітина, яка потрапила в капіляри кісткового мозку, має можливість легко мігрувати в кістку завдяки відсутності базальної мембрани в капілярах [155].

Кісткові метастази можуть проявлятися болем у кістках, неврологічними порушеннями внаслідок компресії спинного мозку і нервів, патологічними переломами та гіперкальціємією. Усі ці прояви в літературі позначають терміном «skeletal-related events» (SRE), або «кісткові ускладнення» [156, 157].

За даними Renema N., Navet B. та співавторів, важлива роль у розвитку метастатичного ураження належить саме системі RANK / RANKL, яка контролює рухливість клітин і, отже, сприяє міграції злоякісних клітин по всьому організму. Цей механізм спостерігався при раку передміхурової, молочної залози, раку товстої кишки, меланомі, плоскоклітинному раку порожнини рота, гепатокарциномі, раку ендометрію, остеосаркомі та раку нирки. RANKL-індукована міграція пов'язана зі специфічними сигнальними каскадами, особливо з активацією MAP-кіназних шляхів. Крім прямого впливу на ракові клітини, RANKL здатний модулювати мікрооточення пухлини, зокрема утворення нових кровоносних судин, що використовуються раковими клітинами для доставлення великої кількості поживних речовин і є їх основним засобом міграції для проникнення у віддалені органи [158].

Trieb K., Windhager R. установили, що експресія RANK є негативним прогностичним фактором щодо безрецидивного виживання онкологічних пацієнтів [159]. Цікаво, що у 2012 р. Parapanastasiou et al. ідентифікували нову ізоформу RANK (названу RANK-c), що експресується в зразках раку молочної залози та корелює з гістологічним ступенем цього виду раку.

Досліджено, що RANK-с здатний пригнічувати рухливість та міграцію клітин раку молочної залози, втручаючись у передавання сигналів RANK [160].

Дослідження Li X. та співавторів свідчать про те, що експресія RANK, RANKL та OPG може використовуватися як сучасний діагностичний маркер для ідентифікації пацієнтів із високим ризиком агресивного раку передміхурової залози. Встановлено, що ефективне пригнічення міграції онкоклітин за допомогою OPG через блокування активності RANKL є потенційним терапевтичним напрямком для запобігання метастазуванню пухлини передміхурової залози та її прогресуванню в кістку [161].

Розрізняють остеолітичні, остеобластичні та змішані кісткові метастази [161, 163].

За сучасними науковими даними, розвиток остеолітичних метастазів (у хворих на рак молочної залози, рак легенів, множинну мієлому) зумовлений виділенням онкоклітинами активної форми TGF- β (трансформуючий фактор росту), що спричиняє зростання рівня паратгормону. Останній за рахунок активації кісткового RANKL запускає процес резорбції кісткової тканини. Внаслідок цього, накопичені в кістковому матриксі фактори росту (BMP, PGFs, TGF- β , IGFs), а також кальцій вивільняються в мікрооточення кістки, що, також, сприяє подальшій проліферації онкоклітин і ще більшому виробленню ними факторів росту та паратгормону. Інший варіант остеолітичного ураження скелета пов'язаний із безпосереднім руйнуванням кісток пухлиною завдяки продукції колагенази та інших ферментів і спостерігається переважно на пізніх стадіях раку [164, 165].

У разі остеобластичних метастазів (рак передміхурової залози) на поверхні трабекул навколо онкоклітин відбувається утворення нової кісткової тканини, щільність якої вища за норму. Формування цього виду кісткових метастазів відбувається за допомогою експресії таких остеобластстимулюючих факторів як ET-1 (ендотелін-1), Wnt, PDGF, FGFR, інсуліноподібного фактору росту і морфогенетичних білків [166]. Усе це

пригнічує секрецію остеопротегерину остеобластами, що блокує взаємодію RANKL-RANK і знижує активацію остеокластів [167, 168].

Остеолітичні метастази супроводжуються гіперкальціємією, гіперкальціурією та нормальним чи дещо підвищеним рівнем лужної фосфатази. У той самий час, у разі остеобластичних метастазів спостерігатиметься значне збільшення рівня лужної фосфатази та гіпокальціємія [169].

Дослідження Ottewell P.D. свідчать, що більшість пацієнтів мають остеолітичні кісткові ураження, а не остеобластні. Проте відмінність між двома типами кісткових уражень не є абсолютною, і багато пацієнтів мають як остеолітичні, так і остеобластні кісткові метастази [170]. Це підтверджують праці Паламарчук В.Б. та співавторів, у яких встановлено, що у хворих на рак молочної залози може бути фаза з переважанням остеолізу, за якою йде фаза формування склеротичних вогнищ [171].

Переважає більшість метастазів (90 %), за даними рентгенологічних досліджень, є літичними і виявляються в пацієнтів із раком нирки, легень та молочної залози [172, 173]. Встановлено, що саме наявність літичних метастазів збільшує ризик виникнення переломів кісток [174, 175].

Патологічні переломи як перший симптом прояву онкологічного захворювання найчастіше зустрічається при раку нирки та легень [176, 177]. Поява переломів свідчить про прогресування метастатичного захворювання кісток. Вони часто є маркером термінальної стадії раку та кінця функціональної незалежності [178]. Досліджено, що період часу від діагностики раку до появи патологічних переломів у середньому триває 9–11 місяців [179, 180]. У подальшому виникнення патологічного перелому призводить до інвалідизації онкохворих та перешкоджає продовженню їх протипухлинного лікування, що негативно впливає на тривалість життя таких пацієнтів [181, 182, 183]. Так, Hill T. дослідив, що середня тривалість життя онкологічних пацієнтів після виникнення патологічного перелому становить чотири місяці [184].

Отже, розвиток в організмі онкологічного захворювання спричиняє порушення кісткового метаболізму у вигляді остеопорозу, метастатичного ураження кісток, що в подальшому призводять до виникнення патологічних переломів.

1.3 Вплив протипухлинних хіміопрепаратів на кістковий метаболізм

Значний прогрес у своєчасній діагностиці та лікуванні онкологічних захворювань за останні десятиліття призвів до поліпшення виживання онкохворих, водночас викликаючи занепокоєння щодо довгострокових наслідків лікування протипухлинної хіміотерапії [185, 186, 187].

Побічні ефекти у вигляді остеопенії та остеопорозу, що пов'язані з лікуванням хіміопрепаратами, істотно впливають на якість життя пацієнтів [188, 189]. Здоров'я кісток є особливо важливим для пацієнтів із пухлинами молочної залози, передміхурової, щитоподібної залоз, нирок, легень [190, 191].

Існує близько 60 груп хіміопрепаратів [192, 193, 194]. Найчастіше за наявності кісткових метастазів для проведення хіміотерапії призначають наступні хіміопрепарати: 5-фторурацил, тамоксифен, лаферобіон при раку нирки; схеми САФ (циклофосфан, доксорубіцин, 5-фторурацил) або ФАС (фторурацил, доксорубіцин, циклофосфамід), метотрексат при раку молочної залози; схему СР (цисплатин і гемцитабін) або ТР (таксотер і цисплатин) при метастатичному недрібноклітинному раку легень; схеми САУ (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрістін) або ТС (паклітаксел, карбоплатин) при дрібноклітинному раку легень; ципротерона ацетат (андрокур) при метастазах раку передміхурової залози [195, 196].

Але, необхідно зазначити, що протипухлинні препарати не мають вибіркового впливу на злоякісне новоутворення. Їх застосування токсично

впливає як на онкоклітини, так і на весь організм загалом, спричиняючи розвиток тяжких ускладнень [197].

Зокрема, за останні роки значна кількість наукових досліджень присвячена вивченню впливу протипухлинної хіміотерапії на кістковий метаболізм. Так, на думку Rühle A. та співавторів одним із небезпечних ефектів протипухлинних хіміопрепаратів є пригнічення функцій кісткового мозку, оскільки джерелом репаративного остеогенезу є саме мезенхімальні та гемопоетичні стовбурові клітини, завдяки проліферації й диференціюванню яких відбувається оновлення кісткової тканини. Відомо, що з мезенхімальних клітин утворюються остеобласти та остецити, а з гемопоетичних – остеокласти. Ті цитотоксичні хіміопрепарати, які знищують або пошкоджують поліпотентні клітини, виявляють кумулятивний, пошкоджуючий вплив на кістковомозкове кровотворення та спричиняють виснаження невідновних первинних клітин-попередників кістковомозкового резерву [198].

Naug E. встановив, що палбоцикліб, який призначають при лікуванні метастатичного раку молочної залози, спричиняє нейтропенію. Це є фактором, що обмежує дозу застосування палбоциклібу в людей. У проведених ним дослідженнях на щурах і собаках пригнічення функцій кісткового мозку зумовлене зупиненням клітинного циклу, без апоптозу в клінічно значущих концентраціях та було зворотним після відміни палбоциклібу. Навпаки, лікування хіміотерапевтичними засобами (паклітакселом і доксорубіцином) призводило до пошкодження ДНК та апоптотичної загибелі клітин кісткового мозку. Отже, палбоцикліб спричиняє зворотне пригнічення кісткового мозку, чітко відрізняючи його від апоптотичної загибелі клітин, спричиненої цитотоксичними хіміотерапевтичними засобами [199].

Високий ступінь агресивності злякисних новоутворень в наш час потребує необхідності призначення високодозних схем протипухлинних хіміопрепаратів. Так, Чорний В.С., Коноваленко В.Ф. та співавтори в

дослідженні встановили, що призначення високодозних курсів метотрексату для лікування саркоми довгих трубчатих кісток у підлітків супроводжується розвитком мієлосупресії, що проявляється істотним зниженням рівня лейкоцитів [200]. Передозування будь-якого з цитостатичних агентів, що мають кумулятивний вплив на клітини-попередники, спричиняє незворотну аплазію кісткового мозку, а саме розвиток апластичної анемії [201, 202].

Ступінь впливу різних груп хіміопрепаратів на кістковий мозок є неоднаковим. Зокрема, незначний токсичний вплив мають вінкрисин, блеоміцин, аспарагіназа, іфосфамід, цисплатин, 6-меркаптопурин; середня токсичність відмічається в карбоплатину, циклофосфаміду, доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату; висока – у вінбластину, кармустину, ломустину, цитарабіну, дактиноміцину, етопозиду, мелфолану, паклітакселу.

Ganguly R. та співавтори в експериментальних дослідженнях установили, що найбільш тривале пригнічення гранулоцитарного й еритроїдного ростків кісткового мозку відмічається при застосуванні 5-фторурацилу [203].

Lucas D. та співавтори в дослідженнях на мишах установили, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів, зокрема цисплатину, призводить до довготривалого пригнічення функцій гемопоетичних стовбурових або стромальних клітин унаслідок порушення процесів іннервації в кістковому мозку, що в подальшому має інгібуючий вплив на фізіологічну регенерацію кісткової тканини [204].

Дослідження, проведені Diker-Cohen та співавторами свідчать, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів спричиняє вкорочення теломерів у гемопоетичних клітинах. Це є кінцеві компоненти хромосом, та їх довжина в гемопоетичних стовбурових клітинах корелює з проліферативним резервом кісткового мозку. Одержані дані свідчать, що спричинене хіміотерапією раку вкорочення теломер є результатом прямого пошкодження гемопоетичних стовбурових клітин та індукції

проліферативного стресу на кістковий мозок при збереженні популяції стовбурових клітин [205].

Сучасні наукові дані свідчать про активне застосування протипухлинних груп хіміопрепаратів як для лікування онкологічних, так і ревматологічних захворювань, зокрема в дітей (гострий лімфобластний лейкоз, остеосаркома, ревматоїдний артрит) [206].

Georgiou K.R., Scherer M.A. та співавтори в експериментальному дослідженні при коротко- та довгостроковому застосуванні метотрексату у щурів молодого віку встановили зниження популяції клітин-попередників строми кісткового мозку та порушення диференціювання в бік адипогенезу за рахунок остеогенезу, що призводить до остеопенії й ожиріння кісткового мозку [207].

Fan C.M., Foster V.K., Hui S.K., Xian C.J. у дослідженнях на щурах молодого віку встановили, що довготривале застосування метотрексату спричиняє пошкодження пластинки росту кістки внаслідок апоптозу хондроцитів, а також призводить до ожиріння кісткового мозку та посиленого утворення остеокластів. Відомо, що ріст кістки зумовлений формуванням кальцинованого хряща в ділянці пластини росту, який спочатку перетворюється на губчасту кісткову тканину з послідувачим ремоделюванням у пластинчасту кісткову тканину в метафазі. У подальшому проведення довготривалої хіміотерапії високими дозами метотрексату спричиняє появу дефектів росту кісток за рахунок пригнічення утворення ендохондральної кістки, а також активації остеокластогенезу. Саме тому з метою зменшення зазначеного негативного впливу метотрексату важливим є обов'язкове приймання фолієвої кислоти при його застосуванні [208].

Наукові праці Pirker-Frühauf U. M. та співавторів свідчать про зниження мінеральної щільності кісток у дітей та підлітків при застосуванні метотрексату внаслідок значної втрати кісткової маси з ризиком виникнення в подальшому патологічного перелому [209].

Відповідно до сучасних уявлень протипухлинні хіміопрепарати сповільнюють продукцію остеопротегерину остеобластами та стимулюють остеокластогенез із подальшим розвитком остеопору. Rizzoli R., Body J.J. та співавтори встановили, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів пригнічує функції остеобластів та спричиняє зменшення їх кількості, що негативно впливає на синтез органічної основи кісткового матриксу і процеси мінералізації. Зокрема, вплив метотрексату на фізіологічну регенерацію полягає в стимуляції остеокластогенезу. Якщо загальна доза препарату перевищує 4 г/м^2 , то ризик розвитку остеопенії збільшується і відновити нормальну мінеральну міцність кісток після завершення лікування цим препаратом є неможливим [210].

Shapiro C.L., Recht A. при вивченні впливу циклофосфану, метотрексату й 5-фторурацилу під час лікування раку молочної залози у жінок встановили зниження мінеральної щільності кісткової тканини [211]. Водночас, автори зазначають, що навіть після припинення лікування 5-фторурацилом втрата кісткової тканини зберігалася, не відновлюючись. Жулкевич І.В. та Вибиран Р.Й. під час проведення денситометрії хребців поперекового відділу хребта в пацієнтів, хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію, встановили, що призначення доксорубіцину та циклофосфану зменшує мінеральну щільність кісткової тканини в онкохворих, спричиняючи розвиток остеопенічного синдрому [212].

Панчук Р., Бойко Н. в експериментальних дослідженнях на мишах установили, що застосування доксорубіцину на відміну від вінкрістину, внаслідок зупинки пухлинних клітин у фазі G2/M та індукції в них апоптозу спричиняє істотне зниження рівня ІЛ-6, що пригнічує активацію остеокластів [213].

В експериментальних дослідженнях Поворознюк В. В., Бистрицької М. А. та Орлика Т. В. встановлено негативний вплив протипухлинних хіміопрепаратів при лікуванні раку молочної та передміхурової залоз (даунорубіцину, вінкрістину, етопозиду та аспарагінази) на синтез основного

білка органічного матриксу кісток, а саме колагену 1-го типу, що виробляється остеобластами [214]. Зазначені зміни спричиняють зниження мінералізації кісткової системи та розвиток остеопорозу кісток.

Відповідно до сучасних уявлень, протипухлинні хіміопрепарати опосередковано впливають на процеси кісткового метаболізму. Зокрема, в наукових дослідженнях Rachner T. D. та співавторів встановлено, що застосування інгібіторів ароматази для лікування гормоночутливого раку молочної залози та агоністів гонадотропін-рилізінг-гормону при раку передміхурової залози (гозерелін, лейпролід і трипторелін) призводить до розвитку гіпогонадізму, що, також порушує процеси регенерації кісткової тканини. Це зумовлено зниженням рівня естрогенів, які відповідають за міцність кісток та стимулюють ростові фактори кісткової тканини, та андрогенів, необхідних для нарощування окістя. Зокрема, зниження рівня естрогенів призводить до активації RANRL, що посилює дозрівання та активність остеокластів [215]. Ураховуючи, що ендокринна терапія раку молочної та передміхурової залоз триває впродовж декількох років, сумарні втрати кісткової тканини збільшуються, що підвищує ризик виникнення переломів у пацієнтів [216].

Зокрема, хіміотерапія спричиняє пошкодження слизової оболонки кишківника з виразково-некротичними змінами, що перешкоджає всмоктуванню кальцію. З досвіду клінічних випадків Проценко В. В. та співавтори дослідили, що токсичне ураження нирок, яке спостерігається при призначенні більшості хіміопрепаратів, порушує баланс кальцію, фосфору, магнію, інгібує деградацію паратгормону і синтез кальцитріолу, що сприяє розвитку остеодеструкції [217].

Hain В. А. та співавтори у своїх дослідженнях на мишах при лікуванні раку молочної залози з метастазами в кістки встановили, що введення піддослідним тваринам карбоплатину (60 мг/кг) щотижня спричиняє прискорену втрату кісткової тканини, знижує мінеральну щільність кісток, спричиняє порушення міцності скелета. Також встановлено, що поряд із

позитивним ефектом від лікування протипухлинними хіміопрепаратами їх застосування призводить до збільшення циркуляції цитокінів із кісток, що робить кістку більш уразливою до метастатичного ураження пухлинними клітинами [218].

Негативний вплив протипухлинних хіміопрепаратів підтверджують також праці Кенуон М. та співавторів, у яких зазначено, що навіть одна доза цитотоксичних хіміопрепаратів призводить до значної й стійкої втрати кісткової тканини внаслідок посиленої резорбції кісток [219].

Отже, застосування протипухлинних хіміопрепаратів спричиняє загибель клітини з високою проліферативною активністю, сповільнює диференціювання стромальних і гемопоетичних клітин кісткового мозку, продукцію остеобластами інгібіторів остеокластів, порушує баланс макро- та мікроелементів, спричиняє виразково-некротичні зміни слизової оболонки кишківника з перешкоджанням усмоктуванню кальцію, сповільнює деградацію паратгормону та синтез D-кальцитріолу, знижує рівень естрогенів. Це спричиняє порушення процесів фізіологічної регенерації кісткової тканини з розвитком остеодеструкції та остеопорузу.

Резюме до розділу 1

Процес загоєння переломів кісток пов'язаний із діяльністю остеогенних клітин: остеобластів, остеокластів, остеоцитів. В основі регуляції репаративної регенерації лежать декілька сигнальних шляхів: система RANK / RANKL / OPG, кісткові морфогенетичні білки, Wnt-сигналізація. Остеобласто- і остеокластогенез характеризують біохімічні маркери кісткового ремоделювання, визначення яких дозволяє встановити швидкість обмінних процесів у кістковій тканині, виявляти пацієнтів із ризиком зниження кісткової маси, проводити ранню оцінку ефективності призначеного лікування, прогнозувати ризик виникнення ускладнень та діагностувати на ранніх термінах появу кісткових метастазів.

Пацієнти з онкологічними захворюваннями мають високий ризик розвитку остеопорозу і переломів кісток унаслідок прямого впливу самої пухлини та побічних ефектів хіміотерапії. Застосування протипухлинної хіміотерапії впливає на темпи ремоделювання кісткової тканини, зокрема, пригнічує функцію остеобластів, зменшує їх кількість, стимулює остеокласти й порушує процеси мінералізації кісткової тканини. Унаслідок цього відбувається зменшення маси кісткової тканини, що значно підвищує ризик виникнення переломів в онкохворих під час проведення хіміотерапії.

Ураховуючи велику частоту переломів кісток, зокрема в онкологічних хворих, необхідність проведення тривалих курсів протипухлинної хіміотерапії на фоні загоєння переломів, відсутність наукових даних щодо впливу хіміотерапії на формування кісткової мозолі, дослідження репаративної регенерації на тлі призначення протипухлинних хіміопрепаратів потребує подальшого вивчення.

Результати досліджень розділу 1 наведено в таких публікаціях:

1. Рябенко Т. В., Понирко А. О. (Огляд літератури). Аналіз впливу злоякісних новоутворень на стан кісткової системи та з'ясування дії протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Буковинський медичний вісник*. 2020. Т. 24, № 1 (93). С. 243–249. DOI: <https://doi.org/10.24061/2413-0737.XXIV.1.93.2020.33>. (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

2. Рябенко Т. В. (Огляд літератури). Сучасні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини та аналіз показників кісткового метаболізму. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т. 5, № 3 (25). С. 89–98. DOI: 10.26693/jmbs05.03.089. (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).

3. Рябенко Т. В. Вплив протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Збірник тез доповідей VII Конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України*. м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 р. С. 283.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Загальна характеристика експериментального матеріалу

Дослідження проведене на 480 білих нелінійних лабораторних щурах-самцях віком 7 місяців на момент початку експерименту (середня вага $220,0 \pm 10,0$ г). Тварин утримували в умовах віварію навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету на стандартному харчовому раціоні та питному режимі. Експеримент виконано з дотриманням вимог біологічної етики відповідно до Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою метою (Страсбург, 1985), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінки, 2000) та принципів проведення науково-дослідних робіт, визначених комісією з питань дотримання біоетики під час проведення експериментальних і клінічних досліджень навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету (протокол № 1/05 від 10 травня 2022 р.) [220, 221, 222].

2.2 Методика проведення експерименту

Піддослідні тварини були поділені на контрольну ($n = 24$) та три експериментальні (група I, II, III, $n = 72$) групи методом випадкової вибірки. Усім тваринам в умовах стерильної операційної під внутрішньовенним кетаміновим наркозом (50 мг/кг) в ділянці середини діяфіза стегнової кістки наносився дірчастий дефект діаметром 2 мм кулеподібною фрезою стоматологічного бору на глибину до кістковомозкового каналу під охолодженням. Нанесений дефект не призводив до повного перелому кістки, тому сама процедура була малотравматичною для прилеглих м'яких тканин.

Тварини експериментальної групи методом випадкової вибірки були поділені на три групи. Тваринам I-ї групи ($n = 24$) відразу після нанесення травми вводили внутрішньовенно фармацевтичний препарат доксорубіцин на фізіологічному розчині об'ємом 1,5 мл в дозі 60 мг/м², тваринам II-ї групи ($n = 24$) – 5-фторурацил на фізіологічному розчині об'ємом 1,0 мл в дозі 600 мг/м², тваринам III-ї групи ($n = 24$) – метотрексат на фізіологічному розчині об'ємом 1,0 мл в дозі 40 мг/м². Повторне введення зазначених хіміопрепаратів відповідним групам піддослідних тварин здійснювали в тих же дозах на 21-шу та 42-гу добу після нанесення травми. Тваринам контрольної групи вводили внутрішньовенно аналогічний об'єм (1,0–1,5мл) фізіологічного розчину за тією самою схемою (табл. 2.1).

Табл.2.1 – Розподіл експериментальних тварин

Термін експерименту	Контрольна група	I експериментальна група (доксорубіцин)	II експериментальна група (5-фторурацил)	III експериментальна група (метотрексат)
15 доба	30	30	30	30
30 доба	30	30	30	30
45 доба	30	30	30	30
60 доба	30	30	30	30
Всього	480 (експериментальних – 360, контрольних – 120)			

Тварин виводили з експерименту на 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після нанесення травми шляхом декапітації під внутрішньовенним кетаміновим наркозом (100 мг/кг) з подальшим вилученням травмованих довгих трубчастих кісток.

2.3 Методи дослідження

Для вивчення особливостей репаративного остеогенезу довгих трубчастих кісток скелета щурів в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів використовували наступні методи дослідження:

2.3.1 Гістологічне дослідження та морфометрія

Діафізи травмованих стегнових кісток фіксували в 10 % забуференому фосфатним буфером розчині формаліну впродовж однієї доби. Декальцинацію діафізів проводили в 5 % розчині азотної кислоти впродовж 14 діб (за умов щоденної зміни розчину) в умовах кімнатної температури. Після повної декальцинації, що визначали за допомогою голкового тесту, досліджуваний матеріал промивали проточною водою з подальшим зневодненням у розчинах спиртів зростаючої концентрації та заливали у парафін. Гістологічні зрізи товщиною 6–10 мкм виготовляли за допомогою санного мікротома «Shandon Finesse 325» (Thermo Scientific, USA). Гістологічні препарати зафарбовували гематоксилін-еозином. Аналіз гістологічних препаратів проводили за допомогою мікроскопа «Primo Star» (Carl Zeiss, Німеччина) із збільшенням 100 та 200. Фотодетекцію здійснювали за допомогою цифрової камери «AxioCam ERc 5s» (Carl Zeiss, Німеччина) із цифровим виходом зображення «ZEN 2 (blue edition)» (Carl Zeiss, Німеччина) [223].

Морфометричний аналіз проводили з використанням обчислювальної програми оброблення гістологічних зображень «Digimizer» за допомогою мікросітки та мікролінійки. У ділянці травми стегнової кістки щурів визначали наступні параметри: площу сполучної тканини, ретикулофіброзної кісткової та пластинчастої кісткових тканин.

2.3.2 Імуногістохімічне дослідження

Дослідження проводили на парафінових зрізах (4×10^{-6} м) декальцинованих ділянок стегнових кісток щурів, які підлягали стандартній депарафінації та зневодненню в ксилолі та спиртах у знижуючих концентраціях. Демаскування антигенів проводили у водяній бані «ВБ-4» за температури 97–98 °С у цитратному буфері (рН – 7,0). Реакція антиген – антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), що включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням «Ultra 55 block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцеву візуалізацію діамінобензидином (ДАБ) із дозбарвленням ядер гематоксиліном Маєра. У дослідженнях використана така панель антитіл («Thermo scientific», США) (табл. 2.2):

Таблиця 2.2 – Панель антитіл для ІГХ-дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення
Остеопонтин	Кролик	Поліклон	1:200
Катепсин К	Миша	Поліклон	1:200

Дослідження забарвленого імуногістохімічного препарату проводили за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Primo Star» (Німеччина) зі збільшенням 50, 100 та 200. Отримання та зберігання знімків проводили за допомогою цифрової камери «Zeiss AxioCfm ERc 5s» (Німеччина) із цифровим виходом зображення «ZEN 2 (blue edition)» (Німеччина).

Оцінювали експресію зазначених маркерів за кількістю забарвлених клітин у кістковому регенераті. Мікроскопічно визначали коричневе забарвлення цитоплазми імуноактивних остеогенних клітин. Оцінювання експресії цих маркерів проводили за допомогою шкали Allred [224]. Це

напівкількісна система оцінювання показників у балах за двома ознаками (табл. 2.3): співвідношення позитивно забарвлених клітин (за шкалою 0–5) та інтенсивність забарвлення (за шкалою 0–3). Ці обидва показники підсумовували для отримання загальних балів експресії катепсину К та остеопонтину в кістковому регенераті травмованої стегнової кістки й прилеглих до нього ділянках материнської кістки.

Таблиця 2.3 – Загальна оцінка імунореактивності клітин

Забарвлення (А), бали	Частка позитивно забарвлених клітин	Інтенсивність (Б), бали	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин
0	Відсутність	0	Відсутність
1	<1/100(<1 %)	1	Слабке
2	1/100-1/10(1-10 %)	2	Помірне / Середнє
3	1/10-1/3(11-33 %)	3	Сильне
4	1/3-2/3(34-66 %)	–	–
5	>2/3(67-100 %)	–	–

2.3.3 Растрова електронна мікроскопія з рентгенівською енергодисперсійною спектроскопією

Зразки травмованих стегнових кісток щурів попередньо фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Для подальшого аналізу тканиноспецифічних структур регенерату проводили злам у ділянці нанесення дефекту. Одержані зразки витримували впродовж 2 годин у буфері PBS із рН 7,4 для відмивання формаліну. Далі проводили дегідратацію кісткового матеріалу в спиртах зростаючої концентрації (50 %, 70 %, 90 %, 96 %, 100 %) по 30 хв у кожній із зазначених концентрацій. Потім досліджуваний матеріал висушували на повітрі до постійної ваги та напилювали сріблом у стандартному вакуумному приладі ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна). Для вивчення морфології поверхні кісткового регенерату використовували растровий електронний мікроскоп

(SEO-SEM Inspect S50–B) [225]. Елементний аналіз досліджуваних зразків проводили методом рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії (енергодисперсійний спектрометр AZtecOne із детектором X-MaxN20, виробник Oxford Instruments plc). Кількісний та якісний розподіл хімічних елементів визначали в наступних трьох точках: у кістковому регенераті, на межі регенерату з материнською кісткою та в материнській кістці, що прилягає до регенерату. Кількісний і якісний розподіл хімічних елементів досліджували за допомогою точкового та лінійного аналізів.

2.3.4 Комп'ютерна томографія

На 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу дослідження тварин контрольної та експериментальних груп в умовах внутрішньовенного кетамінового наркозу (30 мг/кг) фіксували на препараторському столі за 4 кінцівки вниз черевом. За допомогою спірального комп'ютерного томографа «Siemens Somatom Emotion 6» (Німеччина) досліджували динаміку загоєння дефекту діафіза стегнової кістки у відповідні терміни. Визначали оптичну щільність (ОЩ) регенерату та прилеглого до нього кортикального шару материнської кістки (МК) в одиницях Хаунсфільда (HU) [226, 227]. Аналіз зображень КТ проводили в програмі RadiAnt DICOM Viewer. Площа позиційного курсора (кола) становила 2рх.

2.3.5 Дослідження біомеханічних властивостей

Визначення характеристик міцності на стиск травмованих довгих трубчастих кісток щурів проводили на розривній машині Р–0,5 («Техмаш», Україна) з маятниковим силовимірювачем та ручним горизонтальним приводом (рис. 2.1). Визначали внутрішні силові чинники через дію на кістку зовнішніх сил за допомогою установки.



Рисунок 2.1 – Розривна машина Р–0,5.

Для дослідження зразки діафіза травмованих стегнових кісток готували таким чином, щоб співвідношення їх висоти (h) до діаметра (d) відповідало 3, оскільки саме таке співвідношення є найбільш оптимальним для визначення міцності на стиск у середній третині діафіза. Після фіксації зразків робили злам досліджуваних кісток із подальшим фотографуванням отриманого поперечного перерізу кісток (рис. 2.2 А, Б, В).

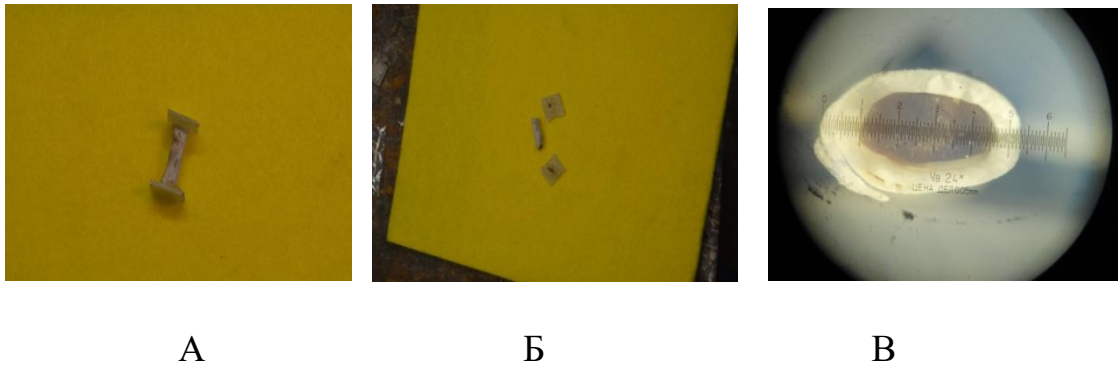


Рисунок 2.2 – А – фіксація зразків стегнових кісток; Б – злам травмованої стегнової кістки; В – фото зламів кісток на мікроскопі.

Фотографії зламів кісток були отримані на мікроскопі МПБ-2 (Ізюмський приладобудівний завод, Україна) за допомогою цифрової фотокамери фірми SONY «Cyber-shot» 6.0 megapixels. Для визначення площі поперечного перерізу застосовували штангенциркуль ШЦ-1-150-0.05 ГОСТ 166-89, цифровий оптичний пристрій та програмне забезпечення Autodesk-Autocad Mechanical. Площу зламу визначали за допомогою

комп'ютерного оброблення фотографії в спеціалізованій програмі «ImageProPlus».

Розрахунок межі міцності на стиск діафіза стегнової кістки σ , МПа,

здійснювали за формулою: $\sigma = \frac{F}{A}$, де:

σ – межа міцності на стиск, при якій руйнувалася кістка, $\frac{H}{\text{мм}^2}$;

F – навантаження при стисненні, що призвело до руйнування кістки, Н;

A – площа поперечного перерізу зразка, мм^2 .

Визначення статистичної мікротвердості проводили методом статистичного мікроідентування з використанням приладу ПМТ-3. Перед дослідженням поверхню стегнових кісток щурів із дефектом відполіровували алмазною суспензією (розмір зерна–250 нм) та фіксували зразок на металевому столику шляхом занурення в епоксидну смолу. Після її затвердіння визначення мікротвердості проводили в місці травми й на поверхні материнської кістки на відстані 10 мм від місця травми. У досліджуваній зразок під дією навантаження P вдавлювали алмазну піраміду Віккерса. Величина навантаження становила 0,1 кгс. На поверхні зразка після дії навантаження залишався відбиток у вигляді піраміди з квадратною основою. Зазначені вимірювання робили не менше ніж два-три рази.

Визначали показник мікротвердості HV, кгс/мм² за формулою 1.1:

$$HV = 1.854 \left(\frac{P}{d^2} \right),$$

де P – навантаження на піраміду, Н;

d – діагональ відбитка, мм.

2.3.6 Статистичний аналіз

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою статистичного пакету програм SPSS (версія 17.0, США). Виконували

дескриптивний аналіз кожної вибірки, розраховували середнє арифметичне значення (M) та стандартне відхилення (SD). Величини на нормальність розподілу перевіряли за допомогою критерію Колмогорова-Смірнова. Для оцінки відмінностей між незалежними вибірками використовували t-тест Стьюдента. Достовірною вважали різницю при значенні $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафіза стегнових кісток щурів контрольної групи

Травмовані стегнові кістки тварин контрольної групи використовували для порівняння з результатами експериментального дослідження. Вони були основою для визначення особливостей процесу загоєння дірчастого дефекту кісток в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів.

3.1.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту

Під час гістологічного дослідження на 15-ту добу після травми кістковий дефект був заповнений на $43,83 \pm 5,88$ % ретикулофіброзною кістковою тканиною і на $56,17 \pm 3,87$ % сполучною тканиною. Ретикулофіброзна кісткова тканина представлена трабекулами, що формували великопетлясті сітчасті структури з численними первинними остеобластами та остеоцитами. Новоутворені трабекули порівняно з материнською кісткою забарвлювалися нерівномірно та менш інтенсивно, що свідчить про початок осифікації в регенераті. Міжтрабекулярний простір заповнений сполучною тканиною з фібробластами, колагеновими волокнами та судинами. У материнській кістці поряд зі збереженими клітинами розміщувалися поодинокі порожні остеоцитарні лакуни. Краї материнської кістки відзначались ознаками резорбції. Межа між краями дефекту та регенератом була чітко візуалізована (рис. 3.1).

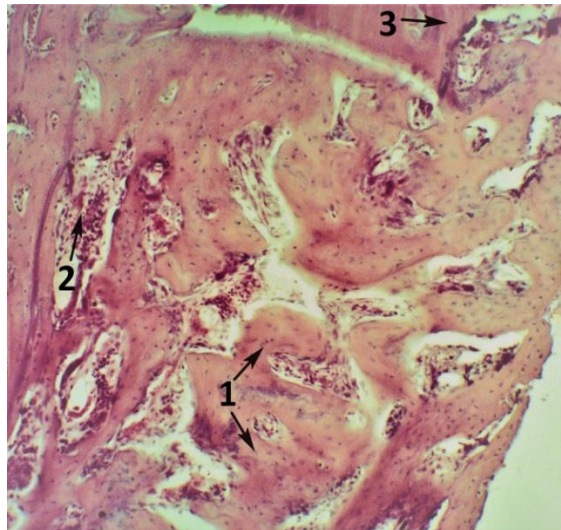


Рисунок 3.1 – Зона дефекту стегнової кістки тварини контрольної групи на 15-ту добу після нанесення дірчастого дефекту. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x100

За допомогою імуногістохімічного дослідження з визначенням маркерів кісткового метаболізму встановлені активні процеси диференціювання клітин та формування тканиноспецифічних структур у місці травми. У кістковому регенераті активність експресії маркера кісткової резорбції катепсину К визначали у $31,00 \pm 1,26$ % імуноактивних клітин, розташованих переважно в міжтрабекулярному просторі та ретикуло-фіброзній стромі, що свідчить про помірну проліферативну активність клітин (+++). Інтенсивність забарвлення цитоплазми відмічали як високу (+++). Однак клітини материнської кістки, прилеглі до краю регенерату, експресували катепсин К лише в поодиноких клітинах (5 %), що свідчить про низьку проліферативну активність у цій ділянці. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин оцінювали як помірну (++) (рис. 3.2).

Активність експресії остеопонтину, маркера кісткоутворення, в ділянці регенерату становила $18,17 \pm 1,47$ % імуноактивних клітин, інтенсивність їх забарвлення була низькою. Це свідчить про початок процесів осифікації в ділянці новоутворених кісткових трабекул регенерату (рис. 3.3).

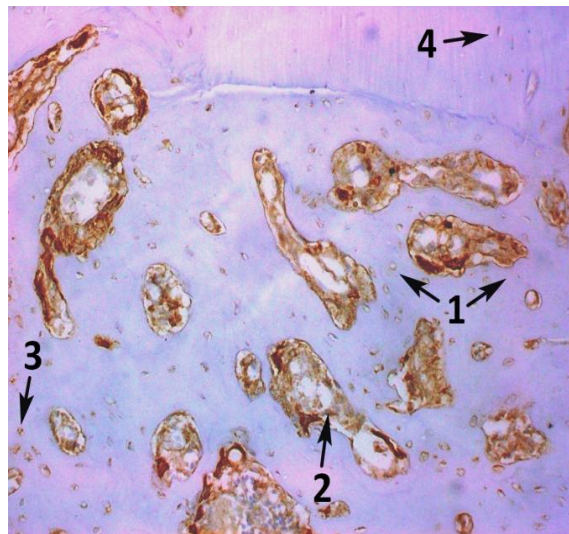


Рисунок 3.2 – Експресія катепсину К у регенераті стегнової кістки щурів контрольної групи на 15-ту добу після нанесення дірчастого дефекту. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – імуноактивні клітини, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x200

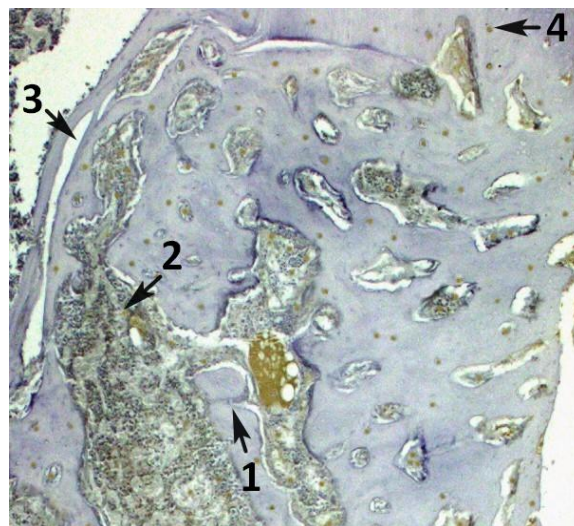


Рисунок 3.3 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового регенерату в контрольній групі щурів на 15-ту добу есперименту. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x50

На електронних сканограмах травмованих стегнових кісток у зоні дефекту відмічається формування кісткових трабекул крупнопетлястої структури з невпорядкованим розміщенням колагенових волокон та ділянки міжбалкового простору (рис. 3.4).

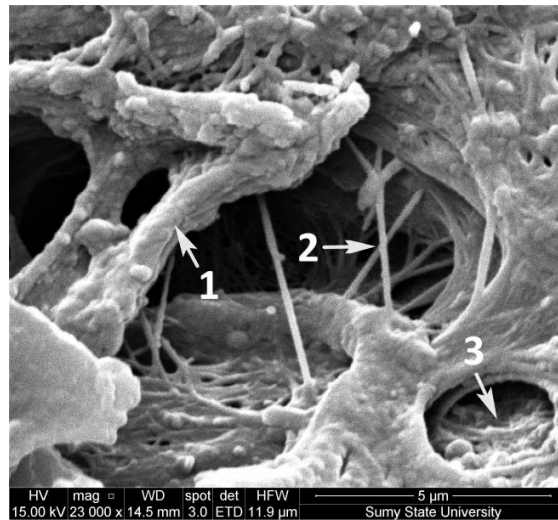


Рисунок 3.4 – Ділянка дефекту стегнової кістки на 15-у добу після травми у тварин контрольної групи. 1 – кісткові трабекули, 2 – колагенові волокна, 3 – порожня остеоцитарна лакуна. Зб. $\times 23\,000$

На поверхні новоутворених трабекул концентрація кальцію та фосфору становили $8,99 \pm 0,15\%$ та $4,30 \pm 0,14\%$ відповідно, що свідчить про початок кальцифікації органічного матриксу в регенераті. На поверхні материнської кістки вміст Ca та P визначався в межах $22,57 \pm 0,16\%$ та $13,05 \pm 0,19\%$. Відмічалось зниження рівнів Ca та P на межі регенерату й материнської кістки (Ca – $19,07 \pm 0,22\%$, P – $9,3 \pm 0,14\%$), що пов'язано з активацією процесів ремоделювання в ділянці новоутвореного кісткового регенерату та використанням ендогенного Ca для його осифікації.

Під час проведення КТ-дослідження в ділянці травми візуалізувався дефект без ознак консолидації. Оптична щільність (ОЩ) регенерату становила $646,50 \pm 31,72$ HU, проксимального відділу МК – $2463,00 \pm 59,86$ HU та дистального відділу МК відповідно $1849,00 \pm 18,51$ HU (рис. 3.5).

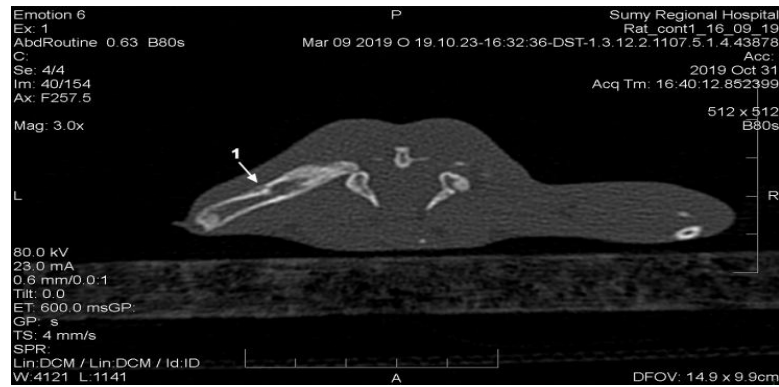


Рисунок 3.5 – Комп’ютерна томограма лівої стегнової кістки щура на 15-ту добу експерименту. 1 – дефект кортикального шару стегнової кістки

Дослідження біомеханічних показників травмованої стегнової кістки щурів на 15-ту добу експерименту визначило наступне: показник межі міцності на стиск становив $95,53 \pm 1,67$ МПа, показник мікротвердості в ділянці кісткового дефекту $485,83 \pm 36,22$ МПа.

Таким чином, на 15-ту добу з моменту травми в ділянці кісткового дефекту відбуваються процеси диференціювання клітин і формування тканинспецифічних структур регенерату, що проявляється формуванням ретикулофіброзної кісткової тканини у вигляді великопетлястих трабекул. Показники рівнів Ca та P у ділянці регенерату, а також активність експресії остеопонтину свідчать про початок мінералізації в ділянці новоутворених трабекул.

3.1.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту

На 30-ту добу після травми новоутворений регенерат на $52,33 \pm 4,15$ % був представлений кістковою тканиною. Ретикулофіброзна кісткова тканина загальною площею $28,83 \pm 4,07$ % у вигляді дрібнопетлястої сітки трабекул із численними остеocyтaми була зосереджена в центрі регенерату. Забарвлення балок більш рівномірне й за інтенсивністю наближалось до материнської кістки, що свідчило про нормалізацію осифікації остеоїда. У міжтрабекулярних просторах були збережені ділянки сполучної тканини загальною площею $47,67$

$\pm 5,05$ %, що на $15,13$ % ($p = 0,008$) менше, ніж у тварин контрольної групи на 15-ту добу експерименту, а також кровоносні судини та кістковий мозок. Навколо кровоносних судин відмічалось формування кісткових пластинок пластинчастої тканини ($23,50 \pm 4,23$ %), розташованих переважно по краям регенерату (рис. 3.6).

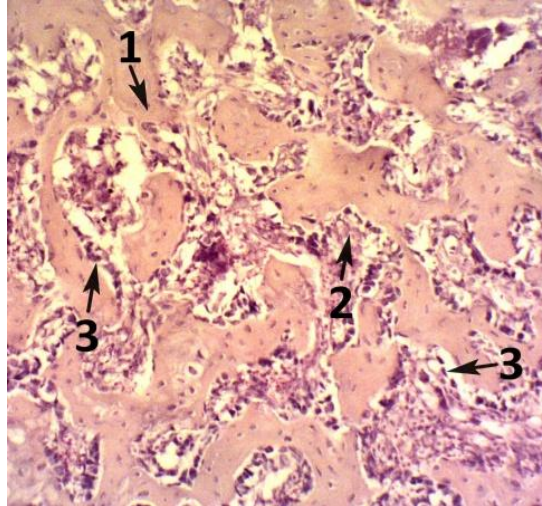


Рисунок 3.6 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу після травми. 1 –ретiculoфіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – остеобласти. Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. $\times 100$

Активність процесів перебудови тканин у ділянці кісткового регенерату підтверджують результати імуногістохімічного дослідження. Так, на 30-ту добу експерименту експресія катепсину К виявлена у $28,50 \pm 1,87$ % імуноактивних остеогенних клітин регенерату, що говорить про помірну проліферативну активність клітин. Це на $8,06$ % ($p=0,02$) менше, ніж у попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми визначалась як помірна (++) . Підвищена експресія катепсину К була зафіксована переважно на периферії регенерату та в ділянках материнської кістки, що прилягали до регенерату.

На 30-ту добу експерименту у $20,83 \pm 1,17$ % остеобластів визначалась активність експресії остеопонтину, що свідчить про зростання даного маркера

на 14,64 % ($p = 0,006$) порівнянно з попереднім терміном. Імуноактивні клітини були розташовані переважно по краям регенерату, інтенсивність забарвлення цитоплазми оцінювалась як низька.

На електронограмах на 30-ту добу експерименту основна частина дефекту представлена кістковими трабекулами ретикулофіброзної тканини та невеликими ділянками пластинчастої тканини, розміщеними переважно на периферії регенерату. У міжтрабекулярних проміжках спостерігали скупчення тромбоцитів, моноцитів. Зберігався вільний простір між регенератом і материнською кісткою (рис. 3.7).

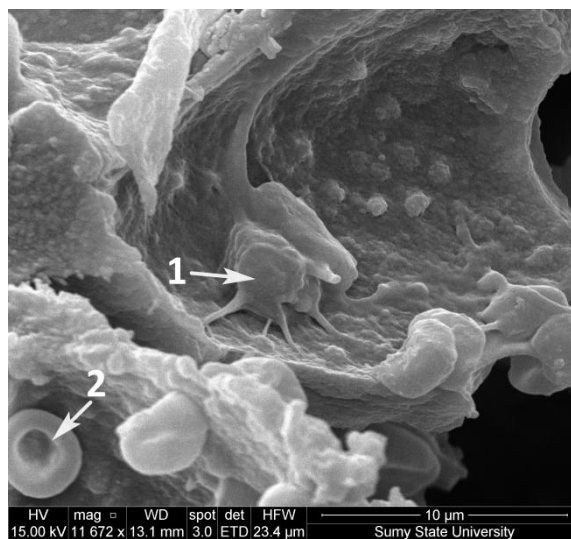


Рисунок 3.7 – Ділянка дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу після травми. 1 – остеогенні клітини у лакуні ретикулофіброзної кісткової тканини, 2 – еритроцити у міжтрабекулярних проміжках. Зб. x 11 672

Відмічається поступове зростання рівнів Ca та P у новоутвореному регенераті в межах $9,87 \pm 0,19$ % та $4,8 \pm 0,18$ %. Це свідчить про подальші активні процеси реорганізації тканинних структур та мінералізації в кістковому дефекті. У материнській кістці й на її межі з регенератом рівні Ca ($18,69 \pm 0,15$ %) та P ($9,14 \pm 0,18$ %) майже не змінюються порівнянно з попереднім терміном.

Під час проведення комп'ютерної томографії на 30-ту добу експерименту на КТ-знімках візуалізувався дефект стегнової кістки зі слабовираженими

ендостальними нашаруваннями товщиною 0,7 мм вздовж 3,1 мм (рис. 3.8). ОЩ регенерату порівнянно з попереднім терміном дослідження зросла на 42,66 % ($p < 0,05$) та становила $922,33 \pm 33,15$ HU. ОЩ у проксимальному відділі МК становила $2599,00 \pm 53,48$ HU, в дистальному – $2116,00 \pm 33,85$ HU.

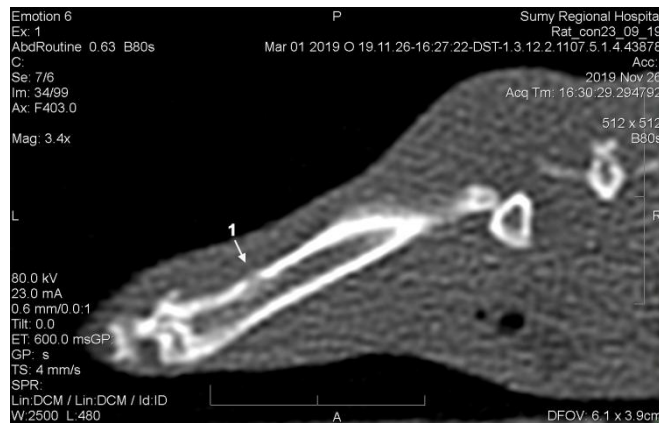


Рисунок 3.8 – Комп’ютерна томограма лівої стегнової кістки щура контрольної групи на 30-ту добу після нанесення дірчастого дефекту. 1 – дефект кортикального шару лівої стегнової кістки

Біомеханічні показники на 30-ту добу експерименту змінювалися таким чином: межа міцності на стиск діафізу травмованих стегнових кісток щурів становила $102,21 \pm 3,03$ МПА, що на 6,99 % ($p = 0,0008$) вище за попередній термін експерименту, мікротвердість регенерату визначалася в межах $506,00 \pm 19,33$ МПА, що на 4,15 % ($p = 0,25$) вище, ніж на 15-ту добу дослідження.

Отже, на 30-ту добу експерименту в ділянці кісткового дефекту відбуваються активні процеси перебудови регенерату, що проявляється зменшенням площі сполучної тканини, зростанням площі ретикулофіброзної кісткової тканини та появою пластинчастої кісткової тканини, розміщеної переважно по краям регенерату.

3.1.3 Репаративний остогенез на 45-ту добу експерименту

На 45-ту добу експерименту в ділянці регенерату відмічалось подальше збільшенням площі кісткової тканини, що становила $67,00 \pm 4,50$ %. Новоутворена кісткова тканина була представлена переважно

пластинчастим типом ($48,50 \pm 3,39$ %), у якій визначалися остеокласти, остеоцити, вторинні остеобласти та сформовані остеони. У центральній частині дефекту залишалися ділянки сполучної тканини ($33,00 \pm 4,15$ %), в яких спостерігався початок упорядкування колагенових волокон і трансформація їх в остеїдні балки (рис. 3.9).

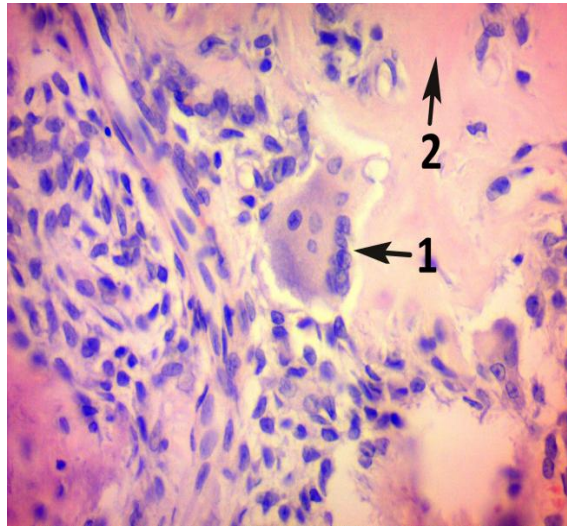


Рисунок 3.9 – Ділянка дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 45-ту добу після травми. 1 – остеокласти, 2 – кісткові трабекули. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х400

За допомогою імуногістохімічного дослідження встановлене подальше зниження експресії маркера кісткової резорбції. Катепсин К визначався у $25,17 \pm 1,47$ % клітин, що на $18,81$ % ($p < 0,005$) менше, ніж на початку експерименту й на $11,68$ % ($p < 0,005$) нижче за попередній термін дослідження. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як низьку (+). Поряд із цим відмічалось поступове подальше зростання маркера кісткоутворення. Так рівень експресії остеопонтину виявлявся у $24,00 \pm 1,41$ % імуноактивних остеобластів, що на $13,21$ % ($p = 0,002$) більше, ніж у попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною. Отже, встановлене в експерименті зниження активності експресії катепсину К у регенераті та підвищення експресії остеопонтину свідчать про переваження процесів

формування кісткової тканини в ділянці дефекту стегнової кістки над процесами резорбції й зростання процесів мінералізації в регенераті.

На сканограмах на 45-ту добу експерименту переважна більшість кісткового дефекту представлена пластинчастою та меншою мірою ретикулофіброзною кістковою тканиною. Відсутній вільний простір між материнською кісткою та регенератом (рис. 3.10).

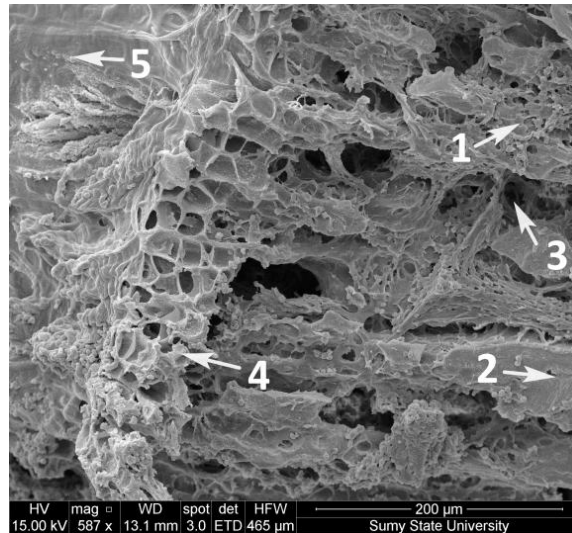


Рисунок 3.10 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин контрольної групи на 45-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – пластинчаста кісткова тканини, 3 – остеоцитарна лакуна, 4 – межа регенерату і материнської кістки, 5 – материнська кістка. Зб. x587

Рівні Ca та P в ділянці дефекту становили $11,2 \pm 0,21$ % та $5,3 \pm 0,18$ %, що на 13,47 % ($p < 0,005$) та 10,42 % ($p < 0,005$) більше, ніж у попередній термін експерименту. Зростання зазначених показників свідчило про активну мінералізацію в ділянці кісткового регенерату. Рівні Ca та P в материнській кістці ($21,45 \pm 0,19$ % і $12,55 \pm 0,19$ %) та на межі її з регенератом ($18,32 \pm 0,17$ % і $9,04 \pm 0,16$ %) майже не змінилися. Відмічалось зниження рівня Ca порівняно з попереднім терміном експерименту в материнській кістці на 0,6 % ($p = 0,34$) та на її межі з регенератом на 1,7 % ($p = 0,003$), P – відповідно на 2,33 % ($p = 0,019$) та 1,09 % ($p = 0,33$).

Під час проведення КТ в ділянці перелому кісткова мозоль була виражена задовільно за рахунок ендостальних і періостальних нашарувань, простежувалася лінія перелому вздовж 2,7 мм товщиною 1,3 мм. Відмічалось збільшення ОЩ регенерату на 58,51 % ($p < 0,05$) порівняно з 30-ю добою до $1462,00 \pm 30,89$ НУ. ОЩ дистального відділу МК становила $2333,00 \pm 39,27$ НУ, проксимального відділу $2676,00 \pm 28,30$ НУ.

Встановлене подальше поступове зростання біомеханічних показників травмованих стегнових кісток щурів порівняно з попереднім терміном: межі міцності на стиск ($110,88 \pm 5,20$ МПа) на 8,48 % ($p = 0,005$), мікротвердості ($514,50 \pm 12,60$ МПа) – на 2,47 % ($p = 0,21$).

3.1.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту

Переважну більшість дефекту заповнювала пластинчаста кісткова тканина загальною площею $81,33 \pm 4,89$ % у вигляді остеонів різного ступеня зрілості. Кровоносні судини були представлені у великій кількості, навколо них формувалися концентрично розміщені остеони (рис. 3.11).

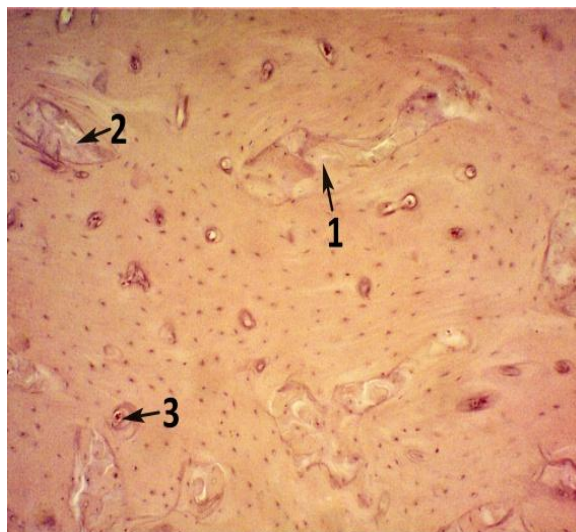


Рисунок 3.11 – Ділянка дефекту стегнової кістки щура контрольної групи на 60-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – остеони пластинчастої тканини. Збарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x100

На 60-ту добу експерименту експресія катепсину К відмічалась у $22,67 \pm 1,63$ % імуноактивних клітин кісткового регенерату, що на 9,93 % менше ($p = 0,02$), ніж у попередній термін експерименту та на 26,84 % менше ($p < 0,005$), ніж на 15-ту добу після перелому. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як низьку (+). Це свідчить про зниження активності процесів резорбції в новоутвореному регенераті. Проте 60-та доба експерименту характеризувалася високою інтенсивністю забарвлення цитоплазми імуноактивних остеобластів, що експресували остеопонтин та були рівномірно розподілені в кістковому регенераті. Активність експресії остеопонтину становила $26,67 \pm 1,21$ % імуноактивних клітин, що на 11,12 % ($p = 0,006$) більше за попередній термін експерименту й на 46,78 % ($p < 0,005$) вище, ніж на початку експерименту. Зазначені зміни є підтвердженням активних проліферативних процесів у кістковій мозолі та подальшої інтенсивної її мінералізації.

На сканограмах на 60-ту добу експерименту кістковий дефект представлений пластинчастою кістковою тканиною, яка щільно з'єднана з материнською кісткою. Рівні Са та Р у новоутвореному регенераті становили $12,37 \pm 0,21\%$ та $6,15 \pm 0,19$ %, що на 10,45 % ($p < 0,005$) та на 16,04 % ($p < 0,005$) більше за попередній термін експерименту і на 37,59 % ($p < 0,005$) й 43,02 % ($p < 0,005$) більше, ніж на 15-ту добу дослідження. Це свідчило про інтенсивну мінералізацію в кістковій мозолі та активні процеси репаративної регенерації.

Встановлене зростання рівня Са в материнській кістці на 3,73 % ($p < 0,005$) та на межі її з регенератом на 2,89 % ($p < 0,005$), а також меншою мірою Р – відповідно на 1,59 % ($p = 0,09$) та 1,99 % ($p = 0,14$), що свідчить про виражену ремоделюючу активність у ділянках материнської кістки, прилеглих до дефекту (рис. 3.12, 3.13).

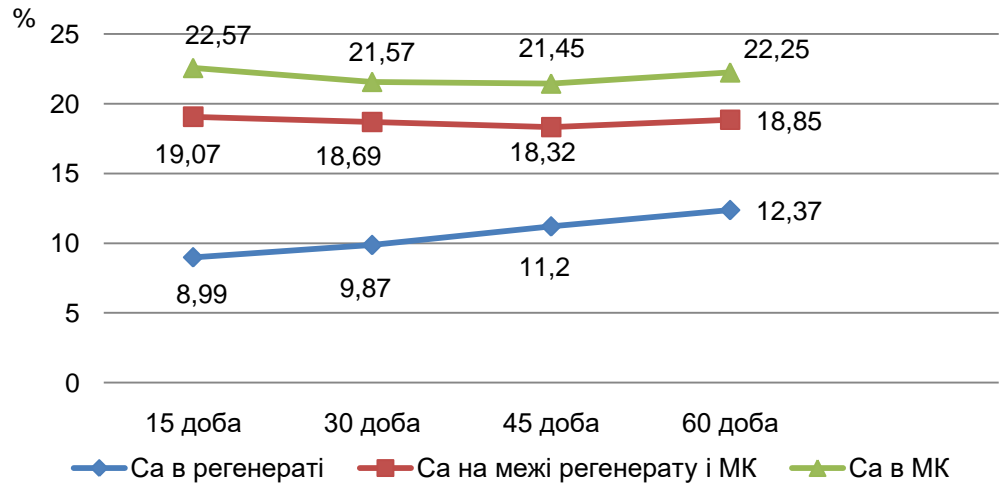


Рисунок 3.12 – Динаміка змін рівня кальцію в травмованій стегновій кістці тварин контрольної групи упродовж експерименту. МК – материнська кістка

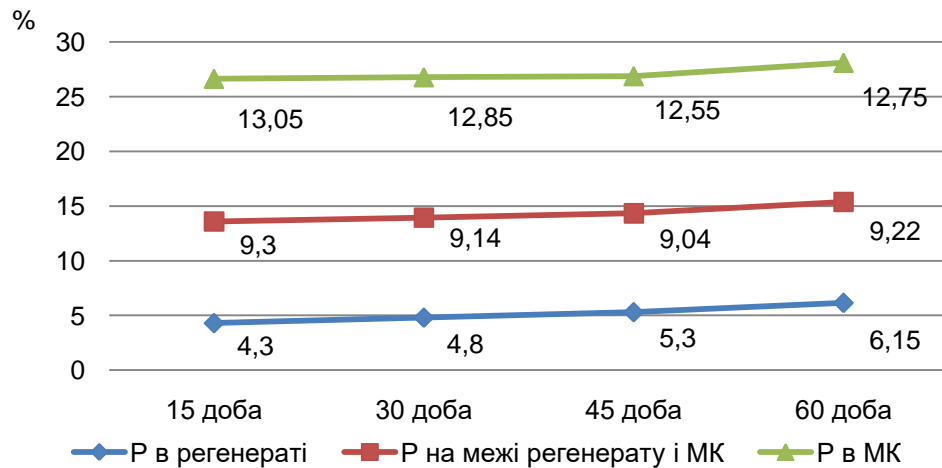


Рисунок 3.13 – Динаміка змін рівня фосфору в травмованій стегновій кістці тварин контрольної групи впродовж експерименту. МК – материнська кістка

Таким чином, у тварин контрольної групи впродовж усього експерименту, починаючи з 15-ї доби, відмічалось активне зростання рівня кальцію та фосфору в ділянці новоутвореного кісткового дефекту та незначне зниження зазначених мікроелементів на межі регенерату і материнської кістки, а також безпосередньо в самій материнській кістці як результат компенсаторної

реакції у відповідь на травму. Зазначені зміни свідчили про інтенсивні процеси мінералізації в новоутвореному кістковому регенераті та активні процеси ремоделювання в самій материнській кістці.

За результатами КТ-дослідження на 60-ту добу в ділянці перелому візуалізувалася добре виражена кісткова мозоль із періостальними та ендостальними нашаруваннями. Відмічалось зростання ОЩ травмованих стегнових кісток порівняно з 45-ю добою: в регенераті – на 47,05 % ($p < 0,005$), дистальному відділі МК – на 27,86 % ($p < 0,005$) та проксимальному відділі МК – на 14,76 % ($p < 0,005$). Оскільки ОЩ регенерату ($2150,00 \pm 31,81$ HU) відрізнялася від ОЩ проксимальної ($3071,00 \pm 24,16$ HU) та дистальної ділянок МК ($2983,00 \pm 27,20$ HU), це свідчило про незавершені процеси ремоделювання й мінералізації в ділянці травми під час візуального відновлення цілісності стегнової кістки (рис. 3.14).

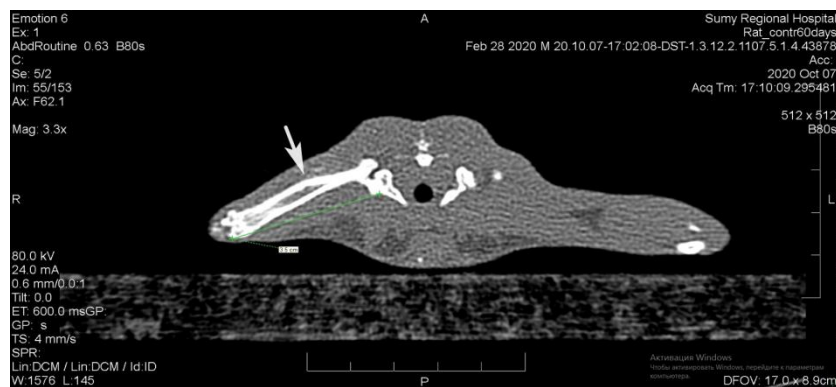


Рисунок 3.14 – Комп'ютерна томограма лівої стегнової кістки щура контрольної групи на 60-ту добу після травми. 1 – кісткова мозоль

Отже, у тварин контрольної групи терміни репаративної регенерації кісток не порушені, збережена стадійність формування кісткової мозолі, відмічаються задовільні рентгеноморфологічні показники (розміри, товщина кісткової мозолі).

Біомеханічні властивості у тварин контрольної групи змінювалися наступним чином: починаючи з 15-ї доби експерименту відмічалось поступове зростання на 30-ту, 45-ту і 60-ту добу показника межі міцності. Так, на 60-ту

добу він становив $120,24 \pm 3,25$ МПа, що на 25,85 % ($p < 0,0001$) більше, ніж на 15-ту добу експерименту. Поряд із цим, упродовж усього експерименту поступово зростала мікротвердість у тварин контрольної групи, що свідчило про активні процеси мінералізації в кістці та покращання її пружних властивостей. Так, на 60-ту добу експерименту вона становила $532,33 \pm 18,18$ МПа, що на 9,57 % ($p = 0,018$) більше порівняно з 15-ю добою експерименту.

Таким чином, на 60-ту добу експерименту встановлено збільшення площі пластинчастої кісткової тканини в регенераті, зростання активності остеопонтину, показників межі міцності на стиск та мікротвердості, відновлення анатомічної цілісності кістки (візуально) в ділянці травми. Проте поряд з активними процесами ремоделювання кісткової тканини в регенераті не встановлено завершення процесів репаративної регенерації. Про це свідчили наявність ділянок сполучної тканини в регенераті, відмінність показників рівнів Са та Р у різних ділянках травмованої стегнової кістки, а також показників ОЩ регенерату з прилеглими ділянками материнської кістки.

3.2 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діяфіза стегнових кісток щурів в умовах впливу доксорубіцину

3.2.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин, більшу частину кісткового регенерату становила сполучна тканина площею $64,83 \pm 4,71$ %, що на 15,41 % ($p = 0,006$) більше, ніж у тварин контрольної групи. Поряд із цим, ретикулофіброзна кісткова тканина займала $35,17 \pm 4,02$ % площі регенерату, що на 19,75 % ($p = 0,01$) менше, ніж у контрольній групі. Новоутворена кісткова тканина була представлена великопетлястими кістковими трабекулами та містила первинні остеобласти, остецити й

остеогенні клітини. У міжтрабекулярних просторах розміщувалася сполучна тканина з ділянками остеогенезу (рис. 3.15).

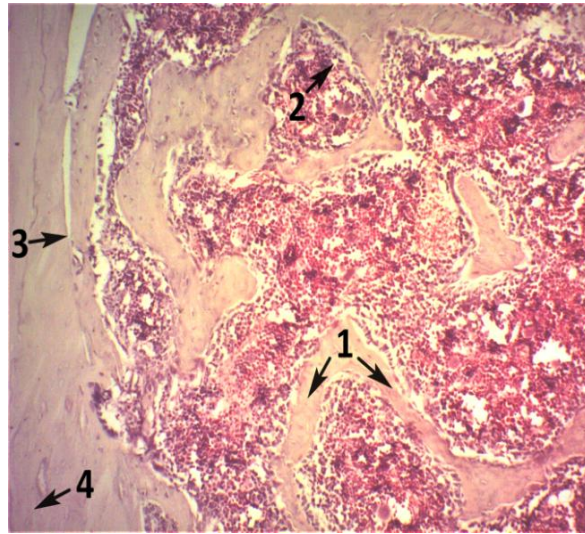


Рисунок 3.15 – Ділянка дефекту стегнової кістки щура I експериментальної групи на 15-ту добу після перелому. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – межа материнської кістки та регенерату, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

За допомогою дослідження імуногістохімічних показників кісткового метаболізму встановлено активність експресії катепсину К у регенераті в межах $33,17 \pm 1,94$ % імуноактивних клітин. Це на 6,54 % ($p = 0,04$) вище показників контрольної групи. Отримані дані говорять про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату в умовах дії доксорубіцину. Інтенсивність забарвлення цитоплазми оцінюється як висока (+++). Проте експресія остеопонтину на 15-ту добу експерименту в ділянці регенерату була слабовираженою і становила $14,17 \pm 1,17$ %, що на 22,01 % ($p = 0,0003$) менше за відповідні показники контрольної групи (рис. 3.16). Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин була низькою.

За допомогою аналізу сканограм на 15-ту добу експерименту встановлено наявність у регенераті незрілих ретикулофіброзних кісткових

балок, навколо яких були розміщені фібробласти й остеобласти. Наявні скупчення клітинних конгломератів, між якими розміщені тонкі волокна (рис. 3.17).

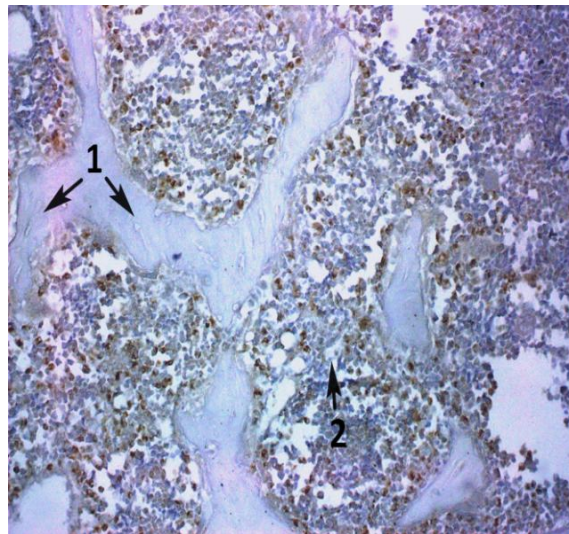


Рисунок 3.16 – Експресія остеопонтину в кістковому дефекті на 15-ту добу експерименту у тварин І експериментальної групи. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x200

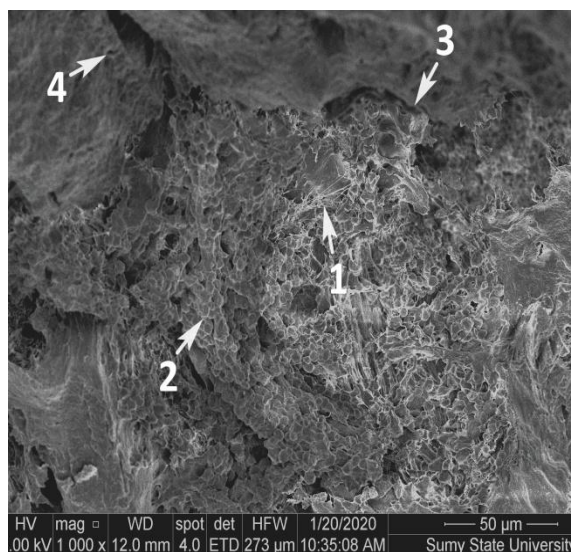


Рисунок 3.17 – Ділянка дефекту на 15-ту добу після травми у тварин І експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин. 1 – колагенові волокна, 2 – фібробласти, 3 – межа регенерату і материнської кістки, 4 – материнська кістка. Зб. x 1000

Рівні Са й Р у ділянці регенерату, за результатами зондового мікроаналізу, визначалися в межах $4,3 \pm 0,13$ % та $2,8 \pm 0,22$ % відповідно,

що на 52,17 % ($p < 0,005$) та 34,88 % ($p < 0,005$) нижче від показників контрольної групи. На поверхні материнської кістки також відмічалось зниження вмісту Ca та P порівняно з контролем у I експериментальній групі на 14,79 % ($p < 0,005$) та 24,52 % ($p < 0,005$) відповідно.

За результатами КТ на 15-ту добу після травми в ділянці дефекту визначалася слабовиражена кісткова мозоль. ОЩ регенерату становила $444,30 \pm 31,94$ НУ, у дистальній частині МК – $1553,50 \pm 14,84$ НУ та $2287,00 \pm 30,25$ НУ у проксимальній частині. Таким чином, порівняно з контрольною групою відмічається сповільнення утворення кісткової мозолі в ділянці дефекту та процесів мінералізації як у регенераті, так і в материнській кістці.

Біомеханічні показники на 15-ту добу з моменту травми мали наступні значення: межа міцності на стиск в ділянці дефекту стегнової кістки становила $82,48 \pm 6,71$ МПа, що на 15,82 % ($p = 0,0009$) нижче за показники контрольної групи. Показник мікротвердості визначався в межах $413,33 \pm 50,14$ МПа, що на 17,34 % ($p = 0,016$) менше за дані контрольної групи.

3.2.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження у тварин I експериментальної групи на 30-ту добу експерименту основну частину новоутвореного регенерату становила сполучна тканина ($68,67 \pm 4,46$ %), що на 41,95 % ($p < 0,0001$) більше, ніж у тварин контрольної групи. Водночас кісткова тканина займала $31,33 \pm 2,1$ % площі регенерату, що на 40,12 % ($p < 0,001$) менше, ніж у контрольній групі ($52,33 \pm 4,11$ %). Вона була представлена переважно ретикулофіброзним типом площею $19,5 \pm 3,99$ % у вигляді поодиноких, не пов'язаних між собою трабекул. Міжтрабекулярні простори мали вигляд широких каналів, заповнених червоним кістковим мозком із вираженою васкуляризацією. Переважно на

периферії регенерату, навколо кровоносних судин, спостерігалось утворення концентрично розміщених кісткових пластин, що інтенсивно забарвлювались. Утворення пластинчастої тканини в ділянці регенерату також було сповільненим, про що свідчить показник її площі в межах $11,83 \pm 3,71 \%$, що на $49,65 \%$ ($p = 0,003$) менше за показники контрольної групи. На поверхні трабекул були розміщені остеобласти (рис. 3.18).

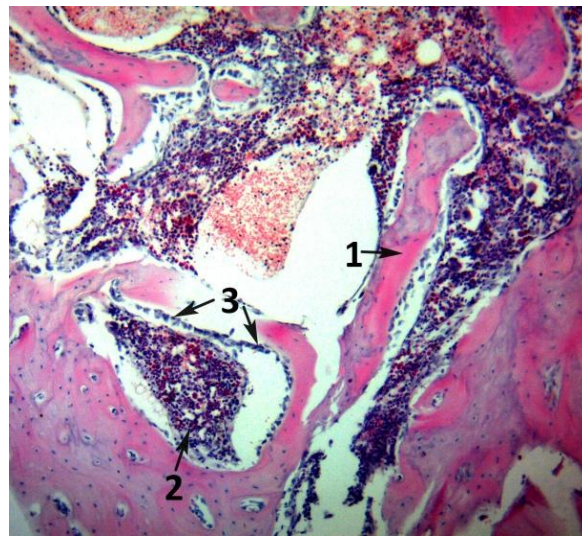


Рисунок 3.18 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин, на 30-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – остеобласти. Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x200

За допомогою імуногістохімічного дослідження встановлено, що експресія катепсину К у тварин I групи становила $31,17 \pm 1,47 \%$ імуноактивних клітин, що на $6,03 \%$ ($p = 0,12$) нижче за попередній термін експерименту, проте на $9,37 \%$ ($p = 0,02$) вище від показників контрольної групи на 30-ту добу. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалася високою (+++). Активність експресії остеопонтину в ділянці регенерату визначалася на рівні $17,33 \pm 1,21 \%$, що на $16,80 \%$ ($p < 0,05$) нижче від показників контрольної групи. Лише окремі кісткові клітини, розміщені переважно на периферії регенерату, виявляли

імунореактивність. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми була низькою.

Аналіз сканограм на 30-ту добу експерименту встановив, що більша частина регенерату представлена витонченими, хаотично розташованими балками грубоволокнистої кісткової тканини з незначними ділянками пластинчастої кісткової тканини. Між материнською кісткою і регенератом зберігався добре виражений вільний простір (рис. 3.19).

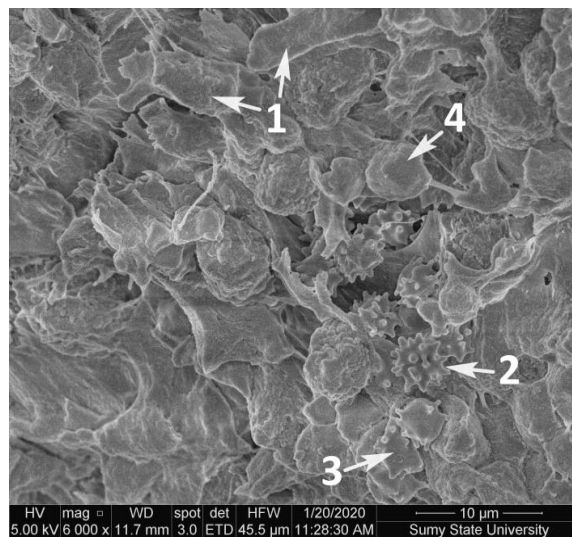


Рисунок 3.19 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин, на 30-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – мастоцити, 3 – моноцити, 4 – еритроцити. Зб. х 6 000

Зондовий мікроаналіз новоутвореного регенерату встановив поступове зростання рівнів Са й Р в межах $4,55 \pm 0,10$ % та $2,98 \pm 0,21$ %, проте одержані показники були нижчими на 53,90 % ($p < 0,05$) та 37,91 % ($p < 0,05$) відповідно за дані контрольної групи. Зберігається тенденція до подальшого зниження рівня Са в материнській кістці порівняно з попереднім терміном експерименту на 3,06 % ($p < 0,05$), а також Р – на 4,26 % ($p < 0,05$).

Під час проведення КТ-обстеження на знімках візуалізувався округлої форми дефект стегнової кістки без ознак консолидації. ОЩ регенерату порівняно з попереднім терміном експерименту збільшилася на 60,02 % ($p < 0,0001$), дистальної частини МК - на 18,73 % ($p < 0,0001$) та проксимальної – на 5,77 % ($p < 0,0001$), проте одержані дані є нижчими за аналогічні показники контрольної групи на 22,91 % ($p < 0,0001$), 12,81 % ($p < 0,0001$) та 6,92 % ($p < 0,0001$) відповідно.

Аналіз біомеханічних показників у дефекті на 30-ту добу після дворазового введення доксорубіцину встановив показники межі міцності на стиск на рівні $84,47 \pm 4,47$ МПа та мікротвердості – в межах $415,83 \pm 18,00$ МПа. Отримані дані свідчать про поступове їх зростання порівняно з попереднім терміном експерименту і те, що вони є меншими на 17,36 % ($p < 0,0001$) та 17,82 % ($p < 0,0001$) за відповідні показники контрольної групи.

3.2.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження у тварин І експериментальної групи переважна більшість регенерату була представлена сполучною тканиною з кістковим мозком, площа якої становила в середньому $52,40 \pm 4,23$ %. По краях дефекту знаходилася кісткова тканина площею $47,50 \pm 3,63$ %, основна частка якої була представлена ретикулофіброзним типом ($26,33 \pm 3,61$ %). Проте порівняно з попереднім терміном експерименту спостерігалось зменшення простору між регенератом та материнською кісткою (рис. 3.20).

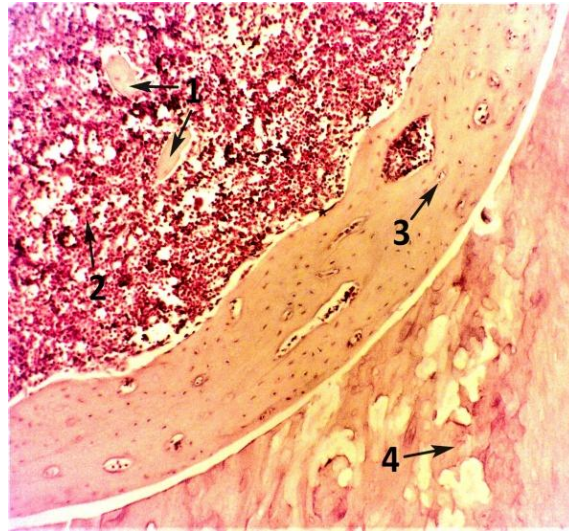


Рисунок 3.20 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин I експериментальної групи на 45-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x100

На 45-ту добу спостереження простежувалася тенденція до зниження експресії маркера резорбції кісткової тканини. Так, активність катепсину К у регенераті становила $29,50 \pm 1,87$ % імуноактивних клітин, що на 14,67 % ($p = 0,38$) нижче порівняно з 30-ю добою експерименту, проте на 17,20 % ($p = 0,0012$) вище за показники контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів визначали як помірну (++).

Водночас відмічалася незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який виявлявся у $19,17 \pm 1,47$ % клітин, що на 14,81 % ($p = 0,003$) більше, ніж на 30-ту добу після травми, однак на 20,13 % ($p = 0,0001$) менше за показники контрольної групи. Імунопозитивні клітини були зосереджені переважно по краях кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми позитивно забарвлених клітин залишалася низькою. Це свідчить про сповільнене формування кісткової тканини в регенераті.

Аналіз сканограм на 45-ту добу експерименту після триразового введення відповідних протипухлинних хіміопрепаратів (після нанесення травми, на 21-шу та 42-гу добу експерименту) встановив, що більша частина

новоутвореного регенерату представлена хаотично розташованими кістковими балками. Відмічається сповільнене формування пластинчастої кісткової тканини в регенераті, розміщеної переважно на периферії дефекту (рис. 3. 21).



Рисунок 3.21 – Міжтрабекулярний простір ділянки кісткового дефекту на 45-ту добу після травми у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин. 1 – остеоцитарні лакуни, 2 – лімфоцит, 3 – еритроцит, 4 – колагенові волокна. Зб. x19 000

Результати зондового мікроаналізу свідчать про позитивну динаміку зростання в регенераті рівня макроелементів у межах $5,15 \pm 0,17$ % для Ca та $3,65 \pm 0,17$ % для P, проте це на 54,02 % ($p < 0,05$) та 31,13 % ($p < 0,05$) нижче від аналогічних показників контрольної групи. Незначне зниження цих мінеральних речовин відмічалось в прилеглих до кісткового дефекту ділянках та материнській кістці як порівняно з попереднім терміном, так і з контролем. Одержані дані свідчать про низьку інтенсивність мінералізації новоутвореного органічного матриксу та сповільнення ремодельюючої активності материнської кістки у відповідь на травму за дії доксорубіцину.

За результатами КТ-дослідження на 45-ту добу в ділянці перелому відмічалася слабовиражена кісткова мозоль за рахунок ендостальних нашарувань. Спостерігалось прогресуюче збільшення показників ОЩ

порівняно з 30-ю добою: в ділянці регенерату – на 54,43 % ($p < 0,0001$), у дистальному відділі МК – на 17,29 % ($p < 0,001$). ОЩ проксимального відділу МК залишалася без змін. Однак ці показники були нижчими, ніж у контрольній групі: на 24,89 % ($p < 0,0001$) у регенераті, на 7,85 % ($p < 0,0001$) в проксимальній та на 7,24 % ($p < 0,0001$) в дистальній частині МК.

Під час дослідження біомеханічних параметрів відмічалася тенденція до зростання межі міцності на стиск та мікротвердості в регенераті впродовж загоєння дефекту на 2,21 % ($p = 0,47$) та 0,40 % ($p = 0,85$) порівняно з попереднім терміном, проте отримані дані є нижчими на 22,13 % ($p < 0,0001$) та 19,48 % ($p < 0,0001$) за відповідні показники контрольної групи.

3.2.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту

За допомогою гістологічного дослідження дефекту стегнової кістки на 60-ту добу експерименту встановлено, що більшу частину регенерату заповнювала кісткова тканини площею $71,50 \pm 4,52$ %, яка на $41,00 \pm 3,46$ % складалася з пластинчастої та на $30,5\% \pm 5,58$ % – ретикулофіброзної тканини. Порівняно з контролем у регенераті спостерігалася затримка формування кісткової тканини на 22,70 % ($p < 0,0001$) та збільшення площі сполучної тканини у 2,8 рази. Пластинчаста кісткова тканина була розташована переважно на периферії дефекту, її площа на 49,58 % ($p < 0,0001$) була нижчою за показники контрольної групи, проте спостерігалася збільшення у 2,73 рази площі ретикулофіброзної кісткової тканини, що займала центральні відділи дефекту. Між регенератом та материнською кісткою відмічалася місцями формування з'єднань (рис. 3.22). Отримані показники свідчать про затримку формування кісткової мозолі за дії доксорубіцину.

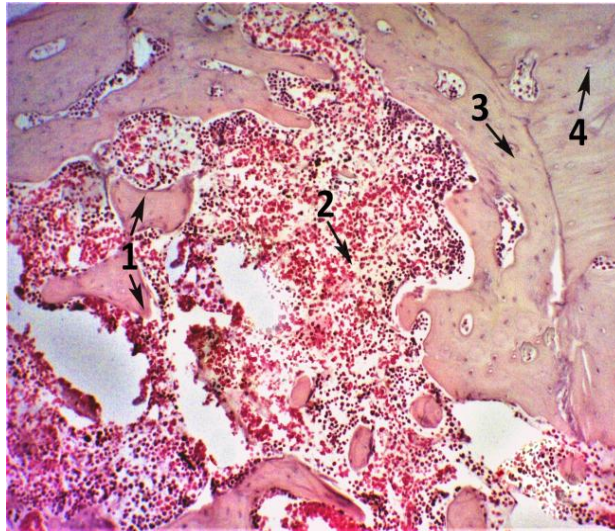


Рисунок 3.22 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки тварин I експериментальної групи на 60-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

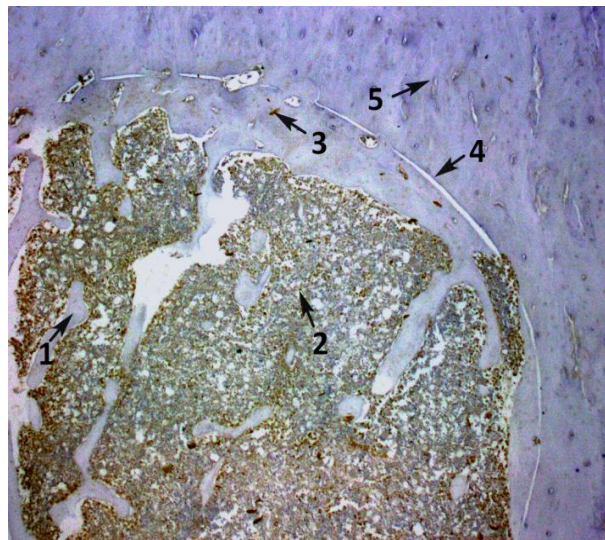


Рисунок 3.23 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового дефекту на 60-ту добу експерименту у тварин I експериментальної групи. 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – межа регенерату й материнської кістки, 5 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x100

За результатами ІГХ-дослідження на 60-ту добу експерименту експресію катепсину К виявляли у $28,50 \pm 1,87$ % клітин. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++), як і в попередньому терміні експерименті. Відмічалось зменшення активності досліджуваного маркера порівняно з 45-ю добою експерименту, проте він був на 25,72 % ($p = 0,0002$) вищим за показники контрольної групи.

60-та доба експерименту характеризувалася незначним зростанням рівня експресії остеопонтину в межах $21,17 \pm 1,47$ %, однак це на 25,84 % ($p < 0,0001$) нижче від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин була помірною (рис. 3.23).

Растрова електронна мікроскопія зразків кісток щурів на 60-ту добу експерименту підтверджує результати гістологічного дослідження і встановила сповільнене формування пластинчастої тканини в ділянці дефекту, наявність ділянок витончених новоутворених кісткових балок, розриви між ними, зростання площі міжбалкових просторів та відсутність тісних контактів між регенератом і материнською кісткою (рис. 3.24). Це свідчить про затримку утворення кісткової мозолі в ділянці дефекту за дії хіміопрепаратів.

Вміст мінеральних речовин на 60-ту добу дослідження в регенераті почав поступово зростати, але був значно меншим, ніж у контролі. Так, у ділянці дефекту відмічалось зниження рівнів Са та Р у І групі на 45,68 % ($p < 0,005$) і 21,46 % ($p < 0,005$) порівняно з контролем. У материнській кістці та ділянках, прилеглих до регенерату, на відміну від попередніх термінів установлене поступове зростання рівня цих макроелементів у межах 1–2 %, але їх рівень був нижчим, ніж у контролі. Зокрема, показники Са та Р в материнській кістці були нижчими за дії доксорубіцину на 15,60 % ($p < 0,005$) та 18,58 % ($p < 0,005$), ніж показники контролю (рис. 3.25).

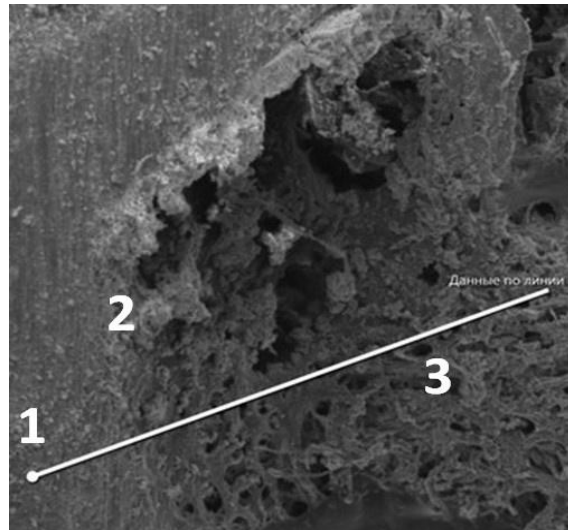


Рисунок 3.24 – Ділянка дефекту стегнової кістки на 60-ту добу після травми у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату і материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. х300

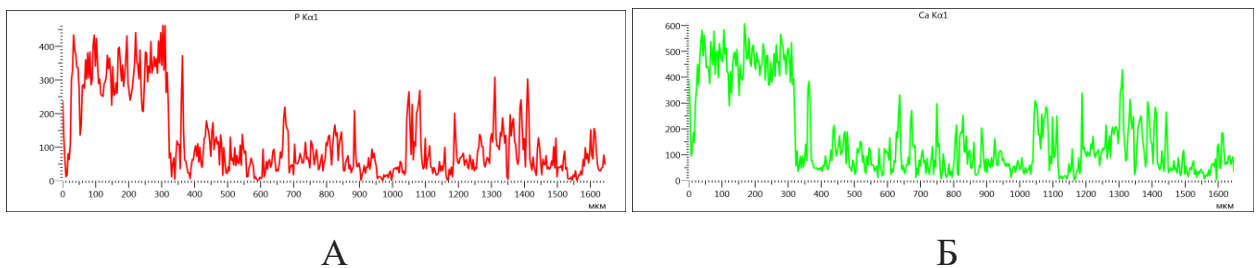


Рисунок 3.25 - Розподіл рівня фосфору та кальцію на поверхні травмованої стегнової кістки (материнська кістка, межа її з регенератом, регенерат) при застосуванні доксорубіцину на 60-ту добу експерименту: А – фосфор, Б – кальцій.

На КТ-знімках на 60-ту добу в ділянці травми візуалізувалася кісткова мозоль, що була представлена помірно вираженими періостальними й ендостальними нашаруваннями. Відмічалася збільшення ОЩ регенерату на 23,22 % ($p < 0,0001$) порівняно з попереднім терміном експерименту. ОЩ дистального відділу МК становила $2424,00 \pm 27,67$ НУ, проксимального – $2764,00 \pm 29,22$ НУ. Проте порівняно з контролем ці показники були нижчими за аналогічні показники контрольної групи: в регенераті на 37,07 %

($p < 0,0001$), у проксимальному відділі МК – на 10,01 % ($p < 0,0001$), у дистальному відділі МК – на 18,74 % ($p < 0,0001$) (рис. 3.26).

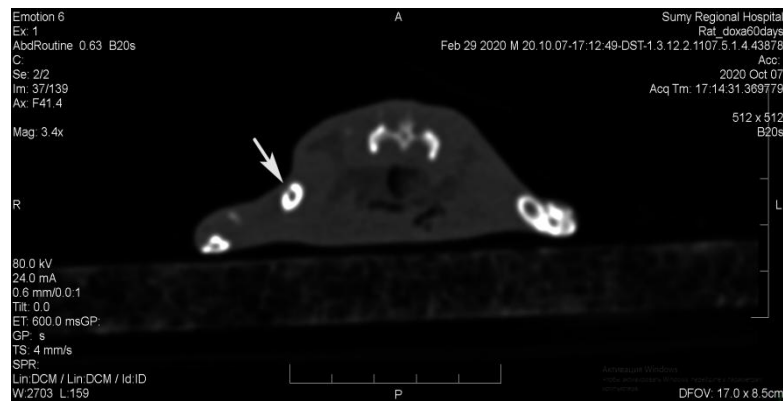


Рисунок 3.26 – Комп’ютерна томограма лівої стегнової кістки щура на 60-ту добу експерименту в разі введення доксорубіцину. Дефект кортикального шару лівої стегнової кістки.

На 60-ту добу експерименту прослідковується тенденція до поступового зростання біомеханічних показників, зокрема межі міцності на стиск на рівні $87,17 \pm 4,89$ МПа та мікротвердості в межах $418,67 \pm 12,44$ МПа. Але ці показники були меншими за відповідні показники контролю на 27,50 % ($p < 0,0001$) та 21,35 % ($p < 0,0001$).

3.3 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діяфіза стегнових кісток щурів за умов впливу 5-фторурацилу

3.3.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження зразків травмованих стегнових кісток за дії 5-фторурацилу на 15-ту добу з моменту травми кістковий регенерат складався з ретикулофіброзної кісткової тканини площею $40,67 \pm 3,93$ % та сполучної тканини площею $59,33 \pm 6,50$ % дефекту. Відмінності щодо величин цих показників у тварин контрольної групи і тварин, яким вводили 5-фторурацил, були недостовірними, однак їх імовірно

спрямування, а саме: менша на 7,21 % ($p = 0,29$) площа ретикулофіброзної тканини та більша на 5,62 % ($p = 0,33$) площа сполучної тканини, було подібним до такого у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин (рис. 3.27).

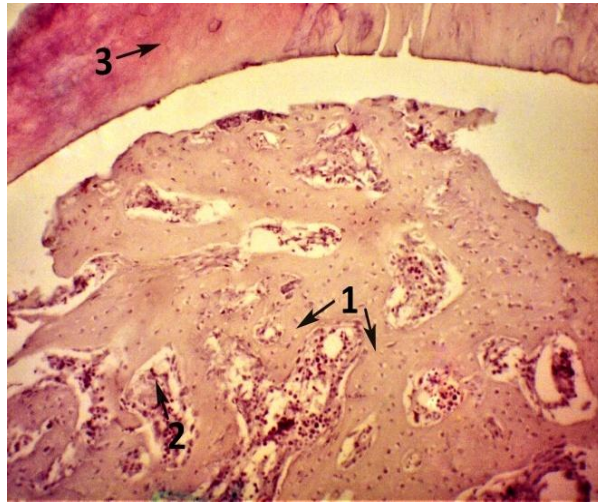


Рисунок 3.27 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи (5-фторурацил) на 15-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

За результатами ІГХ-дослідження на 15-ту добу експерименту експресія маркера резорбції кісткової тканини катепсину К в ділянці регенерату була виражена у $32,67 \pm 1,63$ % імуноактивних клітин, що на 5,11 % ($p = 0,04$) вище від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин оцінювали як високу (+++). Одержані дані свідчать про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату за дії 5-фторурацилу. Проте активність маркера кісткоутворення остеопонтину була слабовираженою й становила $15,83 \pm 1,17$ %, що на 12,87 % ($p = 0,012$) нижче, ніж у контрольній групі. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин була низькою. Це свідчить про затримку диференціації клітинних елементів кісткового регенерату.

Аналіз сканограм зразків травмованих стегнових кісток на 15-ту добу свідчить про формування в регенераті хаотично розміщених кісткових балок, наявні скупчення клітин округлої форми з численними відростками та порожні остеоцитарні лакуни (рис. 3.28).

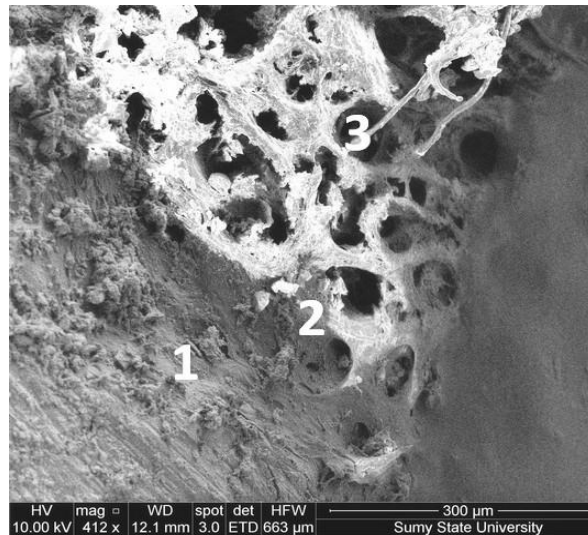


Рисунок 3.28 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин на 15-у добу після травми у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату і материнської кістки, 3 – ретикулофіброзна кісткова тканина регенерату. Зб. х412

Зондовий мікроаналіз поверхні травмованих стегнових кісток установив, що на 15-ту добу експерименту в ділянці регенерату рівні Ca та P визначалися в межах $7,44 \pm 0,12$ % та $2,8 \pm 0,22$ % відповідно, що є менше за показники контролю на 17,24 % ($p < 0,0001$) та 34,88 % ($p < 0,0001$). На поверхні материнської кістки на 15-ту добу експерименту також відмічалось зниження вмісту Ca та P порівняно з контролем на 18,52 % ($p < 0,05$) та 22,60 % ($p < 0,05$).

За результатами КТ-дослідження на 15-ту добу експерименту в ділянці травми визначали дефект округлої форми, що мав чіткі межі з прилеглою до неї материнською кісткою. ОЩ в ділянці регенерату становила $503,50 \pm 17,75$ HU, у дистальній частині МК – $1379,00 \pm 21,18$ HU, у проксимальній – $2030,00 \pm 33,22$ HU, що на 31,28 % ($p < 0,0001$), 25,42 % ($p < 0,0001$) та

17,58 % ($p < 0,0001$) відповідно менше за аналогічні показники контрольної групи.

Під час дослідження біомеханічних параметрів травмованих стегнових кісток було встановлено, що за дії 5-фторурацилу на 15-ту добу експерименту межа міцності на стиск визначалася на рівні $81,96 \pm 3,40$ МПа, мікротвердість – $428,67 \pm 34,79$ МПа. Це на 14,20 % ($p < 0,0001$) та 11,77 % ($p = 0,02$) відповідно нижче за показники контрольної групи.

3.3.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту

За допомогою гістологічного дослідження у тварин II експериментальної групи встановлено, що регенерат травмованих стегнових кісток складався на 62,50 % зі сполучної тканини й на 37,50 % – з кісткової тканини. Площа сполучної тканини була більшою на 31,10 % ($p = 0,0002$), ніж у регенераті тварин контрольної групи, тоді як площа новоутвореної кісткової тканини була відповідно меншою на 39,55 % ($p = 0,007$). Кісткова тканина була представлена переважно ретикулофіброзним типом ($20,17 \pm 3,19$ %) і за показником площі достовірно не відрізнялася від такої у тварин контрольної групи. Пластинчаста кісткова тканина займала $17,33 \pm 2,50$ % та була розміщена переважно по краям дефекту. Кортикальний шар між материнською кісткою й регенератом на 30-ту добу експерименту ще не був сформований і мав ознаки перебудови. Між регенератом та краєм материнської кістки зберігався вільний простір (рис. 3.29).

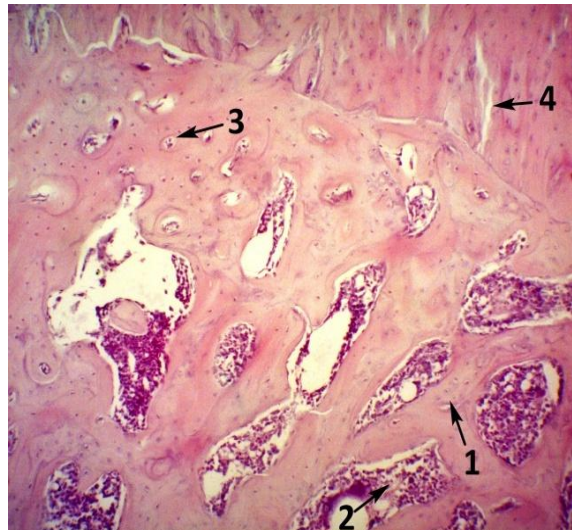


Рисунок 3.29 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи на 30-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканини, 4 – мікротріщини в материнській кістці. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

На 30-ту добу дослідження експресія катепсину К в ділянці регенерату становила $30,67 \pm 1,37$ %, що на 6,12 % ($p = 0,12$) менше, ніж у попередній термін експерименту. Однак рівень експресії катепсину К порівняно з контролем був вищим на 7,61 % ($p = 0,04$). Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалася високою (+++) (рис. 3.30). Активність експресії остеопонтину була слабовираженою, лише окремі кісткові клітини, розміщені переважно на периферії регенерату, виявляли імунореактивність. Рівень експресії маркера кісткоутворення визначався в межах $18,50 \pm 1,05$ %, що на 11,19 % ($p < 0,005$) нижче, ніж у тварин контрольної групи. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми була низькою (рис. 3.31).

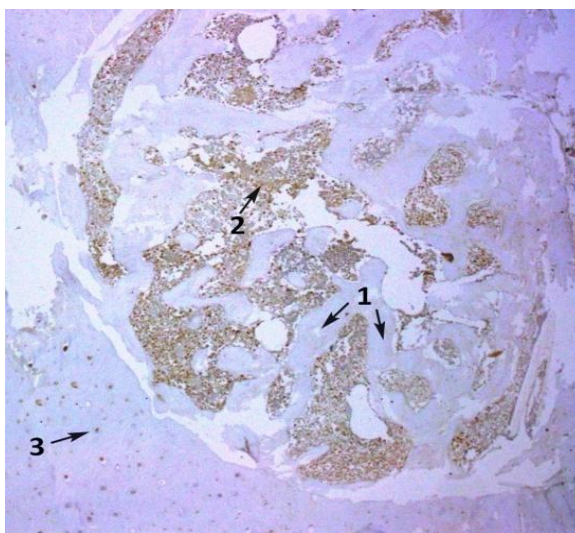


Рисунок 3.30 – Експресія катепсину К у ділянці кісткового дефекту на 30-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – ретикулофіброзна кіткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. х50

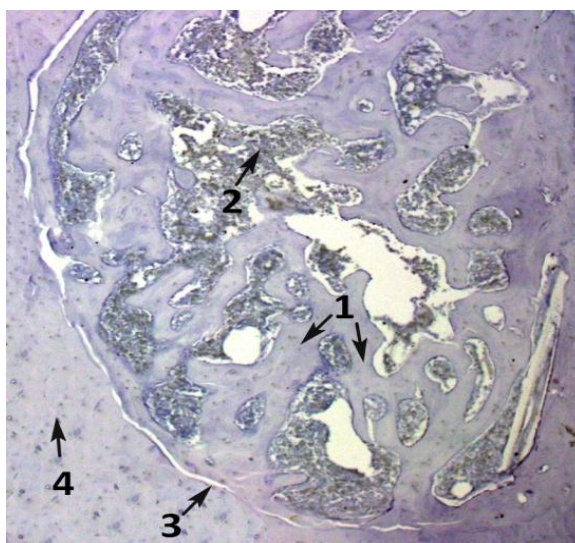


Рисунок 3.31 – Експресія остеопонтину у ділянці кісткового дефекту на 30-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – ретикулофіброзна кіткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. х50

На 30-ту добу експерименту після дворазового введення відповідних протипухлинних хіміопрепаратів з інтервалом 21-а доба більша частина регенерату представлена витонченими, хаотично розміщеними балками грубоволокнистої кісткової тканини з незначними ділянками пластинчастої тканини. Зберігався вільний простір між материнською кісткою і регенератом (рис. 3.32).

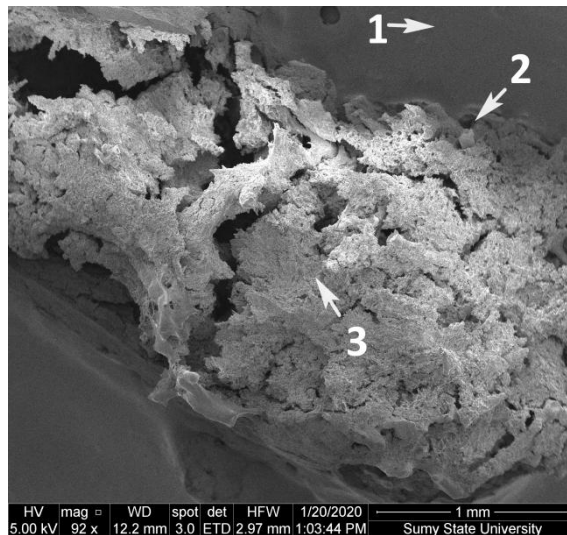


Рисунок 3.32 – Аналіз сканограм на 30-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату й материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. x 92

За допомогою зондового мікроаналізу регенерату встановлене поступове зростання рівнів Ca й P, але вони були нижчими на 21,78 % ($p < 0,0001$) та 10,62 % ($p < 0,05$) відповідно за дані контрольної групи. Зберігалася тенденція до подальшого зниження рівня Ca в материнській кістці порівняно з попереднім терміном експерименту на 3,86 % ($p < 0,001$), а також P на 5,05 % ($p = 0,001$).

За результатами КТ-обстеження на знімках візуалізувався дефект стегнової кістки без ознак консолідації. Кісткова мозоль була слабовираженою за рахунок ендостальних нашарувань. Відмічалось збільшення ОЩ регенерату порівняно з 15-ю добою на 67,13 % ($p < 0,0001$), ОЩ дистального відділу МК – на 22,48 % ($p < 0,05$), проксимального – на

20,64 % ($p < 0,05$), проте зазначені показники були нижчими, ніж у контрольній групі на 8,76 % ($p < 0,0001$), 20,18 % ($p < 0,0001$) та 5,77 % ($p < 0,0001$) відповідно.

Межа міцності на стиск в ділянці діяфізу стегнових кісток на 30-ту добу становила $87,18 \pm 3,70$ МПа, показник мікротвердості регенерату – $453,50 \pm 18,11$ МПа, що є вищим на 3,06 % ($p = 0,029$) та на 5,79 % ($p = 0,15$), ніж у попередній термін експерименту, проте одержані дані є нижчими за показники контролю на 17,24 % ($p < 0,0001$) і на 11,58 % ($p < 0,05$).

3.3.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження в регенераті переважала новоутворена кісткова тканина, площа якої становила $61,50 \pm 4,56$ %. Вона була представлена переважно пластинчастим типом ($41,83 \pm 5,04$ %) з остеонами різного ступеня зрілості та ретикулофіброзною тканиною площею $19,67 \pm 4,08$ %. Сполучна тканина займала в середньому $38,50 \pm 5,47$ % регенерату. Даний показник достовірно не відрізнявся від такого у тварин контрольної групи, але ймовірна тенденція до затримки процесу утворення кісткової тканини була помітною, оскільки сполучна тканина займала на 16,66 % ($p = 0,08$) більшу площу, ніж у тварин контрольної групи. Місцями відмічалось формування з'єднань регенерату з материнською кісткою, але воно було менш виражене, ніж у тварин контрольної групи (рис. 3.33).

Маркер катепсину К виявлявся у $28,50 \pm 1,05$ % клітин. Кількість імунопозитивних клітин у регенераті знизилася на 11,68 % ($p = 0,04$) порівняно з 30-ю добою, але вона є вищою, ніж у контролі на 13,23 % ($p = 0,0011$). Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів була помірною (++) . Активність експресії остеопонтину виявлялась у $20,67 \pm 1,21$ % клітин регенерату, що на 13,74 % ($p = 0,002$) вище, ніж на 30-ту добу експерименту, проте на 13,87 % ($p = 0,0001$) нижче показників контрольної групи. Імунопозитивні клітини були зосереджені переважно по

краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми позитивно забарвлених клітин залишалася низькою (рис. 3.34).

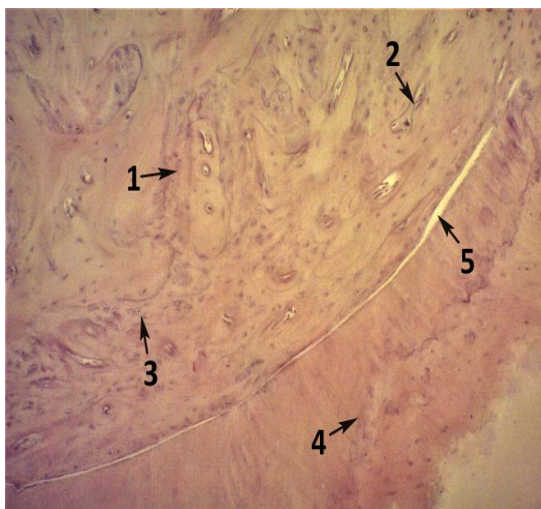


Рисунок 3.33 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи на 45-ту добу після травми. 1 – кісткові трабекули, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканини, 4 – материнська кістка, 5 – межа між регенератом й материнською кісткою. Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x100

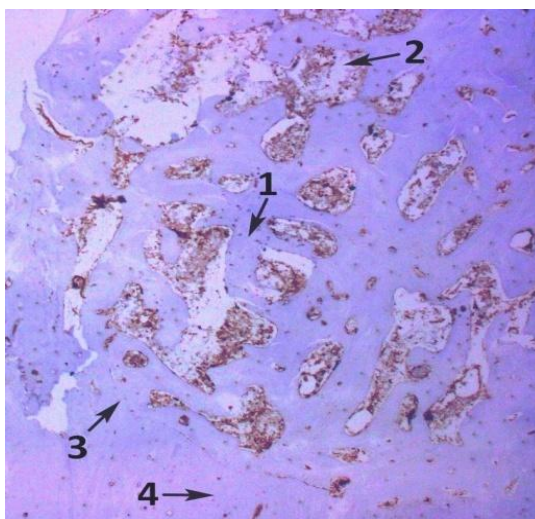


Рисунок 3.34 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового дефекту на 45-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – ретикулофіброзна кіткова тканини, 2 – сполучна тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x50

На сканограмах на 45-ту добу експерименту після триразового введення відповідних протипухлинних хіміопрепаратів (після нанесення травми, на 21-шу та 42-гу добу експерименту) спостерігалась затримка формування пластинчастої кісткової тканини в регенераті та низька інтенсивність мінералізації органічного матриксу (рис. 3.35).

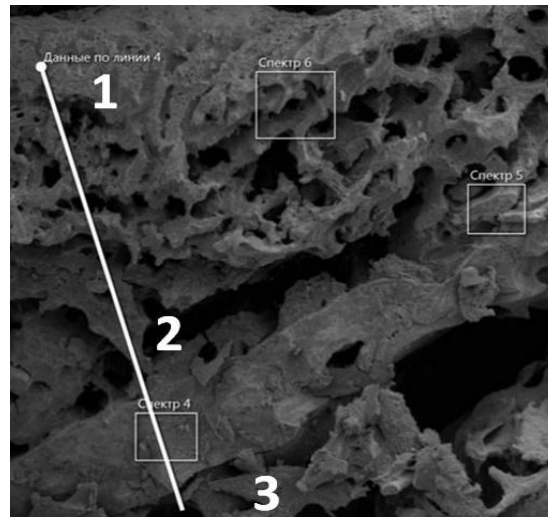


Рисунок 3.35 – Ділянка дефекту травмованої стегнової кістки на 45-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату й материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. x150

За допомогою зондового мікроаналізу було визначено рівні Са й Р в ділянці дефекту в межах $8,5 \pm 0,14$ % та $4,95 \pm 0,19$ %, що свідчить про зниження рівня даних макроелементів порівняно з контролем на 24,11 % ($p < 0,05$) та 6,60 % ($p < 0,05$) відповідно. Крім того, відмічалось незначне зменшення рівнів Са та Р в прилеглих до кісткового дефекту ділянках і материнській кістці як порівняно з попереднім терміном, так і з контролем (рис. 3.36).

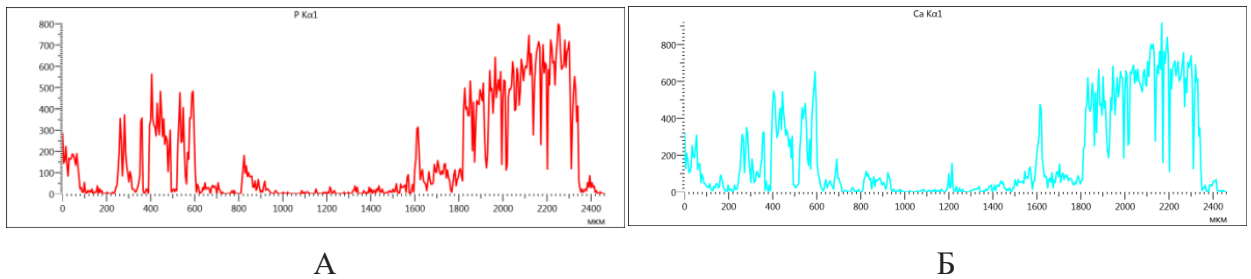


Рисунок 3.36 – Розподіл рівня P та Ca на поверхні травмованої стегнової кістки (регенерат, межа його з материнською кісткою, материнська кістка) при дії 5-фторурацилу на 45-ту добу експерименту: А – фосфор, Б – кальцій.

За результатами КТ-дослідження на 45-ту добу експерименту кісткова мозоль була виражена задовільно за рахунок ендостальних та слабовиражених періостальних нашарувань товщиною 1,6 мм в ділянці дефекту. Відмічалось значне зростання ОЩ регенерату – на 62,45 % ($p < 0,0001$), за помірного зростання показників ОЩ в дистальній (7,22 % ($p < 0,0001$)) та проксимальній (на 3,32 % ($p < 0,05$)) частинах МК.

Дослідження механічних властивостей встановило поступове зростання межі міцності на стиск травмованих стегнових кісток на рівні $92,48 \pm 4,09$ МПа та мікротвердості регенерату – $456,67 \pm 13,41$ МПа, проте вони були нижчим на 19,89 % ($p < 0,0001$) та 13,54 % ($p < 0,0001$) за показники контрольної групи.

Таким чином, одержані дані на 45-ту добу експерименту свідчать про затримку формування кісткового регенерату в ділянці дефекту та зниження інтенсивності його мінералізації, а також сповільнення ремодельючої активності материнської кістки у відповідь на травму.

3.3.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту

Під час гістологічного дослідження встановлено, що основна частина регенерату була представлена новоутвореною кістковою тканиною ($87,00 \pm 4,89$ %), що на $72,33 \pm 4,63$ % складалася з пластинчастої та на $14,67 \pm 5,16$ %

із ретикулофіброзної кісткової тканини. Порівняно з контрольною групою в умовах впливу 5-фторурацилу в регенераті відмічалось зменшення загальної площі кісткової тканини на 5,95 % за рахунок зменшення площі пластинчастої кісткової тканини на 11,06 % ($p = 0,008$) та зростання на 31,33 % ($p = 0,22$) площі ретикулофіброзної кісткової тканини. Між материнською кісткою та дефектом відбувався активний процес формування з'єднань (рис. 3.37). Отримані дані свідчать про сповільнення процесів процесів перебудови в новоутвореному регенераті.

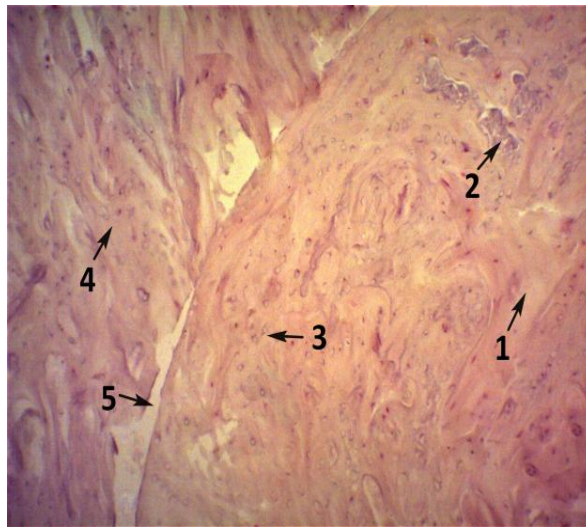


Рисунок 3.37 – Гістологічний зріз зони дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи на 60-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка, 5 – межа регенерату й материнської кістки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. $\times 100$

Активність маркера резорбції кісткової тканини на 60-ту добу експерименту визначалася у $26,67 \pm 1,63$ % імуноактивних клітин регенерату. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++)), як і в попередньому терміні експерименті (Рисунок 3.38). Відмічалось зниження активності експресії катепсину К на 6,42 % ($p = 0,04$) порівняно з попереднім терміном експерименту, проте він був на 17,64 % ($p < 0,05$) вищим за показники контрольної групи.

60-та доба експерименту характеризувалася поступовим зростанням (на 7,25 % ($p = 0,08$) рівня експресії остеопонтину в межах $22,17 \pm 1,47$ %. Проте одержані показники були на 18,87 % ($p < 0,05$) нижчими за дані контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин оцінювали як помірну (рис. 3.39).

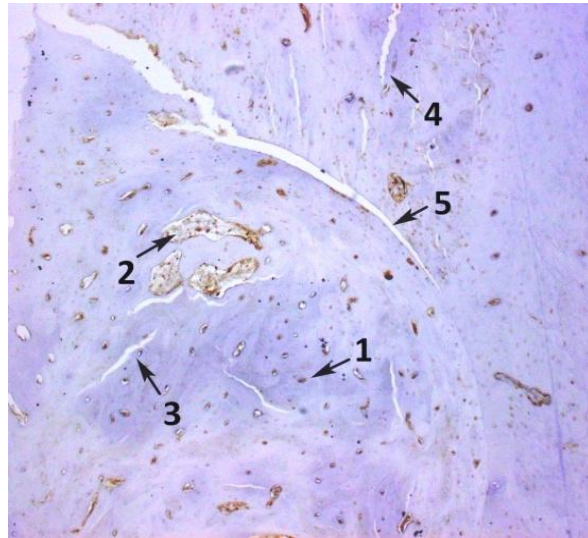


Рисунок 3.38 – Експресія катепсину К у ділянці кісткового дефекту на 60-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи. 1 – пластинчаста тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – мікротріщини у регенераті, 4 – материнська кістка, 5 – межа регенерату й материнської кістки. Зб. х50

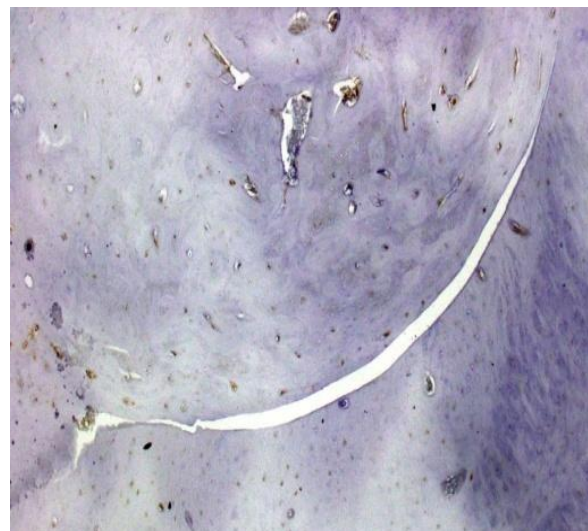


Рисунок 3.39 – Експресія остеопонтину в кістковому дефекті на 60-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи. 1 – пластинчаста кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – мікротріщини в регенераті, 4 – материнська кістка, 5 – межа регенерату й материнської кістки. Зб. х50

За допомогою растрової електронної мікроскопії зразків кісток щурів на 60-ту добу експерименту встановлено, що ділянка дефекту була заповнена новоутвореною кістковою тканиною, представленою переважно пластинчастою тканиною у вигляді остенів різного ступеня зрілості, розміщених здебільшого на периферії регенерату. У центрі регенерату відмічалася наявність ділянок витончених новоутворених кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини. Між регенератом та материнською кісткою місцями зберігався вільний простір (рис. 3.40).

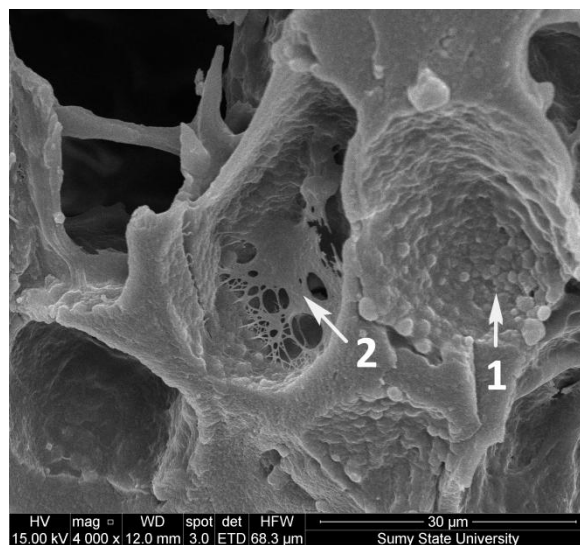


Рисунок 3.40 – Ділянка кісткового дефекту на 60-ту добу експерименту у тварин II експериментальної групи, яким вводили 5-фторурацил. 1 – порожні кісткові лакуни у складі пластинчастої кісткової тканини регенерату, 2 – кісткові лакуни з остеоцитами. Зб. $\times 4\,000$

Вміст макроелементів на 60-ту добу з моменту травми почав поступово наростати і становив для Ca $9,15 \pm 0,19\%$ і $5,1 \pm 0,24\%$ – для P, але одержані показники були значно меншими, ніж у контролі на $26,03\%$ ($p < 0,005$) та $17,07\%$ ($p < 0,005$) відповідно. У материнській кістці та ділянках, прилеглих до регенерату, на відміну від попередніх термінів, відмічалася поступове зростання рівня цих макроелементів у межах 1–2%, але їх рівень був нижчим, ніж у контролі на $20,45\%$ ($p < 0,005$) та $17,33\%$ ($p < 0,005$). Це свідчить про

сповільнення процесів мінералізації в новоутвореному кістковому регенераті в умовах застосування 5-фторурацилу.

За результатами КТ-дослідження на 60-ту добу в ділянці дефекту візуалізували кісткову мозоль із помірно вираженими періостальними й ендостальними нашаруваннями (рис. 3.41). ОЩ в регенераті становила $1655,00 \pm 32,69$ НУ, дистальній частині МК – $2330,00 \pm 39,59$ НУ, проксимальній частині МК – $2647,00 \pm 32,50$ НУ, що свідчило про зростання зазначених показників порівняно з попереднім терміном експерименту на 21,07 % ($p < 0,0001$), 7,07% ($p < 0,0001$) та 2,36 % ($p < 0,05$) відповідно, проте є нижчими за показники контрольної групи в цей термін на 23,02 % ($p < 0,0001$) у регенераті, на 28,03 % ($p < 0,0001$) у дистальній частині МК, та на 16,02 % ($p < 0,0002$) у проксимальній частині МК. Отже, відмічалоя сповільнене формування кісткової мозолі в ділянці травми в цій експериментальній групі.

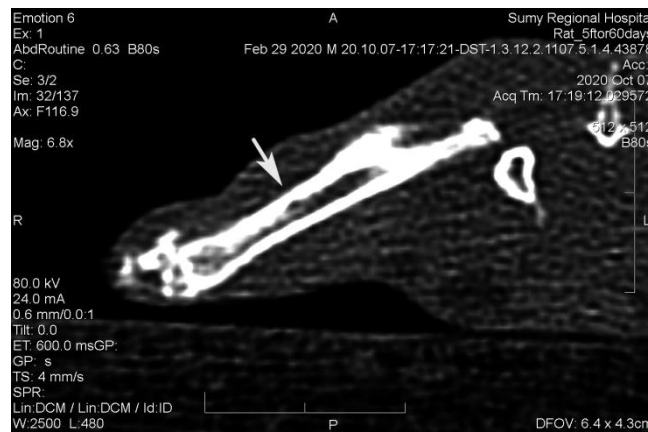


Рисунок 3.41 – Комп'ютерна томограма лівої стегнової кістки щура на 60-ту добу експерименту в разі введення 5-фторурацилу. Кісткова мозоля лівої стегнової кістки.

За допомогою дослідження механічних властивостей травмованих стегнових кісток щурів визначено межу міцності на стиск в регенераті на рівні $98,02 \pm 4,82$ МПа, мікротвердість – $468,83 \pm 18,57$ МПа. Це на 5,99 % ($p = 0,36$) та 2,66 % ($p = 0,24$) вище за попередній термін експерименту, проте на 18,48 % ($p < 0,0001$) та 11,93 % ($p < 0,05$) нижче від показників контрольної групи.

Одержані дані свідчать про зниження механічних властивостей травмованих кісток в умовах впливу 5-фторурацилу.

3.4 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафіза стегнових кісток щурів за умов впливу метотрексату

3.4.1 Репаративний остеогенез на 15-ту добу експерименту

Під час проведення гістологічного дослідження встановлено, що більша частина регенерату була представлена сполучною тканиною площею $60,83 \pm 2,99$ %, що на 8,29 % ($p = 0,04$) більше за показники контрольної групи. Показник величини площі ретикулофіброзної тканини ($39,17 \pm 4,17$ %) достовірно не відрізнявся від такого у тварин контрольної групи, але ймовірне спрямування змін у тварин цієї групи було в бік зменшення показника на 10,63 % ($p = 0,14$). Регенерат був представлений переважно дрібнопетлистими трабекулами. Міжтрабекулярний простір заповнений сполучною тканиною та кістковим мозком (рис. 3.42).

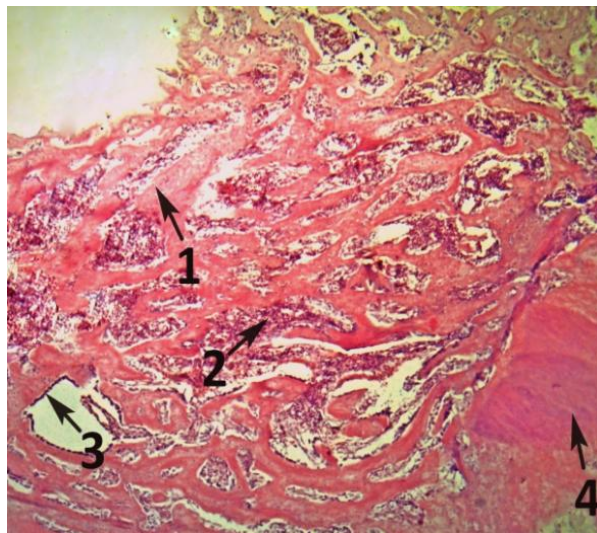


Рисунок 3.42 – Гістологічний зріз регенерату стегнової кістки щура ІІІ експериментальної групи на 15-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – остеобласти, 4 – материнська кістка. Збарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х40

Експресія катепсину К у ділянці регенерату становила $33,83 \pm 1,47$ % імуноактивних клітин, що на 9,13 % ($p = 0,05$) вище від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми оцінювали як високу (+++) (рис. 3.43).

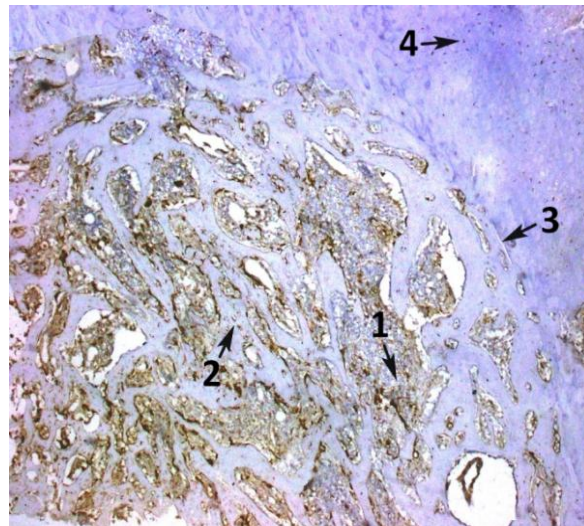


Рисунок 3.43 – Експресія катепсину К у ділянці кісткового дефекту на 15-ту добу експерименту у тварин III експериментальної групи. 1 – сполучна тканина, 2 – ретикулофіброзна тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилином Майєра. Зб. x100

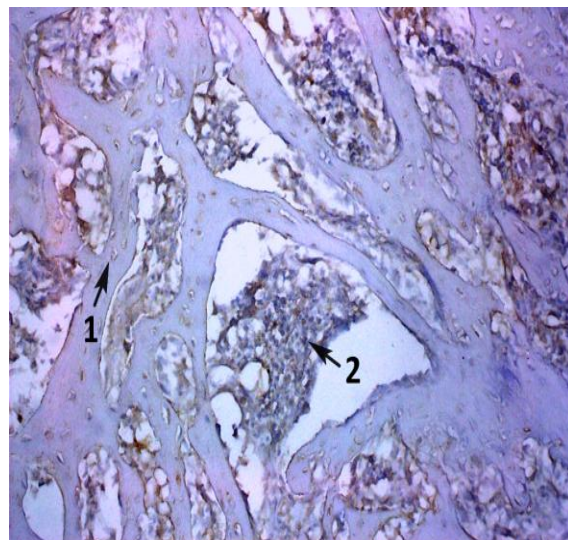


Рисунок 3.44 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового дефекту на 15-ту добу експерименту у тварин III експериментальної групи. 1 – кісткові трабекули, 2 – сполучна тканина. Забарвлення гематоксилином Майєра. Зб. x200

Активність експресії остеопонтину в ділянці регенерату на 15-ту добу експерименту була слабовираженою і визначалася на рівні $14,83 \pm 1,17$ %, що на 18,38 % ($p = 0,0014$) нижче за відповідні показники контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин оцінювали як низьку (рис. 3.44).

Аналіз сканограм на 15-ту добу експерименту показав, що порожнина дефекту була заповнена дрібнопетлястими тонкими трабекулами ретикулофіброзної тканини, які містили мікротріщини. У міжтрабекулярних просторах розташовувалась сполучна тканини з великою кількістю судин.

На межі між материнською кісткою та новоутвореним регенератом зберігався вільний простір. Порівняно з контрольною групою відмічалось сповільнене формування кісткових балок та зменшення їх товщини, а також збільшення міжтрабекулярного простору (рис. 3.45).

Під час проведення зондового мікроаналізу поверхні травмованих стегнових кісток рівень Са та Р в ділянці новоутвореного регенерату становив $5,75 \pm 0,19$ % та $3,39 \pm 0,17$ %, що на 36,04 % ($p < 0,005$) та 21,16 % ($p < 0,05$) нижче від показників контрольної групи. На поверхні материнської кістки також відмічалось зниження вмісту Са й Р порівняно з контролем на 22,24 % ($p < 0,05$) та 13,64 % ($p < 0,05$).

Це свідчить про затримку формування кісткового регенерату в ділянці дефекту та сповільнення ремоделюючої активності материнської кістки у відповідь на травму в умовах впливу метотрексату (рис. 3.46 А, Б).

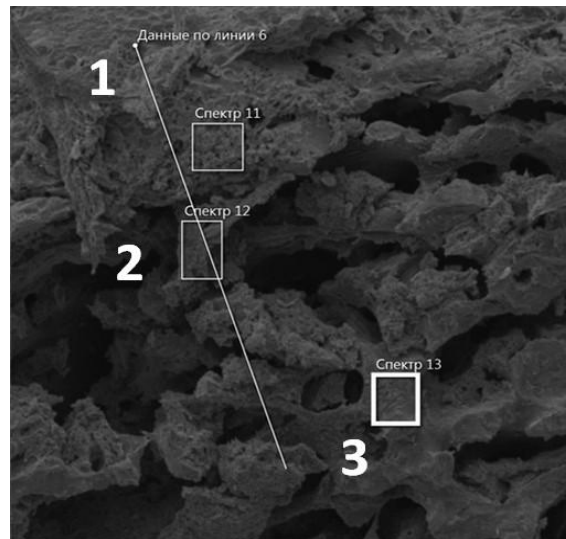
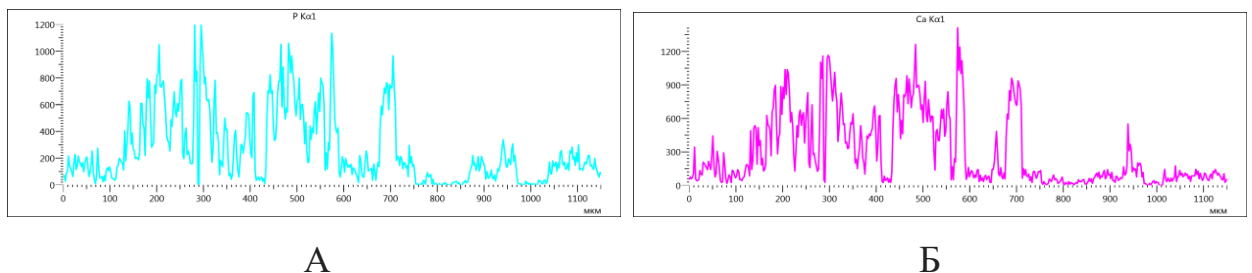


Рисунок 3.45 – Ділянка дефекту стегнової кістки на 15-ту добу експерименту у тварин III експериментальної групи, яким уводили метотрексат. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату й материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. x180



А

Б

Рисунок 3.46 – Розподіл рівня фосфору та кальцію на поверхні травмованої довгої кістки (материнська кістка, її межа з регенератом, регенерат) у разі застосування метотрексату (III експериментальна група) на 15-ту добу експерименту: А – фосфор, Б – кальцій.

Під час проведення КТ-дослідження на 15-ту добу експерименту на знімках візуалізувався дефект округлої форми з чіткими межами. ОЩ регенерату становила $398,00 \pm 30,58$ HU, дистальної й проксимальної частин МК відповідно $1258,50 \pm 10,99$ HU та $1983,00 \pm 30,61$ HU (рис. 3.47). Отримані дані є нижчими за аналогічні показники контрольної групи на 62,43 % ($p < 0,005$), 47,00 % ($p < 0,005$) та 24,20 % ($p < 0,005$) відповідно, що

свідчить про негативний вплив метотрексату навіть після одноразового застосування препарату.

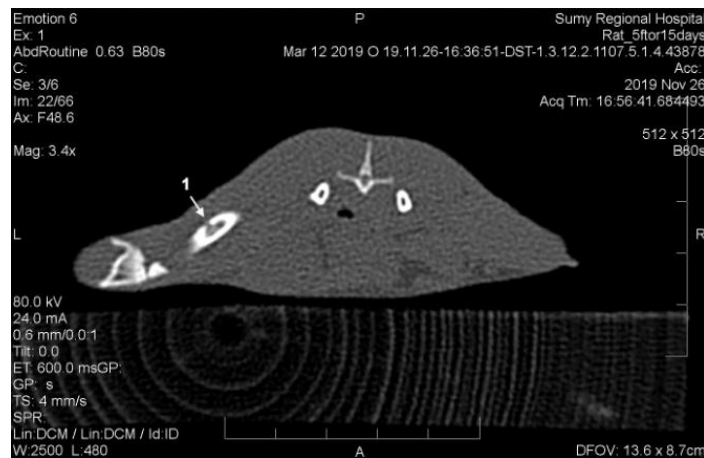


Рисунок 3.47 – Комп’ютерна томограма лівої стегнової кістки щура на 15-ту добу експерименту в разі введення метотрексату. 1 – дефект кортикального шару лівої стегнової кістки.

За допомогою дослідження механічних властивостей травмованих кісток встановлено, що в умовах впливу метотрексату середнє значення межі міцності на стиск у регенераті становило $88,36 \pm 2,90$ МПа, мікротвердості – $441,00 \pm 69,66$ МПа, що є нижчим за показники контрольної групи на 7,51 % ($p = 0,0003$) та 9,23 % ($p = 0,19$) відповідно.

3.4.2 Репаративний остеогенез на 30-ту добу експерименту

У регенераті тварин III експериментальної групи кісткова тканина була представлена переважно ретикулофіброзним типом ($25,67 \pm 4,13$ %) у вигляді дрібнопетлястої сітки грубоволокнистих трабекул з остеоцитами. На поверхні кісткових трабекул розташовувались остеобласти. Переважно по краям дефекту формувалися судинні канали й структури, подібні до первинних остеонів ($14,5 \pm 3,83$ %). Сполучна тканина займала $59,83 \pm 4,02$ % площі регенерату, що на 25,50 % ($p = 0,0009$) більше, ніж у регенераті тварин контрольної групи (рис. 3.48).

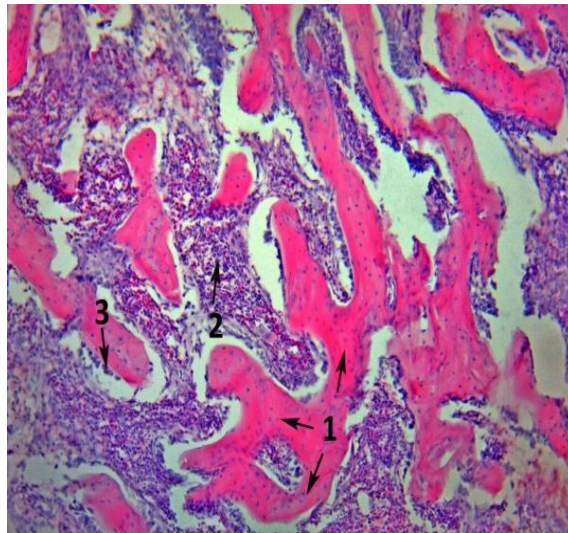


Рисунок 3.48 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура III експериментальної групи на 30-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – остеобласти. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

На 30-ту добу експерименту експресія катепсину К становила $31,67 \pm 1,75$ %, що на 6,38 % ($p = 0,08$) відповідно менше, ніж у попередній термін експерименту. Проте рівень експресії катепсину К порівняно з контролем був вищим на 11,12 % ($p = 0,01$). Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалася високою (+++). Це свідчило про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату.

На 30-ту добу експерименту лише окремі кісткові клітини, розміщені переважно на периферії регенерату, виявляли імунореактивність. При цьому рівень експресії остеопонтину клітинами в ділянці регенерату становив $17,50 \pm 1,05$ %, що на 18,15 % ($p < 0,05$) нижче, ніж у тварин контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми оцінювали як низьку (рис. 3.49).

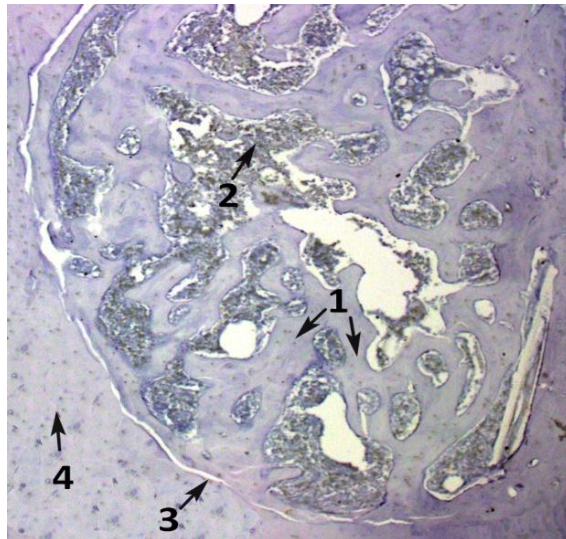


Рисунок 3.49 – Експресія остеопонтину в кістковому регенераті на 30-ту добу експерименту у тварин ІІІ експериментальної групи, яким вводили метотрексат. 1 – кісткові трабекули, 2 – сполучна тканина, 3 – межа регенерату та материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра.Зб. x100

Аналіз сканограм на 30-ту добу експерименту після дворазового введення метотрексату з інтервалом 21-а доба встановив, що більша частина регенерату представлена витонченими, хаотично розташованими балками грубоволокнистої кісткової тканини з незначними ділянками пластинчастої кісткової тканини. Міжтрабекулярний простір заповнений клітинами фібро- та остеобластичного диферону, що синтезують кісткову й сполучну тканину. Вони мають округлу, веретеноподібну форму та з'єднуються між собою численними відростками (рис. 3.50).

За допомогою зондового мікроаналізу регенерату встановлене поступове зростання рівня Са та Р, але вони були нижчими, ніж у контрольній групі, на 39,31 % ($p < 0,05$) та 23,96 % ($p < 0,05$). Зберігається тенденція до подальшого зниження рівня Са в материнській кістці порівняно з попереднім терміном експерименту на 3,87 % ($p < 0,0001$), а також Р на 3,73 % ($p < 0,0001$) (рис. 3.51, 3.52).

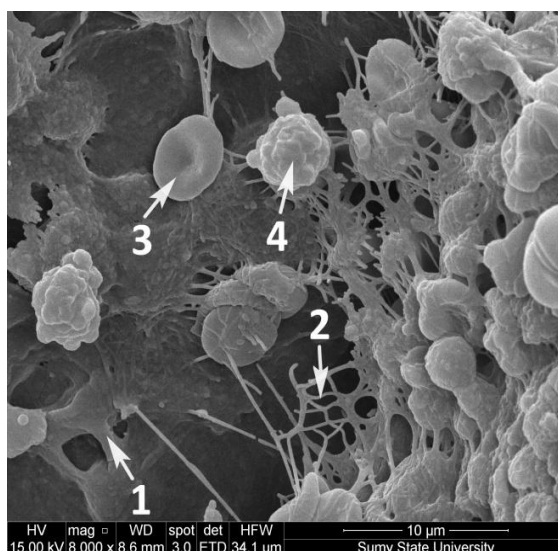


Рисунок 3.50 – Ділянка міжбалкового простору кісткового дефекту тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат на 30-ту добу після травми. 1 – кісткові балки, 2 – колагенові волокна, 3 – еритроцити, 4 – тучні клітини. Зб. x8000

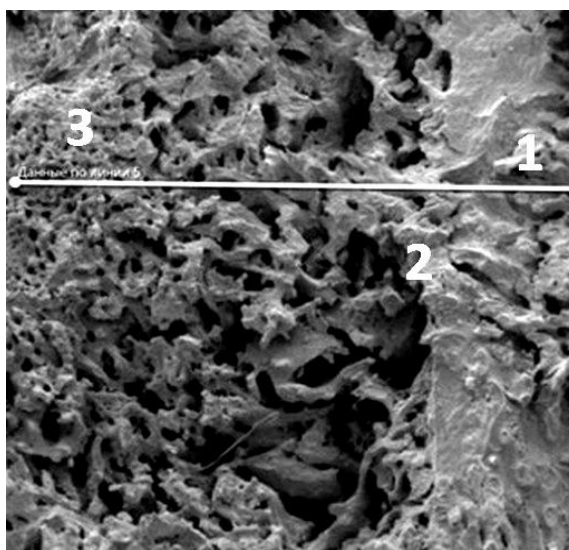
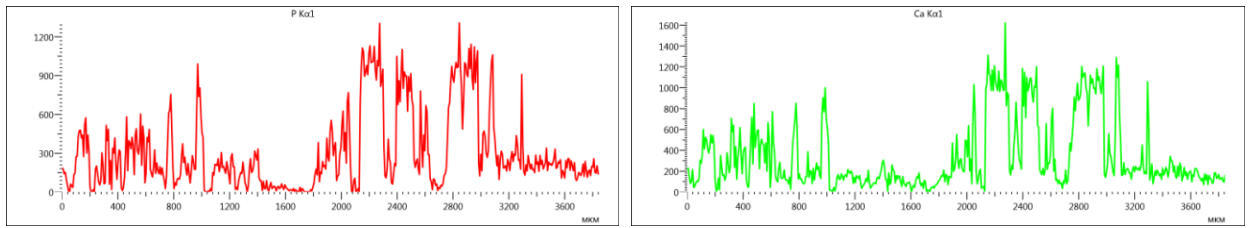


Рисунок 3.51 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат на 30-ту добу після травми. 1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату і материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. x70



А

Б

Рисунок 3.52 – Розподіл рівня фосфору та кальцію на поверхні травмованої довгої кістки (материнська кістка, її межа з регенератом, регенерат) у разі застосування метотрексату (III експериментальна група) на 30-ту добу експерименту: А – фосфор, Б – кальцій.

На 30-ту добу на КТ-знімках візуалізувалася слабовиражена кісткова мозоль за рахунок ендостальних нашарувань. Між дефектом і материнською кісткою зберігалася чітка межа. Порівняно з попереднім терміном експерименту встановлено зростання ОЩ регенерату на 90,02 % ($p < 0,0001$), дистального відділу МК – на 45,09 % ($p < 0,0001$) за майже незмінних показників ОЩ проксимального відділів МК (на 1,31 % ($p = 0,15$)). Проте одержані дані є меншими за відповідні показники контрольної групи: на 21,95 % ($p < 0,0001$) – у регенераті, на 15,88 % ($p < 0,0001$) – у дистальній, і на 29,37 % ($p < 0,0001$) – у проксимальній частинах МК.

Межа міцності на стиск в ділянці дефекту травмованих стегнових кісток становила $89,64 \pm 3,70$ МПа, показник мікротвердості – $443,17 \pm 31,69$ МПа, що свідчило про тенденцію до зростання кісткової міцності за умов застосування метотрексату порівняно з попереднім терміном експерименту (на 1,44 % ($p = 0,52$) та 0,49 % ($p = 0,94$) відповідно, проте є меншими, ніж у контрольній групі (на 14,02 % ($p < 0,0001$) й 11,58 % ($p < 0,05$)).

3.4.3 Репаративний остеогенез на 45-ту добу експерименту

У тварин III експериментальної групи регенерат був представлений переважно дрібнопетлястими трабекулами з неоднорідно забарвленим матриксом. Більшість трабекул були тонкими зі щілинами й тріщинами. Кісткові балки розташовані в хаотичному порядку без відповідності лініям навантаження. На зовнішній поверхні трабекул визначалася невелика кількість остеобластів. Міжтрабекулярні простори були розширеними й містили сполучну тканину, середній показник площі якої становив $54,67 \pm 3,61$ %. Також у міжтрабекулярних просторах візуалізувалися кровоносні судини та червоний кістковий мозок (рис. 3.53).

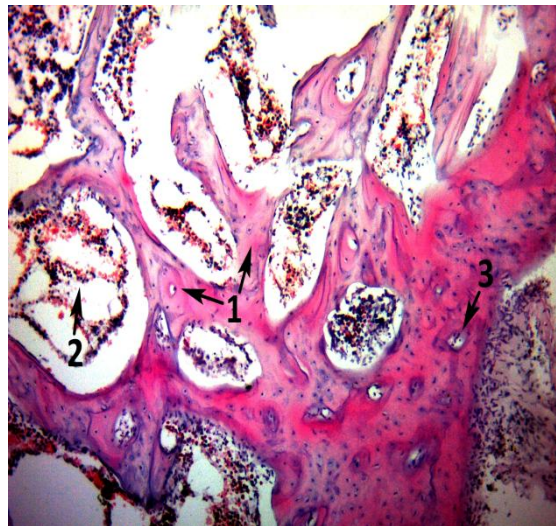


Рисунок 3.53 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин III експериментальної групи на 45-ту добу після травми. 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина. Забарвлення гематоксилін-еозином. 36. x100

На 45-ту добу спостереження маркер катепсину К у регенераті виявлявся у $29,83 \pm 1,47$ % імунопозитивних клітин, що є на 15,62 % ($p = 0,03$) нижчим порівняно з 30-ю добою після травми, проте на 18,50 %

($p = 0,0002$) вищим за показники контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів визначали як помірну (++) (рис. 3.54).

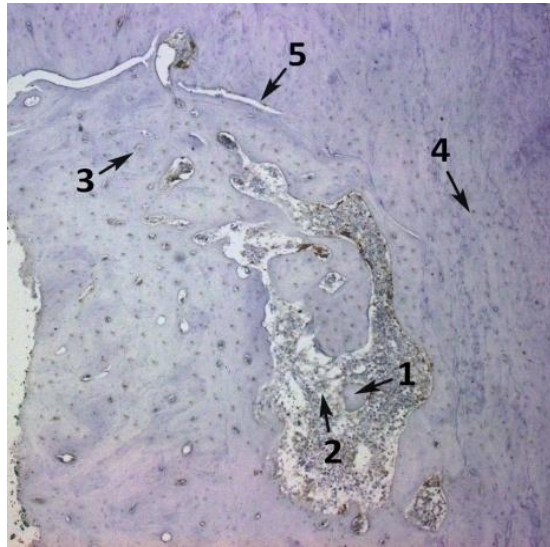


Рисунок 3.54 – Експресія катепсину К ділянки дефекту стегнової кістки на 45-ту добу після травми у тварин III експериментальної групи. 1 – кісткова балка, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка, 5 – межа регенерату й материнської кістки. Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. х50

На 45-ту добу експерименту відмічалось незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який виявили в $19,33 \pm 1,63$ % клітин, що на $12,93$ % ($p = 0,019$) більше, ніж на 30-ту добу після травми, та на $19,46$ % ($p = 0,0003$) менше, ніж у контрольній групі. Імунопозитивні клітини були зосереджені переважно по краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми позитивно забарвлених клітин залишалася низькою.

Аналіз сканограм на 45-ту добу експерименту після триразового введення метотрексату (після нанесення травми, на 21-шу та 42-гу добу експерименту) встановив затримку формування пластинчастої кісткової тканини в регенераті. Більша частина дефекту була заповнена дрібнопетлястими кістковими трабекулами, що формували лакуни сферичної форми з остеогенними клітинами. Між регенератом і материнською кісткою зберігався вільний простір (рис. 3.55).

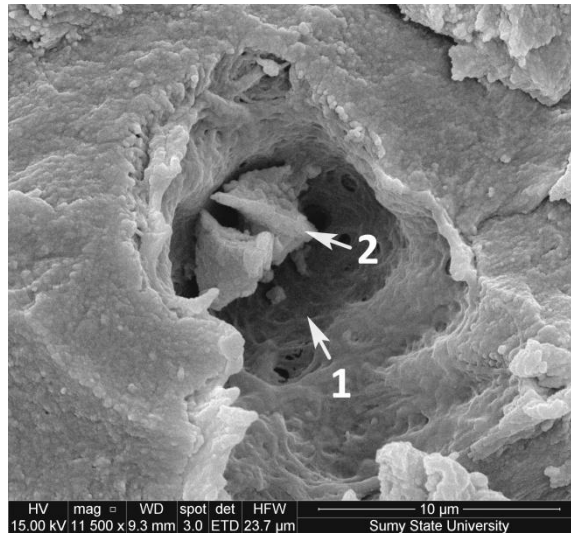


Рисунок 3.55 – Ділянка кісткового дефекту стегнової кістки тварин ІІІ експериментальної групи, яким вводили метотрексат на 45-ту добу експерименту. 1 – кісткова лакуна, 2 – остеогенні клітини всередині кісткової лакуни. Зб. x11500

Відмічалася тенденція до зниження рівня Са й Р в ділянці дефекту порівняно з контролем на 40,63 % ($p < 0,005$) та 21,87 % ($p < 0,005$). Незначне зниження зазначених мінеральних речовин спостерігалось в прилеглих до кісткового дефекту ділянках та материнській кістці як порівняно з попереднім терміном, так і з контролем. Одержані показники свідчили про низьку інтенсивність мінералізації органічного матриксу в умовах впливу метотрексату.

На 45-ту добу, за даними КТ, в ділянці дефекту кісткова мозоль була слабовиражена, мала товщину 1,2 мм. ОЩ регенерату становила $1327,00 \pm 21,25$ НУ, дистальної частини МК – $2087,5 \pm 44,78$ НУ, і проксимальної – $2256,00 \pm 19,66$ НУ, що свідчило про поступове її зростання у разі загоєння дефекту, проте є нижчими за відповідні показники контрольної групи: на 10,17 % ($p < 0,0001$) – у регенераті, на 11,76 % ($p < 0,0001$) – у дистальній, та на 18,62 % ($p < 0,0001$) – у проксимальній частинах МК (рис. 3.56).



Рисунок 3.56 – Комп’ютерна томограма стегнових кісток щура на 45-ту добу експерименту в разі застосування метотрексату. 1 – дефект кортикального шару лівої стегнової кістки.

Під час дослідження механічних властивостей травмованих стегнових кісток щурів встановлене середнє значення показника межі міцності на стиск на рівні $90,85 \pm 3,35$ МПа, мікротвердості – $445,00 \pm 21,23$ МПа. Одержані дані є нижчими за показники контрольної групи: на 22,05 % ($p < 0,0001$) та 16,52 % ($p < 0,0001$). Це свідчить про зниження кісткової міцності в ділянці новоутвореного регенерату при повторному введенні метотрексату.

3.4.4 Репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту

За результатами гістологічного дослідження основну частину новоутвореного регенерату становила кісткова тканина площею $78,33 \pm 3,54$ %, що на 15,31 % ($p < 0,0001$) менше від показників контрольної групи. Водночас пластинчаста тканина заповнювала $59,50 \pm 3,27$ % площі регенерату, що на 26,84 % ($p < 0,0001$) менше, ніж у тварин контрольної групи. Сполучна тканина займала $21,67 \pm 4,27$ % площі регенерату (рис. 3.57).

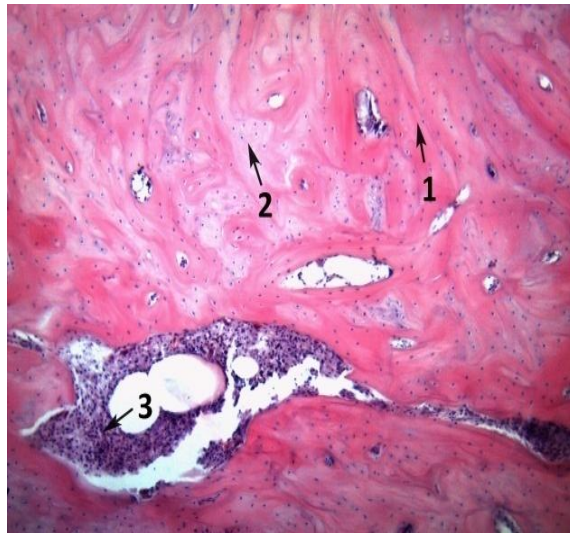


Рисунок 3.57 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура ІІІ експериментальної групи на 60-ту добу після травми. 1 – пластинчаста кісткова тканина, 2 – ділянка новоутвореного регенерату низької мінералізації, 3 – сполучна тканина. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

На 60-ту добу експерименту в регенераті встановлене зниження активності катепсину К на рівні $27,83 \pm 1,17$ % клітин, проте цей показник був вищим на $22,76$ % ($p < 0,05$) за показники контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++) , як і в попередньому терміні експерименту (рис. 3.58).

Активність експресії остеопонтину в регенераті становила $20,83 \pm 1,17$ % імуноактивних клітин. Водночас спостерігалось значне його зниження на $21,89$ % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин була помірною.

За допомогою растрової електронної мікроскопії на 60-ту добу експерименту встановлено сповільнене формування пластинчастої тканини в ділянці дефекту. У центрі регенерату були помітні ділянки витончених новоутворених кісткових балок із широкими міжбалковими просторами. Між материнською кісткою та регенератом встановлено подекуди

відсутність тісних контактів (рис. 3.59). Це свідчить про затримку утворення кісткової мозолі в ділянці дефекту за дії метотрексату.

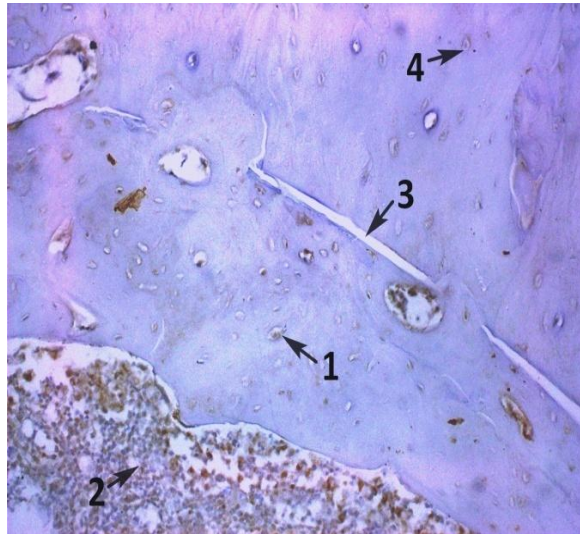


Рисунок 3.58 – Експресія катепсину К у кістковому дефекті на 60-ту добу експерименту у тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат. 1 – пластинчаста кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксиліном Майєра. 36. x100

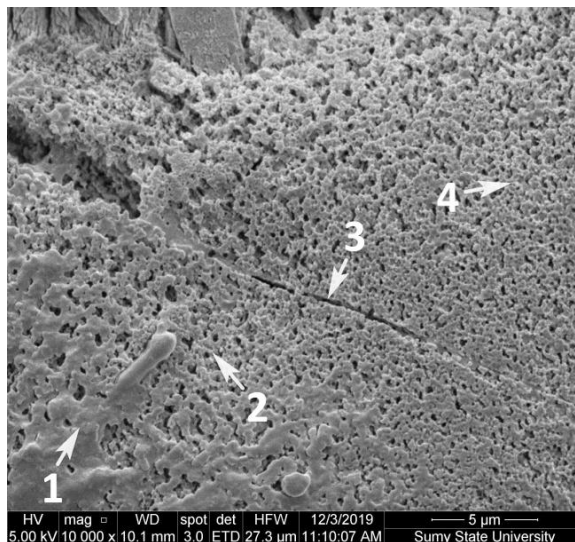


Рисунок 3.59 – Ділянка травмованої стегнової кістки на 60-ту добу експерименту у тварин III експериментальної групи, яким вводили метотрексат. 1 – кісткові трабекули, 2 – пластинчаста кісткова тканина, 3 – межа регенерату й материнської кістки, 4 – материнська кістка. 36.x10 000

Вміст мінеральних речовин у кістковому регенераті на 60-ту добу з моменту травми почав поступово зростати, проте був значно нижчим за відповідні показники Са й Р контрольної групи на 40,66 % ($p < 0,05$) та 25,20 % ($p < 0,05$) відповідно. У материнській кістці й ділянках, прилеглих до регенерату, на відміну від попередніх термінів установлене поступове зростання рівня Са й Р в межах 2–3 %, але вони були нижчими, ніж у контрольній групі, зокрема в материнській кістці – на 22,24 % ($p < 0,05$) та 14,59 % ($p < 0,05$).

На 60-ту добу експерименту в ділянці травми кісткова мозоль була виражена помірно за рахунок переважно ендостальних нашарувань, товщиною 1,0 мм. ОЩ регенерату становила $1550,80 \pm 21,33$ НУ, що на 16,86 % ($p < 0,0001$) є вищим за попередній терміном дослідження, проте на 38,64 % ($p < 0,0001$) нижчим за показники контрольної групи. У дистальній частині МК ОЩ становила $2430,30 \pm 32,06$ НУ, у проксимальній – $2519,00 \pm 14,68$ НУ, що на 22,76 % ($p < 0,0001$) та 21,91 % ($p < 0,0001$) відповідно менше, ніж у контрольній групі.

Під час визначення тривкісних характеристик кісток щурів межа міцності на стиск в ділянці дефекту становила $91,92 \pm 2,91$ МПа, мікротвердість – $446,50 \pm 24,54$ МПа, що на 30,81 % ($p < 0,0001$) та 19,22 % ($p < 0,0001$) нижче, ніж у контрольній групі. Це свідчить про інгібуючий вплив метотрексату на процеси репаративної регенерації впродовж усього експерименту.

Висновки до розділу 3

1. Застосування протипухлинних хіміопрепаратів, зокрема, таких як доксорубіцин, 5-фторурацил та метотрексат, в експерименті призводить до сповільнення процесів репаративної регенерації, що проявляється затримкою формування регенерату у вигляді зниження темпів диференціювання тканин. Про це свідчить переважання в регенераті в усіх експериментальних групах

тварин площі сполучної тканини поряд із затримкою формування ретикулофіброзної кісткової тканини на ранніх етапах репаративної регенерації з подальшою сповільненою перебудовою її у пластинчасту кісткову тканину на пізніх етапах репаративного остеогенезу. Зміни в мікроархітектурі зони дефекту в умовах впливу зазначених протипухлинних хіміопрепаратів характеризуються хаотичністю розміщення кісткових трабекул, що мають порівняно менші розміри, наявністю вільного простору між материнською кісткою та регенератом, низькими темпами утворення ліній склеювання між ними. Найбільш виражена затримка процесів ремоделювання кісткового регенерату відзначена у випадках застосування доксорубіцину та метотрексату, в той час як 5-фторурацил виявив менший інгібуючий вплив на зазначені процеси.

2. На основі імуногістохімічного дослідження встановлено, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів спричиняє підвищення експресії катепсину К у ділянці кісткового регенерату та прилеглих ділянках материнської кістки, що свідчить про активацію остеокластогенезу та посилення процесів резорбції в кістковій тканині. Також відмічається зменшення рівня й активності остеопонтину в процесі репаративної регенерації, що призводить до сповільнення формування кісткового регенерату в ділянці травми та низької його мінералізації.

3. За результатами растрової електронної мікроскопії, в усіх експериментальних групах впродовж експерименту відмічається затримка формування кісткової мозолі в ділянці дефекту, зниження інтенсивності мінералізації новоутворених тканин у кістковому регенераті та сповільнення ремоделюючої активності материнської кістки.

4. Результати зондового мікроаналізу свідчать про зниження рівня кальцію та фосфору травмованих стегнових кісток за дії протипухлинних хіміопрепаратів. Найбільш виражена втрата зазначених макроелементів відмічається в умовах впливу доксорубіцину й метотрексату.

5. Проведене КТ-дослідження свідчить про сповільнене формування кісткової мозолі в місці травми на фоні протипухлинної хіміотерапії. Це супроводжується зниженням інтенсивності процесів мінералізації кісткової тканини, що підтверджують показники ОЩ як у самому регенераті, так і в прилеглий до нього материнській частині стегнової кістки.

6. Установлене зниження біомеханічних властивостей стегнових кісток щурів в усіх експериментальних групах (межі міцності на стиск та мікротвердості) відповідно до збільшення терміну дії патологічного чинника. В цілому, зазначені зміни призводять до збільшення ризику їх переломів.

Результати досліджень розділу 3 наведено в таких публікаціях:

1. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ. Комп'ютерно-томографічна оцінка динаміки загоєння дефекту діяфіза стегнової кістки в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2020;т.20,2(70):165–170. DOI: 10.24061/2413 0737

2. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ, Понирко АО, Теслик ТП, Гула ВІ Імуногістохімічний аналіз експресії катепсину К та остеопонтину клітинними елементами кісткової тканини регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021; 2(160):236–241. DOI:10.29254/2077-4214-2021-2-160-236-241

3. Riabenko TV. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2021;9(3):295–307. DOI: 10.21272/eumj.2021;9(3):295-307

4. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ, Ковалюк ТМ. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; т.6, 5(33):116–126. *VI Міжнародна науково-практична конференція з міжнародною участю. Проблеми, досягнення та перспективи розвитку*

медико-біологічних і спортивних наук. 29 вересня 2021 р. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116

5. Riabenko TV, Korenkov OV, Dmytruk SM, Yarmolenko OS, Ponyrko AA, Pernakov MS, Hula VI. Morphological features of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*.2022;75(3):570-576. DOI:10.36740/WLek202203102.

6. Riabenko TV, Dmytruk SM, Yarmolenko OS, Pernakov MS, Teslyk TP, Ponyrko AA, Gordienko OV. Influence of antitumor chemotherapeutics on mechanical properties of injured tubular skeletal bone. *Azerbaijan Medical Journal*. 2022. № 1. P. 117–124. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.019>.

7. Riabenko TV. The effect of antitumor chemotherapy on the healing of the femoral defect according to the results of computed tomography. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific; Sumy; Biomedical perspectives II; 2020.P.29*.

4. Рябенко Т.В. Зміни механічних властивостей травмованих трубчастих кісток при дії протипухлинних хіміопрепаратів. Збірник тез доповідей. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини*; м. Тернопіль, 11 червня 2021 р. С. 176–178.

8. Riabenko TV. Influence of antitumor chemotherapeutics on bone metabolism in the area of long bone diaphysis defect. *International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific; Sumy, //Biomedical perspectives III; 2021.P. 24*.

9. Рябенко ТВ. Особливості репаративної регенерації щурів та зміни рівня мікроелементів травмованих довгих трубчастих кісток в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. Збірник тез доповідей. *II міжнародна наукова конференція «Здобутки та досягнення прикладних та фундаментальних наук XXI століття»*; 2021; Лист.5; Рівне; 2021, с. 65–66.

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні проблема репаративної регенерації залишається найбільш актуальною проблемою ортопедії й травматології. Зокрема, в наш час зросла частота появи переломів кісток саме серед пацієнтів з онкологічними захворюваннями.

Відомо, що злоякісні новоутворення призводять до метастатичного ураження кісток і розвитку остеопорозу. Зменшення маси кісткової тканини та її мінералізації підвищує ризик виникнення переломів кісток в онкологічних хворих. Однак необхідно зазначити, що специфічне ураження кісткової тканини в пацієнтів із злоякісними новоутвореннями може бути наслідком не лише негативного впливу на організм пухлини, але й протипухлинної хіміотерапії. Остання є одним із основних методів лікування раку, призначається курсами впродовж тривалого часу. Таким чином, можна зробити висновок, що загоєння переломів кісток в онкологічних хворих часто відбувається в умовах застосування протипухлинних хіміопрепаратів.

Проблема репаративної регенерації кістки в онкологічних пацієнтів має важливе значення, оскільки швидке й повноцінне відновлення цілісності кісткової тканини впливає на можливість проведення подальшого багатокомпонентного тривалого лікування онкологічних хворих.

Значна кількість сучасних наукових досліджень спрямована на вивчення особливостей фізіологічної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів, проте питання репаративного остеогенезу при застосуванні хіміотерапії є маловивченим у наш час.

Зважаючи на вищезазначене, метою нашого дослідження стало вивчення морфологічних особливостей репаративної регенерації кісткової тканини саме в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів при виключенні впливу самого онкологічного захворювання.

У представленому дослідженні застосовували ті хіміопрепарати, які найчастіше використовують у схемах протипухлинної хіміотерапії для лікування онкологічних пацієнтів із кістковими ускладненнями з застосуванням дози зазначених ліків, необхідної для проведення курсу цієї терапії, а саме доксорубіцин (60 мг/м^2), 5-фторурацил (600 мг/м^2) та метотрексат (40 мг/м^2).

Вивчення морфологічних особливостей репаративного остеогенезу проводили в усіх щурів контрольної (без застосування протипухлинних хіміопрепаратів) та трьох експериментальних групах на 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після моделювання дефекту в середній третині діафіза стегнових кісток. Тваринам I групи застосовували доксорубіцин, II групи – 5-фторурацил, III групи – метотрексат. Відповідні протипухлинні хіміопрепарати вводили внутрішньовенно відразу після нанесення травми з подальшим повторним їх призначенням через кожну 21 добу експерименту (після травми, на 21-шу добу, на 42-гу добу).

Проводили вивчення гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином з подальшою їх морфометрією, растрову електронну мікроскопію з методом рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії, імуногістохімічне дослідження, дослідження за допомогою комп'ютерної томографії та визначали біомеханічні властивості травмованих стегнових кісток.

У результаті проведеного експерименту при гістологічному дослідженні було встановлено, що у тварин усіх експериментальних груп на 15-ту добу експерименту в ділянці дефекту порівняно з контролем відмічалось збільшення площі сполучної та зменшення ретикулофіброзної тканин. Так, площа ретикулофіброзної кісткової тканини була нижчою від показників контролю в I групі на 15,42 % ($p = 0,006$), у II – на 5,63 % ($p = 0,33$), у III – на 8,29 % ($p = 0,04$) (рис. 4.1). Ретикулофіброзна тканина була представлена дрібнопетлястими кістковими трабекулами, які порівняно з материнською кісткою були забарвлені нерівномірно та менш інтенсивно,

що свідчить про початок осифікації. Міжтрабекулярний простір заповнений сполучною тканиною та кістковим мозком. Межа між краями дефекту й регенератом чітко візуалізована.

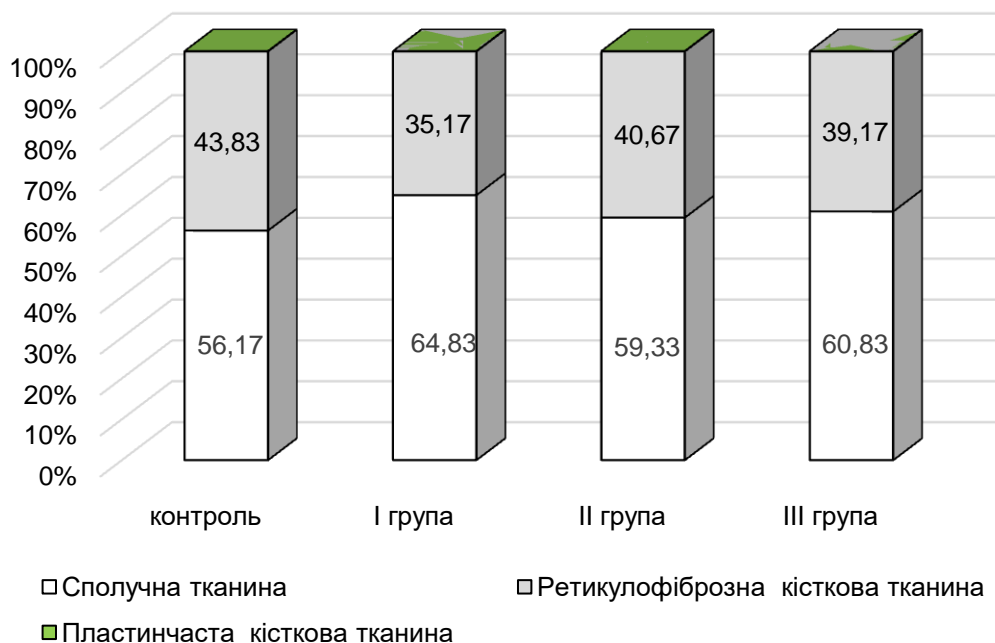


Рисунок 4.1 – Розподіл тканини в ділянці кісткового дефекту на 15-ту добу експерименту в контрольній та I, II, III експериментальних групах

На 30-ту добу дослідження в регенераті тварин експериментальних груп простежувалася подальша тенденція до збільшення площі сполучної тканини та зменшення площі новоутвореної ретикулофіброзної тканини порівняно з контролем. Так, у I групі ретикулофіброзна тканина займала в дефекті $19,50 \pm 3,99$ %, в II групі – $20,17 \pm 3,19$ %, в III – $25,67 \pm 4,13$ %, що на $32,36$ ($p = 0,002$), $30,04$ % ($p = 0,75$) та $10,96$ % ($p = 0,21$) нижче від показників контрольної групи. Формування остенів на периферії регенерату свідчило про початок перебудови ретикулофіброзної кісткової тканини в пластинчасту, однак темпи ремоделювання в регенераті були сповільнені. Зменшення частки пластинчастої тканини у I групі становило $49,66$ % ($p = 0,0004$), у II групі – $26,25$ % ($p = 0,01$), у III – $38,30$ % ($p = 0,003$) порівняно з контролем (рис. 4.2). Між регенератом й материнською кісткою

зберігався вільний простір на відміну від контрольної групи, де спостерігалось формування ліній склеювання між зазначеними структурами травмованої кістки.

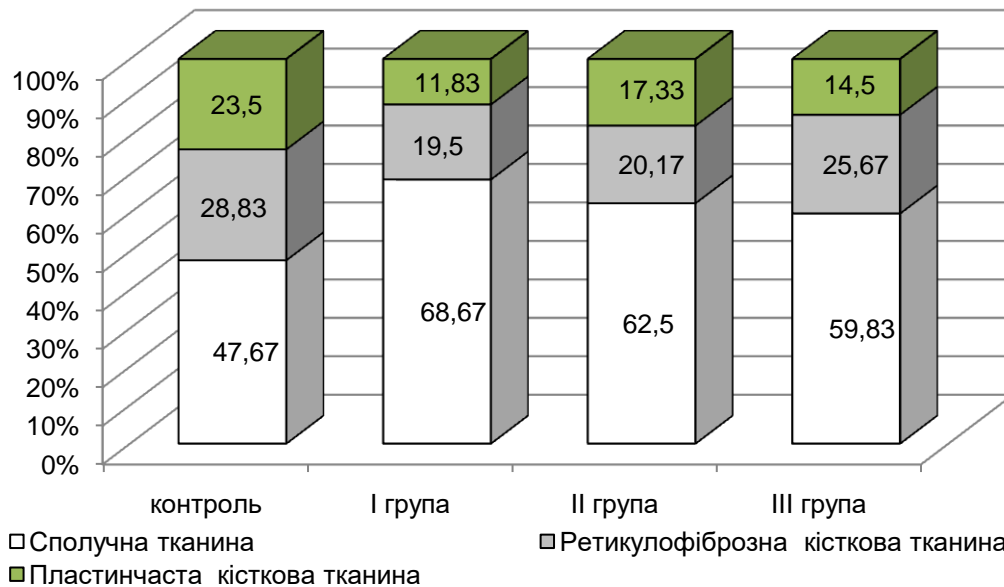


Рисунок 4.2 – Розподіл тканини в ділянці кісткового дефекту на 30-ту добу експерименту в контрольній та I, II, III експериментальних групах

На 45-ту добу експерименту у тварин контрольної групи в ділянці регенерату відмічали подальше збільшення площі кісткової тканини в межах $67,00 \pm 4,50$ %. Новоутворена кісткова тканина представлена була переважно пластинчастим типом ($48,50 \pm 3,39$ %). Проте у тварин експериментальних груп встановлена затримка формування регенерату, що проявлялося порушенням тканинних співвідношень у зоні дефекту. Так, у I групі площа новоутвореної кісткової тканини становила $47,50 \pm 3,63$ %, в II групі – $61,50 \pm 4,56$ %, в III – $45,33 \pm 4,01$ %, що на 29,10 % ($p = 0,05$), 8,21 % ($p = 0,64$) та 32,34 % ($p = 0,03$) нижче від показників контролю (рис. 4.3). Регенерат був представлений переважно дрібнопетлястими трабекулами з неоднорідно забарвленим матриксом. Більшість трабекул тонкі, зі щілинами й тріщинами, розміщені в хаотичному порядку без відповідності лініям навантаження. Відмічалася затримка формування пластинчастої тканини, розміщеної переважно на периферії регенерату і представленої остеонами різного

ступеня зрілості. На межі регенерату і материнської кістки місцями простежувалася поява ліній з'єднань між ними, але їх формування є менш вираженим, ніж у контрольній групі.

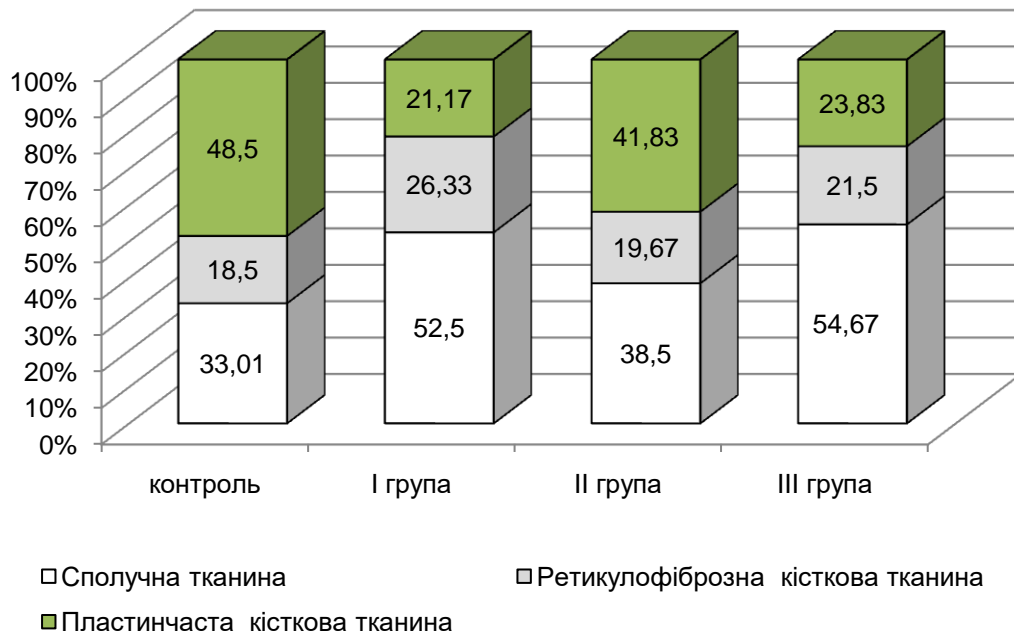


Рисунок 4.3 – Розподіл тканини в ділянці кісткового дефекту на 45-ту добу експерименту в контрольній та I, II, III експериментальних групах

60-та доба експерименту у тварин контрольної групи характеризувалася формуванням повноцінного кісткового регенерату, представленого кістковою тканиною площею $92,5 \pm 4,53$ %. Вона на $81,33 \pm 4,17$ % складалася з пластинчастої кісткової тканини з остеонами різного ступеня зрілості й на $11,17 \pm 4,17$ % з ретикулофіброзної кісткової тканини. В експериментальних групах тварин у ділянці дефекту відмічалось збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканин поряд із повільним формуванням пластинчастої кісткової тканини, розміщеної переважно на периферії дефекту. Так, у I групі новоутворена кісткова тканина займала $71,50 \pm 4,52$ % площі регенерату, в II групі – $87,00 \pm 4,89$ %, в III – $78,33 \pm 3,54$ %, що на 22,70 % ($p = 0,34$), 5,94 % ($p = 0,84$) та на 15,31 % ($p = 0,57$) менше від показників контрольної групи. Водночас пластинчаста тканина становила в I групі $41,00 \pm 3,46$ % площі дефекту, в II групі – $72,33 \pm 4,63$ %

в III – $59,50 \pm 3,27$ %, що на $49,59$ % ($p < 0,0001$), $11,07$ % ($p = 0,008$) та $26,84$ % ($p < 0,0001$) нижче показників контролю. Між регенератом та материнською кісткою місцями був помітний вільний простір з невеликою кількістю ділянок з'єднань між ними (рис. 4.4).

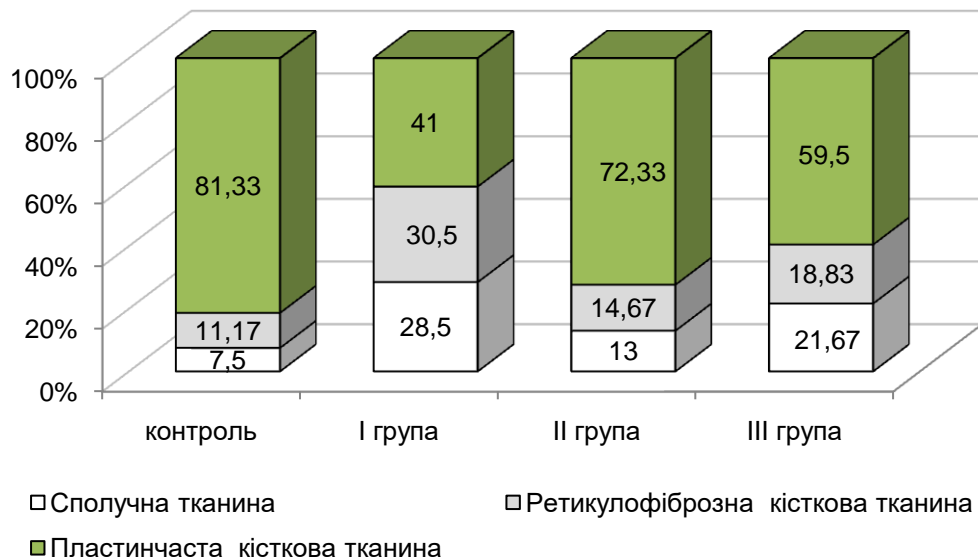


Рисунок 4.4 – Розподіл тканини в ділянці кісткового дефекту на 60-ту добу експерименту в контрольній та I, II, III експериментальних групах

Таким чином, у результаті гістологічного аналізу встановлено, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів викликає сповільнення темпів перебудови тканин у регенераті. Це проявляється на ранніх етапах репаративного остеогенезу збільшенням площі сполучної тканини в регенераті, сповільненим формуванням ретикулофіброзної кісткової тканини з подальшою затримкою її перебудови в пластинчасту тканину на пізніх етапах. Зокрема, найбільш негативний вплив на темпи перебудови серед усіх експериментальних груп відмічався при застосуванні доксорубіцину та 5-фторурацилу. При застосуванні усіх груп протипухлинних хіміопрепаратів спостерігали затримку формування міцних з'єднань між регенератом та материнською кісткою [228].

Отримані результати експерименту співпадають з висновками робіт Nadji P. (2015), яка дослідила, що протипухлинна хіміотерапія призводить до

втрати кісткової маси, зумовленої нездатністю остеобластів утворювати достатню кількість кісткової тканини, щоб компенсувати посилену остеокластичну резорбцію кістки [229]. Зокрема, Rana T. та співавтори (2013) в експерименті на мишах установили, що лікування доксорубіцином викликає зростання циркулюючого рівня трансформуючого фактору росту бета (TGF β), який сприяє остеолітичному пошкодженню кісток [230]. Також Pountos I. та співавтори (2017) дослідили, що метотрексат у високих дозах, які призначають для лікування онкологічних захворювань, сповільнює загоєння перелому кісток, пригнічуючи проліферацію фібробластів та індукцію їх апоптозу. Він також знижує вироблення колагену й одночасно збільшує рівні матричних металопротеїназ, що беруть участь у розщепленні позаклітинного матриксу. Проте застосування низьких доз метотрексату при лікуванні ревматологічних та шкірних захворювань не виявляє інгібуючого впливу на процеси репаративної регенерації [231].

У нашому дослідженні для оцінки темпів та активності процесів репаративного остеогенезу ми використовували імуногістохімічні маркери кісткового метаболізму: маркер кісткової резорбції катепсин К та маркер кісткоутворення остеопонтин.

За результатами імуногістохімічного дослідження катепсину К встановлено, що у тварин експериментальних груп на 15-ту добу експерименту експресія цього маркера в I групі становила $33,17 \pm 1,94$ % імуноактивних клітин, у II – $32,67 \pm 1,63$ % клітин, у III – $33,83 \pm 1,47$ % клітин, що на 7,00 % ($p = 0,04$), 5,38 % ($p = 0,07$) та 9,13 % ($p = 0,005$) вище від показників контролю (Рисунок 4.5). Інтенсивність забарвлення цитоплазми визначали як високу (+++). Це свідчить про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату при дії протипухлинних хіміопрепаратів.

Однак активність маркера остеопонтину у тварин експериментальних груп в ділянці регенерату була слабовираженою порівняно з контролем ($18,17 \pm 1,47$ %) і становила у I групі $14,17 \pm 1,17$ %, у II групі – $15,83 \pm 1,17$

%, у III – $14,83 \pm 1,17$ %, що на $22,01$ % ($p = 0,0003$), $12,87$ % ($p = 0,01$) та $18,38$ % ($p = 0,001$) нижче показників контрольної групи (рис. 4.6). Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин була низькою. Отже, протипухлинні хіміопрепарати сповільнюють темпи диференціювання клітинних елементів у регенераті з подальшою затримкою формування ретикулофіброзної кісткової тканини.

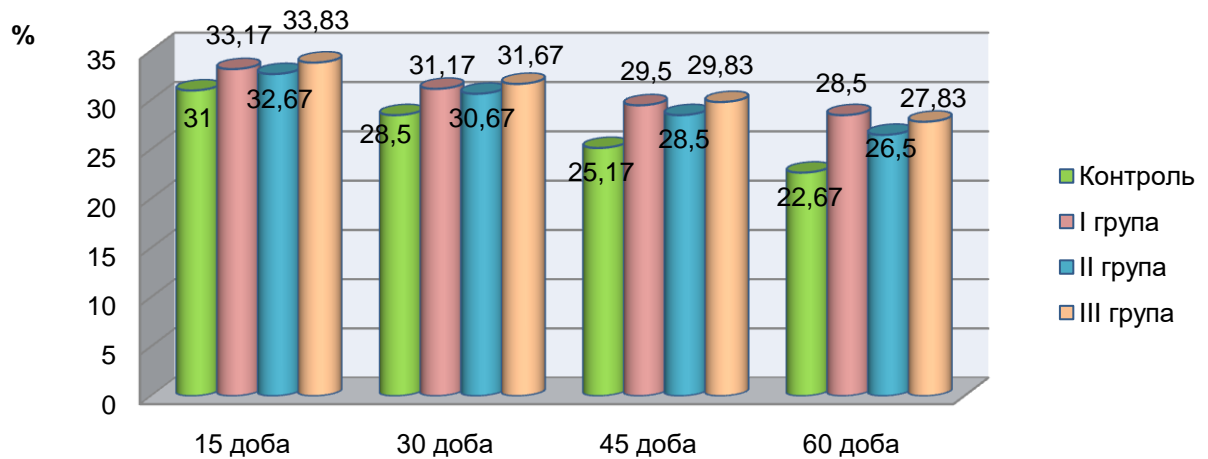


Рисунок 4.5 – Динаміка змін рівня експресії катепсину К у контрольній та експериментальних (I, II, III) групах тварин упродовж експерименту

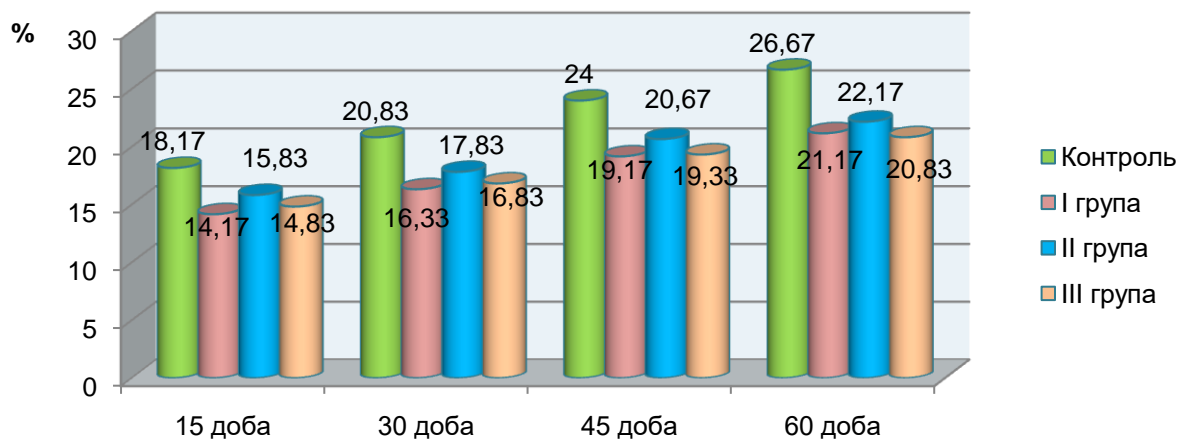


Рисунок 4.6 Динаміка змін рівня експресії остеопонтину у контрольній та експериментальних (I, II, III) групах тварин упродовж експерименту.

На 30-ту добу дослідження в контрольній групі тварин у ділянці регенерату відмічалось зниження активності експресії катепсину К на $8,06$ %

($p = 0,02$) порівняно з попереднім терміном експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++)). Отримані дані вказують на зниження інтенсивності процесів резорбції в кістковому регенераті.

Однак при дії протипухлинних хіміопрепаратів відмічалось, навпаки, зростання рівня експресії катепсину К, про що свідчили його показники в І групі на рівні $31,17 \pm 1,47$ %, в II – $30,67 \pm 1,37$ %, в III – $31,67 \pm 1,75$ %, що на $9,37$ % ($p = 0,02$), $7,61$ % ($p = 0,04$) та $11,12$ % ($p = 0,01$) вище за відповідні показники контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалася високою (+++).

На 30-ту добу дослідження в контрольній групі спостерігалася подальша тенденція до зростання експресії остеопонтину в межах $20,83 \pm 1,17$ % імуноактивних клітин. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була низькою (+). За нашими даними, це свідчить про початок мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в ділянці дефекту. Проте в усіх експериментальних групах лише окремі кісткові клітини, розміщені переважно на периферії регенерату, виявляли імунореактивність. Водночас рівень експресії остеопонтину в ділянці регенерату становив у І групі $17,33 \pm 1,21$ %, у II групі – $18,50 \pm 1,05$ %, у III – $17,50 \pm 1,05$ %, що на $16,80$ % ($p < 0,05$), $11,19$ % ($p < 0,05$) та $15,98$ % ($p < 0,05$) нижче від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми була низькою.

Отже, підвищення активності експресії катепсину К та зниження експресії остеопонтину свідчили про активацію процесів резорбції й зниження кісткоутворення в регенераті, що призводило до сповільненого формування ретикулофіброзної кісткової тканини в регенераті та подальшої її перебудови в пластинчасту кісткову тканину, а також низької мінералізації новоутвореного органічного матриксу.

На 45-ту добу експерименту в контрольній групі встановлене подальше зниження експресії катепсину К. Він виявлявся у $25,17 \pm 1,47$ % імунопозитивних клітин, що на $18,81$ % ($p < 0,05$) менше, ніж на початку дослідження. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як

низьку (+). Показник експресії остеопонтину виявляється у $24,00 \pm 1,41$ % клітин, що на $13,21$ % ($p = 0,002$) більше за попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною. Одержані дані імуногістохімічного дослідження у вигляді зниження активності експресії катепсину К та, навпаки, зростання експресії остеопонтину свідчили про переваження процесів формування кісткової тканини в ділянці дефекту над процесами резорбції та зростання інтенсивності процесів мінералізації в регенераті.

У тварин експериментальних груп на 45-ту добу експерименту маркер катепсину К виявлявся в I групі у $29,50 \pm 1,87$ % клітин, у II групі – у $28,50 \pm 1,05$ %, у III – $29,83 \pm 1,47$ %, що на $17,20$ % ($p = 0,0012$), $13,23$ % ($p = 0,0011$) та $18,50$ % ($p = 0,0002$) вище від показників контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів була помірною (++)). Водночас встановлене незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який у I групі виявлявся у $19,17 \pm 1,47$ % імуноактивних клітин, у II групі – у $21,67 \pm 1,21$ %, у III – у $19,33 \pm 1,63$ %, що на $14,81$ % ($p = 0,003$), $13,74$ % ($p = 0,002$) та $12,93$ % ($p = 0,019$) більше, ніж на 30-ту добу після перелому й на $20,13$ % ($p = 0,0001$), $13,87$ % ($p = 0,0001$) та $19,46$ % ($p = 0,0003$) менше, ніж у контрольній групі. Імунопозитивні клітини зосереджені переважно по краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми їх залишалася низькою. Таким чином, у тварин експериментальних груп відмічалася затримка формування кісткової мозолі та зниження її мінералізації.

На 60-ту добу експерименту у тварин контрольної групи експресія катепсину К відмічалася у $22,67 \pm 1,63$ % клітин кісткового регенерату, що на $9,93$ % менше ($p = 0,02$) за попередній термін експерименту та на $26,84$ % менше ($p < 0,05$), ніж на 15-ту добу після перелому. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як низьку (+). Це свідчило про активацію процесів проліферації в новоутвореному регенераті. Поряд із цим, спостерігалася подальше зростання експресії остеопонтину в регенераті на рівні $26,67 \pm 1,21$ % клітин, що на $11,12$ % ($p = 0,006$) більше за попередній

термін експерименту та на 46,78 % ($p < 0,05$) більше, ніж на початку експерименту. Одержані дані є підтвердженням подальшої активної мінералізації органічного матриксу в кістковій мозолі.

У тварин експериментальних груп на 60-ту добу експерименту експресія катепсину К у I групі становила $28,50 \pm 1,87$ % імунопозитивних клітин, у II групі – $26,67 \pm 1,63$ %, у III – $27,83 \pm 1,17$ %. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++)). Відмічалось зниження активності цього маркера порівняно з попереднім терміном дослідження в усіх експериментальних групах, але його рівень експресії був вищим, ніж у контролі на 25,72 % ($p < 0,05$), 17,64 % ($p < 0,05$) та 22,76 % ($p < 0,05$) відповідно, що свідчить про посилену резорбцію кісткової тканини в ділянці регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. Це відповідає даним Raghu Nadhanan R. та співавторів (2012), які дослідили, що лікування 5-фторурацилом спричиняє експресію цитокіну фактору некрозу пухлин-альфа (TNF α). Він активує рецептор маркера остеокластів ядерний фактор NF- κ B і, отже, стимулює остеокластогенез, що призводить до посиленої втрати кісткової тканини під час проведення протипухлинної хіміотерапії [232].

Поряд із цим встановлено зростання рівня експресії остеопонтину. Так, експресія остеопонтину в I групі становила $21,17 \pm 1,47$ %, в II групі – $22,17 \pm 1,47$ %, в III групі – $20,83 \pm 1,17$ %. Проте це відповідно на 20,62 % ($p < 0,05$), 18,87 % ($p < 0,05$) та 21,89 % ($p < 0,05$) нижче від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин визначали як помірну. Одержані дані підтверджують результати робіт Fan C., Georgiou K. R. (2017), в яких досліджено, що хіміотерапія доксорубіцином спричиняє зменшення утворення кісткової маси внаслідок пригнічення проліферації, диференціювання та мінералізації остеобластів і стимулює опосередковану остеокластами резорбцію кісткової тканини [233].

Отже, за результатами імуногістохімічного дослідження, застосування протипухлинних хіміопрепаратів призводить до посилення процесів

резорбції кісткової тканини та зниження інтенсивності її формування та мінералізації. Зокрема, найбільш негативний вплив на стан кісткового метаболізму серед усіх експериментальних груп відмічався при застосуванні доксорубіцину та метотрексату. Застосування доксорубіцину призвело до затримки формування кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини та значного сповільнення їх перебудови у пластинчасту тканину. Метотрексат спричиняв формування великої кількості мікротріщин та розривів у тонкостінних балках новоутвореної кісткової тканини.

У нашому дослідженні, за результатами растрової електронної мікроскопії, встановлений інгібуючий вплив протипухлинних хіміопрепаратів на процеси репаративного остеогенезу. Зокрема, аналіз сканограм на 15-ту добу експерименту свідчив про переважання в регенераті сполучної тканини, розташованої в центрі дефекту, наявність витончених новоутворених кісткових трабекул по краям регенерату з широкими міжбалковими просторами та відсутність тісних контактів між регенератом і материнською кісткою. На 30-ту добу експерименту більша частина регенерату була представлена дрібнопетлястими, хаотично розташованими балками грубоволокнистої кісткової тканини з незначними ділянками пластинчастої кісткової тканини переважно на периферії. На 45-ту добу більша частина регенерату була представлена ретикулофіброзною кістковою тканиною, відмічалася затримка її перебудови в пластинчасту тканину, що розташована була переважно по краям дефекту. На 60-ту добу експерименту в регенераті спостерігали сповільнене формування пластинчастої тканини, наявність ділянок витончених кісткових балок та міжбалкових просторів, заповнених сполучною тканиною. Установлено відсутність тісних контактів між регенератом та материнською кісткою. Таким чином, застосування протипухлинних хіміопрепаратів спричиняє затримку утворення кісткової мозолі у вигляді зниження темпів диференціювання клітинних елементів у ділянці новоутвореного регенерату з подальшим сповільненим формуванням ретикулофіброзної кісткової тканини та затримкою її перебудовою в

пластинчасту кісткову тканину. Зокрема, найбільший інгібуєчий вплив на темпи перебудови серед усіх експериментальних груп встановлений при застосуванні доксорубіцину та метотрексату.

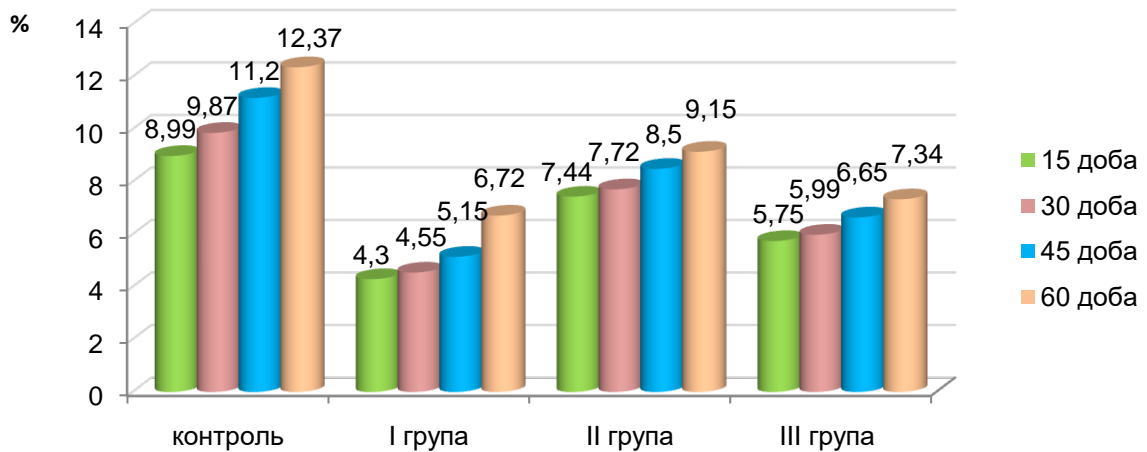
За допомогою зондового мікроаналізу встановлено, що у тварин контрольної групи впродовж експерименту відмічалася позитивна динаміка зростання рівнів Са й Р в ділянці новоутвореного регенерату, що свідчило про активні процеси мінералізації. Отримані дані експериментального дослідження підтверджують праці Hernandez-Veserra E. та співавторів, у яких на щурах лінії Вінстар, починаючи з 3-го тижня життя і до 7 місяців встановлене поступове зростання рівнів кальцію та фосфору, що корелює з поступовим зростанням рівня мінеральної щільності кісткової тканини, який визначався на рівні шийки стегнової кістки [234].

В експериментальних групах на 15-ту добу експерименту в ділянці новоутвореного регенерату рівні Са й Р були нижчими за показники контролю в I групі на 52,17 % ($p < 0,05$) і 34,88 % ($p < 0,05$) відповідно, в II групі – на 17,24 % ($p < 0,05$) і 3,48 % ($p = 0,15$), в III групі – на 36,04 % ($p < 0,05$) і 21,16 % ($p < 0,05$). Також відмічалася зниження рівнів Са й Р порівняно з контролем на поверхні материнської кістки, що прилягала до регенерату: в I групі – на 14,79 % ($p < 0,05$) та 24,52 % ($p < 0,05$) відповідно, в II групі – на 18,52 % ($p < 0,05$) та 22,60 % ($p < 0,05$), в III групі – на 22,24 % ($p < 0,05$) та 13,64 % ($p < 0,05$) (рис. 4.7 А, Б). На межі регенерату й материнської кістки рівень цих макроелементів також був нижчим за показники контролю, що пов'язано, на нашу думку, з активацією процесів реорганізації в ділянці новоутвореного кісткового регенерату та використанням ендогенного Са для його осифікації. Таким чином, одержані дані мікроаналізу на 15-ту добу експерименту в усіх експериментальних групах свідчать про зниження інтенсивності мінералізації як у регенераті, так і в материнській кістці у відповідь на травму.

Упродовж усього експерименту встановлено поступове зростання рівнів Са й Р як на поверхні регенерату, так і в ділянках материнської кістки,

що прилягала до нього, проте вони були меншими за аналогічні показники контрольної групи. Так, на 30-ту добу в ділянці дефекту показники Са й Р у I групі були нижчими на 53,90 % ($p < 0,05$) та 37,91 % ($p < 0,05$) відповідно за дані контролю, в II групі – на 21,78 % ($p < 0,05$) та 10,62 % ($p < 0,05$), у III – на 39,31 % ($p < 0,05$) та 23,96 % ($p < 0,05$).

Експеримент (А)



Експеримент (Б)

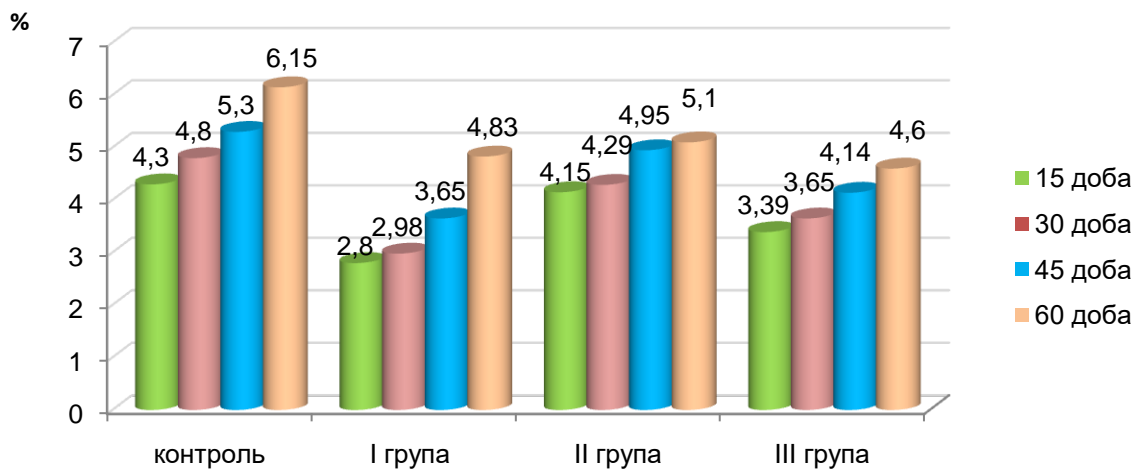


Рисунок 4.7 – Динаміка змін показників рівнів кальцію (А) та фосфору (Б) у кістковому дефекті в контрольній та експериментальних групах (I, II, III) впродовж експерименту

Зберігалася тенденція до подальшого зниження рівня Са і Р в материнській кістці порівняно з попереднім терміном експерименту: у I групі

– на 3,06 % ($p < 0,005$) і 4,26 % ($p < 0,05$), у II групі – на 3,86% ($p < 0,005$) і 5,05 % ($p < 0,05$), у III групі – на 3,87% ($p < 0,05$) і 3,73 % ($p < 0,05$) відповідно.

На 45-у добу зниження рівня Са й Р в ділянці дефекту порівняно з контролем становило в I групі 54,02 % ($p < 0,05$) та 31,13% ($p < 0,05$), в II групі – 24,11 % ($p < 0,05$) та 6,60 % ($p < 0,05$), в III групі – 40,63 % ($p < 0,05$) та 21,87 % ($p < 0,05$) відповідно.

На 60-у добу експерименту в регенераті відмічалось зростання вмісту Са й Р порівняно з попереднім терміном, проте одержані показники були нижчими, ніж у контролі: в I групі – на 45,68 % ($p < 0,05$) та 21,46 % ($p < 0,05$), у II групі – на 26,03 % ($p < 0,05$) та 17,07 % ($p < 0,05$), у III групі – на 40,66 % ($p < 0,05$) та 25,20 % ($p < 0,05$). Також на відміну від попередніх термінів у материнській кістці та ділянках, прилеглих до регенерату, відмічалось поступове зростання рівня цих макроелементів у межах 1 – 2 % ($p < 0,05$), але їх рівень був нижчим, ніж у контролі: в I групі – на 15,60 % ($p < 0,05$) та 18,58 % ($p < 0,05$), в II групі – на 20,45 % ($p < 0,05$) та 17,33 % ($p < 0,05$), в III групі – на 22,24 % ($p < 0,05$) та 14,59 % ($p < 0,05$). Таким чином, за умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів спостерігалось зниження інтенсивності процесів мінералізації в ділянці новоутвореного регенерату та ремоделюючої активності материнської кістки, прилеглої до нього як результат компенсаторної реакції у відповідь на травму [235].

Отримані нами результати підтверджують праці Calciolari E., Mardas N. та співавторів, які в експериментальному дослідженні на щурах установили, що зниження кальцію в новосформованій кістці через 30 діб у тварин призводить до зменшеного утворення кісткової тканини та до нижчої її якості, що виражалось зниженням дозрівання кісток [236].

Також, Robin F. та співавтори (2021) дослідили, що хіміотерапія метотрексатом негативно впливає на кістковий метаболізм, а саме спричиняє зниження мінеральної щільності кісткової тканини. Це зумовлено

зменшенням кількості остеобластів, остеоцитів і хондроцитів у ростовій пластинці та збільшенням кількості й активності остеобластів [237].

За результатами КТ-дослідження у тварин контрольної групи терміни репаративної регенерації кісток не були порушені. У період із 45-ї до 60-ї доби, за даними КТ, візуально відмічалася повна консолідація переломів стегнових кісток. Кісткова мозоль з вираженими періостальними та ендостальними нашаруваннями повністю заповнювала дефект стегнової кістки. Проте, відмінність показників ОЩ регенерату та материнської кістки на 60-ту добу експерименту свідчить про незавершений процес перебудови кісткової тканини. Репаративний остеогенез не супроводжувався розвитком ускладнень.

В усіх експериментальних групах на фоні застосування протипухлинних хіміопрепаратів встановлено затримку формування кісткової мозолі. На 30-ту добу в ділянці травми візуалізувався дефект стегнової кістки без ознак консолідації. На 45-ту добу в ділянці перелому визначалася слабовиражена кісткова мозоль за рахунок ендостальних нашарувань. На 60-ту добу кісткова мозоль в ділянці дефекту була представлена помірно вираженими періостальними й ендостальними нашаруваннями, проте повної консолідації перелому не відмічалось.

Сповільнення процесів загоєння дефекту в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів підтверджують низькі показники ОЩ регенерату й материнської кістки порівняно з контрольною групою. Так, на 15-ту добу з моменту травми ОЩ в ділянці регенерату у тварин I експериментальної групи становила $444,30 \pm 31,94$ НУ, II групи – $503,50 \pm 17,75$ НУ, III групи – $398,00 \pm 30,58$ НУ, що на 45,51 % ($p < 0,001$), 28,40 % ($p < 0,001$) та 62,44 % ($p < 0,001$) нижче за відповідні дані контрольної групи (рис. 4.8). У I групі ОЩ МК у дистальній частині становила $1553,50 \pm 14,84$ НУ та $2287,00 \pm 30,25$ НУ у проксимальній частині, в II групі: $1378,50 \pm 21,18$ НУ у дистальній та $2029,50 \pm 33,22$ НУ у проксимальній частинах; у III групі: $1258,50 \pm 10,99$ НУ у дистальній, та

1983,00 ± 30,61 NU у проксимальній частинах. Одержані дані є нижчими за показники контрольної групи в дистальній частині МК на 19,04 % ($p < 0,0001$), 34,15 % ($p < 0,0001$) та 46,94 % ($p < 0,0001$); у проксимальній частині МК – на 7,69 % ($p < 0,0001$), 21,36 % ($p < 0,0001$) та 24,21 % ($p < 0,0001$) (рис. 4.9). Упродовж експерименту відмічалось поступове збільшення ОЩ як у ділянці регенерату, так і в материнській кістці, проте спостерігалось достовірне зниження зазначених показників порівняно з контрольною групою тварин. Так, на 60-ту добу з моменту травми ОЩ у тварин I експериментальної групи в ділянці регенерату становила 1353,00 ± 25,18 NU, II групи – 1655,00 ± 32,69 NU, III групи – 1551,00 ± 21,33 NU, що на 37,08 % ($p < 0,0001$), 23,02 % ($p < 0,0001$) та 27,86 % ($p < 0,0001$) нижче за відповідні дані контрольної групи. Також установлене у I, II, III групах зниження ОЩ в дистальній частині МК на 23,06 % ($p < 0,0001$), 28,05 % ($p < 0,0001$) та 22,75 % ($p < 0,0001$) та в проксимальній: на 22,57 % ($p < 0,0001$), 16,02 % ($p < 0,0001$) та 21,91 % ($p < 0,0001$) відповідно аналогічних показників контрольної групи (рис. 4.10).

Проведене КТ-дослідження свідчить про сповільнення процесів репаративної регенерації на фоні протипухлинної хіміотерапії.

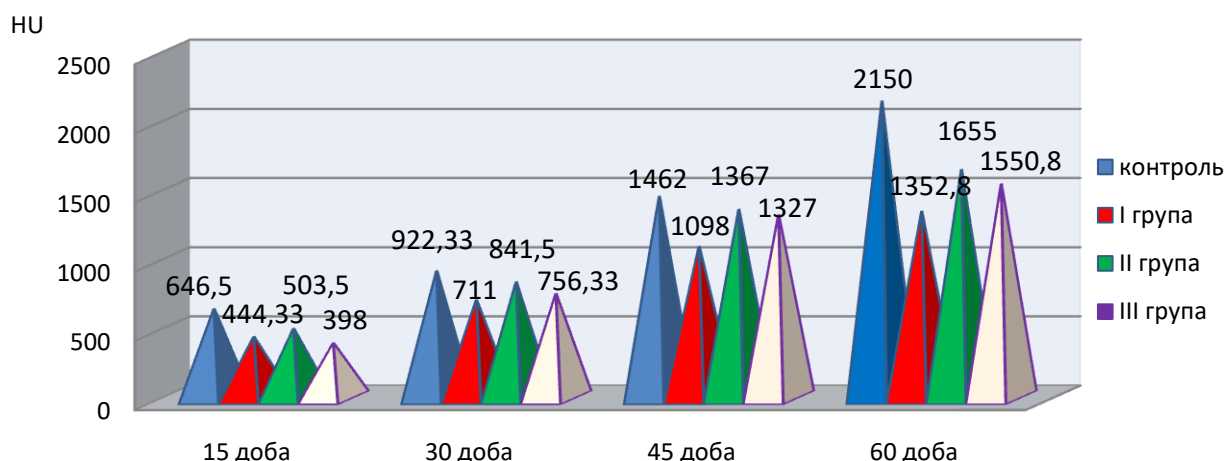


Рисунок 4.8 – Динаміка змін показників ОЩ ділянки кісткового дефекту в контрольній та I, II, III експериментальних групах упродовж експерименту

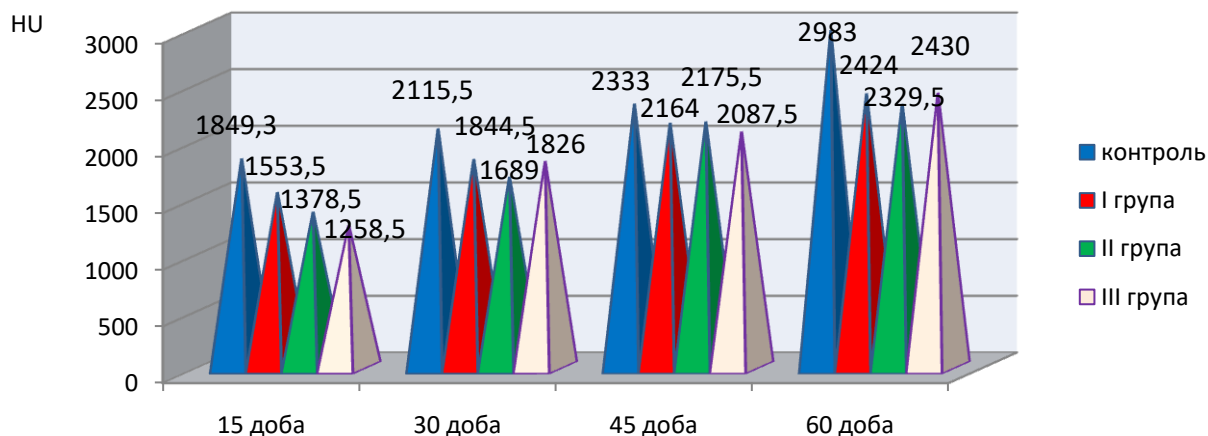


Рисунок 4.9 – Динаміка змін показників ОЩ ділянки кісткового дефекту в контрольній та I, II, III експериментальних групах упродовж експерименту

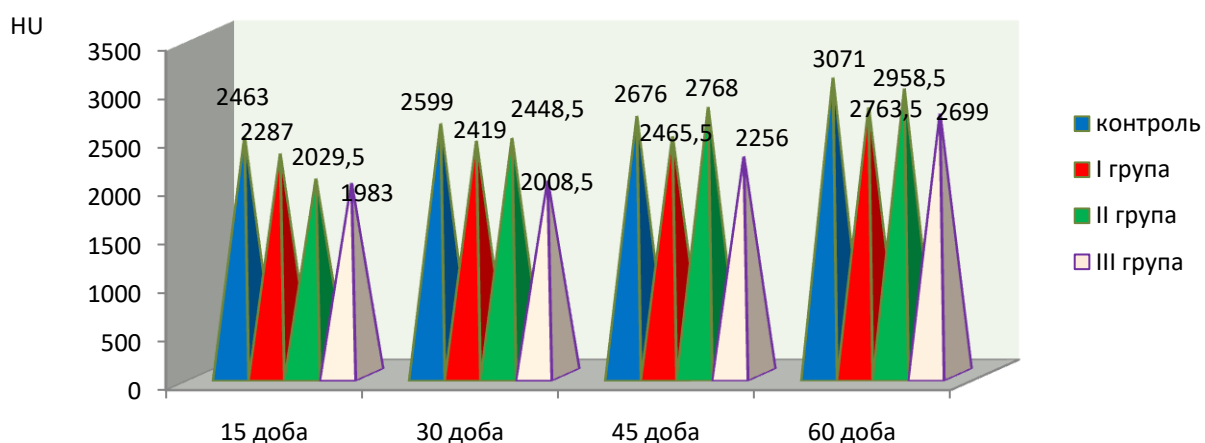


Рисунок 4.10 – Динаміка змін показників ОЩ у проксимальній частині МК в контрольній та I, II, III експериментальних групах упродовж експерименту

Таким чином, в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів відмічалось сповільнення процесів консолідації при загоєнні кісткового дефекту стегнової кістки, що проявлялось утворенням слабовираженої кісткової мозолі порівняно з контрольною групою тварин. Повільне зростання ОЩ в регенераті та материнській кістці свідчило про зниження

інтенсивності мінералізації в новоутвореній кістковій мозолі. Відмінність показників ОЩ в регенераті та материнській кістці вказує на незавершений репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту. Найбільш виражений негативний вплив на загоєння перелому мав доксорубіцин [238].

Під час дослідження механічних властивостей у контрольній групі тварин відмічалось поступове зростання межі міцності на стиск діяфізу стегнових кісток впродовж експерименту. Так, на 60-ту добу після травми цей показник становив $120,24 \pm 3,25$ МПа, що на 25,85 % ($p < 0,0001$) більше, ніж на 15-ту добу експерименту. Швидкість ремоделювання дефекту стегнової кістки повністю відповідала термінам репаративної регенерації кісткової тканини [239].

За умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів впродовж усього експерименту відмічалось поступове незначне зростання зазначеного показника. Так, на 60-ту добу після травми межа міцності на стиск діяфізу стегнових кісток визначалась у I групі в межах $87,17 \pm 4,89$ МПа, у II групі – $98,02 \pm 4,82$ МПа, у III групі – $91,92 \pm 2,91$ МПа, проте це на 37,94 % ($p < 0,0001$), 22,67 % ($p < 0,0001$) та 30,81 % ($p < 0,0001$) є нижчим за показники контролю (рис. 4.11).

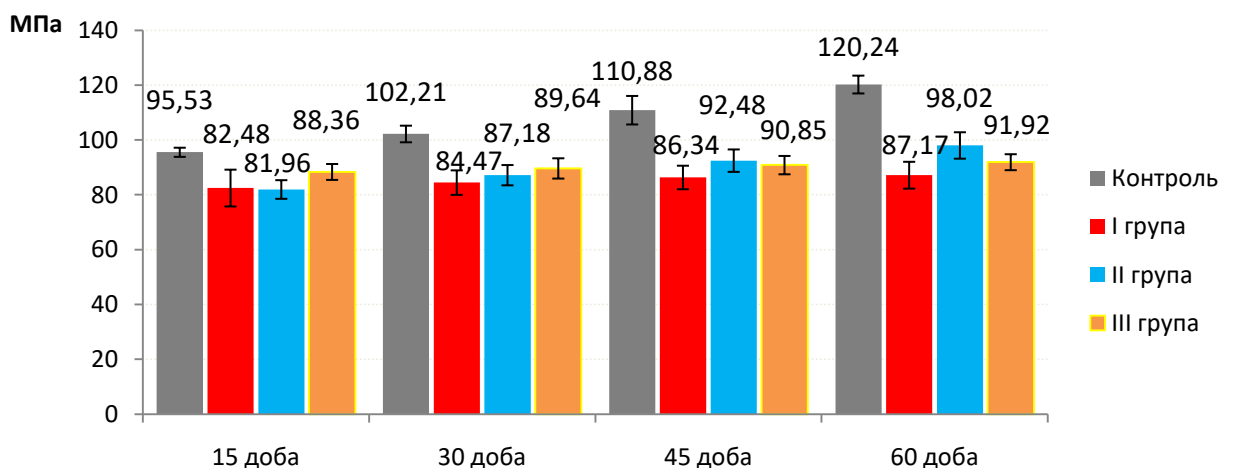


Рисунок 4.11 – Показники межі міцності на стиск діяфізу стегнової кістки щурів в умовах впливу хіміопрепаратів доксорубіцину (I група), 5-фторурацилу (II група), метотрексату (III група) порівняно з контрольною групою.

У експерименті встановлено зростання показника мікротвердості регенерату у тварин контрольної групи впродовж усього дослідження, що свідчить про активні процеси мінералізації в кістці та покращення її пружних властивостей. Так, на 60-ту добу експерименту зазначений показник становив $532,33 \pm 18,18$ МПа, що на 9,57 % ($p < 0,005$) більше, ніж на 15-у добу після травми.

Однак в усіх експериментальних групах на тлі поступового збільшення показника мікротвердості в регенераті з кожним наступним терміном репаративної регенерації відмічалось його зниження порівняно із контрольною групою. Так, на 60-ту добу після травми середнє значення показника мікротвердості у I групі становило $418,67 \pm 12,44$ МПа, у II групі – $468,83 \pm 18,57$ МПа, у III групі – $446,50 \pm 24,54$ МПа, що на 37,94 % ($p < 0,0001$), 22,67 % ($p < 0,0001$) та 30,81 % ($p < 0,0001$) менше за аналогічні показники контрольної групи (рис. 4.12).

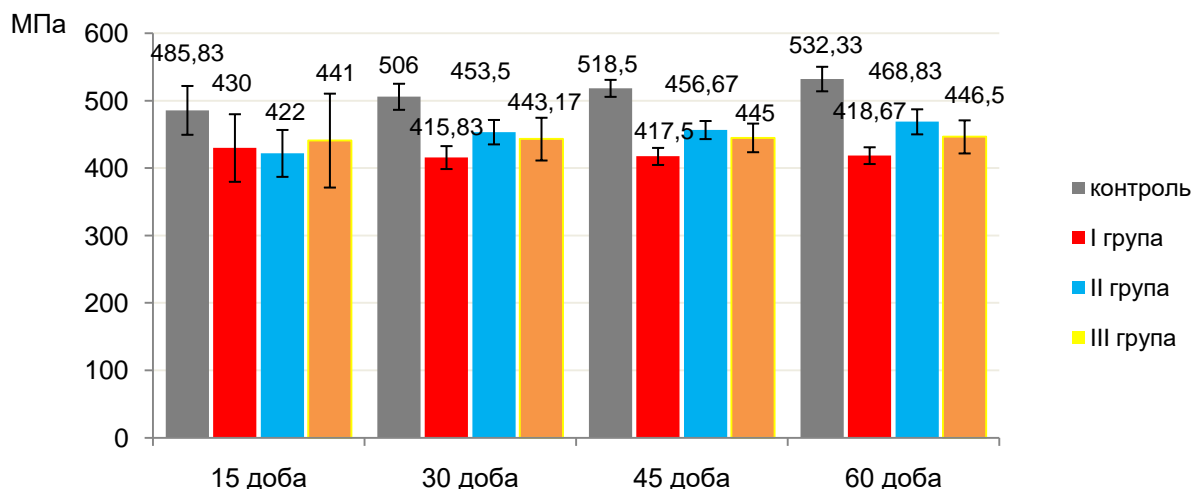


Рисунок 4.12 – Динаміка змін показників мікротвердості ділянки дефекту стегнової кістки щурів за умов впливу хіміопрепаратів – доксорубіцину (I група), 5-фторурацилу (II група), метотрексату (III група) порівняно з контрольною групою

Таким чином, в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів встановлено зниження межі міцності на стиск діяфізу травмованих стегнових кісток, що негативно впливає на механічні властивості довгих кісток скелета

в цілому, та зниження мікротвердості регенерату порівняно з контролем, що свідчить про уповільнене формування повноцінної кісткової мозолі в ділянці травми та затримку процесів мінералізації новоутвореного кісткового матриксу. Найбільш виражений негативний вплив мав доксорубіцин та метотрексат, найменший – 5-фторурацил [240].

Установлений у нашому дослідженні негативний вплив протипухлинних хіміопрепаратів на кістковий метаболізм підтверджують дослідження Handforth С., в яких доведено, що навіть одна доза цитотоксичної хіміотерапії призводить до значної та стійкої втрати кісткової тканини внаслідок посиленої резорбції кісток [241]. За результатами Quach J. та співавторів на 14-ту добу після одноразового введення протипухлинного хіміопрепарата (5-фторурацилу, циклофосфаміду) відмічається тимчасове збільшення кісткового обміну. Це зумовлено розвитком запальної реакції, опосередкованої такими цитокінами, як фактор некрозу пухлини-альфа, інтерлейкін-6, моноцитарний хемоаттракуючий білок-1. Унаслідок їх дії відбувається активація остеокластів. Таким чином, втрата кісткової маси в разі застосування протипухлинної хіміотерапії спричинена посиленою остеокластичною резорбцією кістки [242].

Зокрема, Straszkowski L. та співавтори встановили, що лікування доксорубіцином індукує трансформуючий фактор росту- β (TGF β), який збільшує диференціацію остеокластів і пригнічує диференціацію остеобластів. Це призводить до збільшення резорбції кісток та прискореної втрати кісткової тканини. Крім того, доксорубіцин безпосередньо впливає на вироблення кісткового матриксу остеобластами й зменшує об'єм остеоїдів, що сповільнює мінералізацію кісткового регенерату остеобластами порівняно з контролем та зумовлює зниження межі міцності при його застосуванні [243].

Наші результати експериментального дослідження підтверджують праці Tarasi Rana, в яких зазначено, що застосування доксорубіцину в дитячому віці призводить до тривалого пошкодження кісток у вигляді

підвищеного ризику переломів та затримки росту в дорослому віці. Автор зазначає, що в дослідженнях на тваринах експозиція доксорубіцину спричиняла 60 % зниження утворення кісток у щурів, що свідчить про зниження диференціації остеобластів. Також було встановлено, що доксорубіцин негативно впливав на мікроархітектуру, зменшуючи об'єм трабекулярної кістки та число трабекулярних тканин і збільшуючи поділ самих трабекул. Шкідливі наслідки лікування цим препаратом на мікроархітектуру трабекул були помітні як через 2, так і через 10 тижнів після останнього прийому. Це свідчить про те, що вплив доксорубіцину на трабекулярну кістку є тривалим [244].

У роботах Liu Y. та співавторів також встановлений негативний вплив хіміотерапії метотрексатом на кістки, що проявлявся пошкодженням метаепіфізарної пластини росту кісток, зменшенням товщини первинної спонгіози та зменшенням об'єму метафізарної кістки [245].

Під час дослідження мікротвердості ми встановили його поступове зростання в щурів контрольної групи із кожним наступним терміном експерименту. Це свідчить про активні процеси мінералізації в кістці та покращення її пружних властивостей у процесі репаративної регенерації [246].

Проте, в усіх експериментальних групах відмічалось поступове достовірне зниження показників зниження мікротвердості регенерату, що свідчило про уповільнення формування повноцінної кісткової мозолі в ділянці травми та затримку процесів мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в умовах застосування протипухлинних хіміопрепаратів. Зазначеним змінам біомеханічних характеристик відповідає поступове зниження процесу мінералізації кісток.

Наші результати підтверджують праці Fonseca H. та співавторів, у яких встановлено, що терапія доксорубіцином приводить до зменшення міцності кісток, що пов'язано з істотним зниженням активності мітохондрій, які у великій кількості містяться в остеобластах та остеокластах. Це порушує процеси кісткового ремоделювання, сповільнює утворення нової кісткової

тканини та її мінералізацію, порушує трабекулярну мікроархітектуру й ріст кісток. Також встановлено, що доксорубіцин зменшує нормальне розширення окістя, що відіграє вирішальну роль у здатності діафіза переносити навантаження при згинанні та перекруті. Отже, доксорубіцин виявляє тривалий негативний вплив на стійкість кісток до переломів [247].

Показаний у нашому експерименті інгібуючий вплив 5-фторурацилу на кісткову систему підтверджується працями Fan C., Georgiou K. R. Автори зазначають, що застосування цього хіміопрепарату призводить до втрати кісткової тканини внаслідок посиленої активності резорбції кісток. Це пов'язано зі збільшенням кількості остеокластів у метафазі та кількості ядер в остеобластах, що свідчить про підвищений резорбтивний потенціал після лікування 5-фторурацилом, сприяючи зниженню трабекулярного об'єму кістки. Установлено, що призначення 5-фторурацилу в дозі 150 мг/кг зменшує щільність остеобластів та преостеобластів, що значно знижує потенціал мінералізації кісткового матриксу. Зазначені зміни в регенерації кісткової тканини призводять до зниження мікротвердості кісток та сприяють виникненню переломів у пацієнтів під час проведення протипухлинної хіміотерапії [248].

Відзначений у нашому дослідженні негативний вплив метотрексату на механічні властивості кісток підтверджують праці Fan C. M., у яких встановлено, що тривале лікування високими дозами метотрексату пригнічує проліферацію остеобластів та преостеобластів, спричиняє зменшення їх щільності, що пов'язано з індукцією апоптозу остеобластів. Відомо, що саме кількість та активність остеобластів на поверхні трабекулярної кістки визначають і змінюють кількість, розмір та форму кісткових трабекул, впливаючи таким чином на кісткову масу й мікротвердість. Зокрема, при короткостроковому застосуванні метотрексату кісткові трабекули були меншими за кількістю і більше розділялися між собою, що відповідає результатам короткотермінового дослідження на щурах [249].

Результати досліджень Shandala T. показали, що лікування метотрексатом збільшує кількість остеокластів в 1,8 раза, що пов'язано з підвищеною експресією запальних цитокінів ІЛ-6 (у 10 разів) та ІЛ-11 (у 2 рази). Ці зміни призвели до активації остеокластогенезу з подальшою втратою близько 35 % трабекулярної кістки та зниженням мікротвердості кісткової тканини [250].

В іншому дослідженні, проведеному Georgiou K. R., King T. J. та співавторами, було встановлено, що інгібуючий вплив метотрексату зумовлений зниженням активації сигнального шляху Wnt/ β -катеніну. Це також призводить до пригнічення гемопоетичної, остеогенної, адипогенної та остеокластогенної диференціації кісткового мозку. Отже, хіміотерапія раку часто спричиняє втрату кісткової маси, ожиріння мозку та дефекти кровотворення [251]. Gawade P. L та співавтори у своїх працях зазначали, що пацієнти, які перенесли рак у дитинстві, перебувають у групі ризику пізніх наслідків щодо лікування, пов'язаних зі скелетною системою. Щонайменше через 2 роки після завершення хіміотерапії раку в дітей, підлітків або молодих осіб були виявлені пізні скелетні ефекти у вигляді низької мінеральної щільності кісток, остеонекрозу, онкогенного рахіту та порушення росту кісток [252].

Застосування протипухлинних хіміопрепаратів (доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату) негативно впливає на механічні властивості довгих трубчастих кісток, що проявляється зниженням показників межі міцності на стиск та мікротвердості кісткової тканини і за відповідних умов може бути розцінене як фактор ризику виникнення переломів у пацієнтів під час проведення протипухлинної хіміотерапії.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено вирішення актуального наукового завдання, присвяченого встановленню морфологічних змін репаративної регенерації довгої кістки скелета за умов дії на організм протипухлинних хіміопрепаратів.

1. Вплив на організм протипухлинної хіміотерапії призводить до сповільнення диференціювання клітинних елементів кісткового регенерату, затримки формування, реорганізації та ремоделювання його тканинспецифічних структур. На ранніх термінах репаративної регенерації встановлено збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканин поряд із затримкою формування пластинчастої тканини на пізніх термінах. На 60-ту добу після травми в умовах впливу доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату у регенераті спостерігалось зменшення площі новоутвореної кісткової тканини, зокрема, пластинчастої тканини – на 49,59 % ($p < 0,0001$), 11,07 % ($p = 0,008$) та 26,84 % ($p < 0,0001$) відповідно даних контрольної групи. Зміни у мікроархітектурі регенерату характеризувалися наявністю витончених, хаотично розташованих кісткових балок новоутвореної ретикулофіброзної кісткової тканини з широкими міжтрабекулярними просторами між ними, появою мікротріщин на їх поверхні, а також затримкою формування тісного контакту між регенератом та материнською кісткою. Найбільш виражений негативний вплив встановлений в умовах впливу доксорубіцину та метотрексату.

2. Дія на організм доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату майже однаково впливає на збільшення експресії катепсину К та зниження експресії остеопонтину в ділянці кісткового дефекту, що в першому випадку є однією з ознак посиленої резорбції кісткової тканини регенерату, а в другому – зниження темпу диференціювання остеобластів та інтенсивності мінералізації кісткового матриксу.

3. Протипухлинні препарати (доксорубіцин, 5-фторурацил та метотрексат) спричиняють зниження рівня кальцію та фосфору як в самому регенераті (на 45,67 % ($p < 0,0001$) та 27,33 % ($p < 0,0001$); 26,03 % ($p < 0,0001$) та 17,07 % ($p < 0,0001$); 40,66 % ($p < 0,0001$) та 25,20 % ($p < 0,0001$)), так і в материнській кістці (на 15,59 % ($p < 0,0001$) та 18,59 % ($p < 0,0001$); 20,45 % ($p < 0,005$) та 17,33 % ($p < 0,0001$); 22,25 % ($p < 0,05$) та 14,59 % ($p < 0,0001$)) на 60-ту добу експерименту, що свідчить про зниження інтенсивності мінералізації новоутвореного кісткового матриксу та сповільнення ремоделюючої активності материнської кістки. Найбільш виражений негативний вплив на мінеральний обмін встановлений у разі застосування доксорубіцину, менш виражений – при дії 5-фторурацилу.

4. Лікування протипухлинними хіміопрепаратами призводить до затримки формування кісткової мозолі, про що свідчать низькі показники оптичної щільності регенерату порівнянно з контрольною групою. Так, на 60-у добу експерименту зниження оптичної щільності в ділянці регенерату в умовах застосування доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату становило 37,08 % ($p < 0,0001$), 23,02 % ($p < 0,0001$) та 27,86 % ($p < 0,0001$) у порівнянні з контрольною групою. Найбільш виражений негативний вплив мав доксорубіцину та метотрексат.

5. За умов дії на організм доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату встановлено зниження мікротвердості кісткової тканини регенерату (на 21,47 % ($p < 0,05$), 11,93 % ($p < 0,05$), 16,12 % ($p < 0,05$)) та зменшення межі міцності на стиск діяфізу травмованої стегнової кістки (27,50 % ($p < 0,05$), 18,48% ($p < 0,05$) та 23,56 % ($p < 0,05$)) порівняно з аналогічними даними контрольної групи, що відмічалось на 60-ту добу після травми. Найбільших змін перераховані показники зазнали при дії на організм доксорубіцину та метотрексату, а найменших – за умов впливу 5-фторурацилу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Поворознюк ВВ, Бистрицька МА, Мусієнко АС. Остеопороз при злоякісних новоутвореннях. *Практична медицина*. 2018;2:101-9.
2. Ottanelli S. Prevention and treatment of bone fragility in cancer patient. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2015;12(2):116-129. DOI: 10.11138/ccmbm/2015.12.2.116
3. Macedo F, Ladeira K, Pinho F, Saraiva N, Bonito N, Pinto L, Gonçalves F. Bone metastases: an overview. *Oncology reviews*. 2017;11(1). DOI: 10.4081/oncol.2017.321
4. Whitburn J, Edwards CM. Metabolism in the Tumour-Bone Microenvironment. *Current Osteoporosis Reports*. 2021:1-6. DOI: 10.1007/s11914-021-00695-7
5. Sevimli R, Korkmaz MF. Analysis of orthopedic surgery of patients with metastatic bone tumors and pathological fractures. *Journal of International Medical Research*. 2018;46(8):3262-7. DOI: 10.1177%2F0300060518770958
6. Wysoczańska A, Ślęzak A, Barg E. Effects of oncological therapy on bone disorders. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. 2017;23(4): 197-203. DOI: 10.18544/PEDM-23.04.0093
7. Vyas D, Laput G, Vyas A. Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and Metastasis. *OncoTargets and Therapy*. 2014;7:1015. DOI: 10.2147/ott.s60114
8. Bedatsova L, Drake MT. The skeletal impact of cancer therapies. *British journal of clinical pharmacology*. 2019;85(6):1161-8. DOI: 10.1111/bcp.13866
9. Liu Z, Delavan B, Roberts R, Tong W. Lessons learned from 2 decades of anticancer drugs. *Trends in farmacological sciences*. 2017;38(10):852-72. DOI: 10.1016/j.tips.2017.06.005

10. Tsuzuki S, Park SH, Eber MR, Peters CM, Shiozawa Y. Skeletal complications in cancer patients with bone metastases. *International Journal of Urology*. 2016;23(10):825-32. DOI: 10.1111/iju.13170
11. Robin F, Cadiou S, Albert JD, Bart G, Coiffier G, Guggenbuhl P. Methotrexate osteopathy: five cases and systematic literature review. *Osteoporos Int*. 2021;32:225–32. DOI: 10.1007/s00198-020-05664-x
12. Straszkowski L, Jovic T, Castillo-Tandazo W, Ritchie DS, Purton LE. Effects of chemotherapy agents used to treat pediatric acute lymphoblastic leukemia patients on bone parameters and longitudinal growth of juvenile mice. *Experimental Hematology*. 2020. DOI: 10.1016/j.exphem.2020.01.010.
13. Rosen HN. Drugs that affect bone metabolism. *Website: Uptodate*. 2016.
14. Armiento AR, Hatt LP, Sanchez Rosenberg G, Thompson K, Stoddart MJ. Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. *Advanced Functional Materials*. 2020:1909874. DOI: 10.1002/adfm.201909874
15. Пикалюк ВС, Мостовой СО. Современные представления о биологии и функции костной ткани. *Таврический медико-биологический вестник*. 2006;9(3):186-94.
16. Okamoto K, Takayanagi H. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiological reviews*. 2017;97(4):1295-349. DOI: 10.1152/physrev.00036.2016
17. Betts DC, Müller R. Mechanical Regulation of Bone Regeneration: Theories, Models, and Experiments. *Frontiers in Endocrinology*. 2014;5. DOI: 10.3389/fendo.2014.00211
18. Якимьюк ДИ, Кривецкий ВВ, Банул БЮ, Кривецкий ИВ. Современные представления о росте, развитии и формообразовании костного скелета человека. *Буковинський медичний вісник*. 2013;66(2):181-5.
19. Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B et.al. Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-

tissue engineering scaffolds. *Bioactive materials*. 2021;6(11):4110-40. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2021.03.043

20. Попсуйшапка ОК, Літвішко ВО, Ашукіна НО. Клініко-морфологічні стадії процесу зрощення відламків кістки. *Ортопедія, травматологія і протезування*. 2015;1:12-9.

21. Рябенко ТВ. Сучасні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини та аналіз показників кісткового метаболізму. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020;3(25):89-97.

22. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8:133-43. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.1

23. Pivonka P, Dunstan CR. Role of mathematical modeling in bone fracture healing. *Bonekey Rep*. 2012;14(1):221. DOI: 10.1038/bonekey.2012.221.

24. Бруско АТ, Гайко ГВ. Современные представления о стадиях репаративной регенерации костной ткани при переломах. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2014;2:5-8.

25. Гайко ГВ, Бруско АТ. Теоретические аспекты физиологической и репаративной регенерации костей с позиций системных представлений. *Журнал НАМН України*. 2013;19(4):471-81.

26. Корж АА, Дедух НВ. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации (сообщение 1). *Ортопедія, травматологія і протезування*. 2006;1:84-90.

27. Горидова ЛД, Дедух НВ. Репаративная регенерация кости в различных условиях. *Травма*. 2009;10(1):88-91.

28. Дедух НВ, Пішовок ДМ, Малишкіна СВ. Моделювання та ремоделювання кістки. *Український морфологічний альманах*. 2014;12(1): 107-11.

29. Рубленко МВ, Семеняк СА, Андрієць ВГ. Молекулярно-біологічні механізми репаративного остеогенезу. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2017;2:11-20.

30. Григор'єв ВВ, Попсуйшапка ОК, Ашукіна НО, Галкін ФМ. Локалізація фактора росту ендотелію судин і трансформувального фактора росту- β в тканинах навколівідламкової зони після переломів довгих кісток кінцівок у людини. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2017;2:62-9.
31. Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, Alman BA. Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(6):1090-102. DOI: 10.1002/jbmr.2422
32. Попсуйшапка АК, Литвишко ВА, Ашукина НА, Данищук ЗН. Особенности формирования, структурно-механические свойства фибрин-кровяного сгустка и его значение для регенерации кости при переломе. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2013;4:5-12.
33. McArdle A, Marecic O, Tevlin R, Walmsley GG, Chan CK, Longaker MT, Wan DC. The role and regulation of osteoclasts in normal bone homeostasis and in response to injury. *Plastic and reconstructive surgery*. 2015;135(3):808-16. DOI: 10.1097/prs.0000000000000963
34. Ansari M. Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Prog Biomater*. 2019;8:223–37. DOI: 10.1007/s40204-019-00125-z
35. Sagalovsky S. Physiological role of growth factors and bone morphogenetic proteins in osteogenesis and bone fracture healing: a review. *Альманах клинической медицины*. 2015;38:113-26.
36. Sheen JR, Garla VV. Fracture Healing Overview. In: StatPearls. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL). 2021. PMID:31869142. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551678/>
37. Morgan EF, De Giacomo A, Gerstenfeld LC. Overview of skeletal repair (fracture healing and its assessment). *Methods Mol Biol*. 2014;1130:13-31. DOI: 10.1007/978-1-62703-989-5_2.
38. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *Clin Invest*. 2014;124(2):466-72.

39. Loebel C, Burdick JA. Engineering Stem and Stromal Cell Therapies for Musculoskeletal Tissue Repair. *Cell Stem Cell*. 2018;22(3):325-39. DOI: 10.1016/j.stem.2018.01.014
40. Zupan J, Tang D, Oreffo RO, Redl H, Marolt Presen D. Bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells: from basic biology to applications in bone tissue engineering and bone regeneration. *Cell Engineering and Regeneration*. 2020:139-192. DOI: 10.1007/978-3-319-08831-0_7.
41. Ono T, Takayanagi H. Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15:367-75. DOI: 10.1007/s11914-017-0381-0
42. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffuli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies and future directions. *J Ortho Surg Res*. 2014;9(1):18. DOI: 10.1186/1749-799X-9-18.
43. Grayson W, Bunnell B, Martin E, Frazier T, Hung BP, Gimble JM. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(3):140–50. DOI: 10.1038/nrendo.2014.234
44. Suskin J, Shapiro CL. Osteoporosis and musculoskeletal complications related to therapy of breast cancer. *Gland surgery*. 2018;7(4):411. DOI: 10.21037/gs.2018.07.05
45. Huang S, Jin M, Su N, Chen L. New insights on the reparative cells in bone regeneration and repair. *Biological Reviews*. 2021;96(2):357-75. DOI: 10.1111/brv.12659
46. Choy MHV, Wong RMY, Chow SKH, Li M, Chim YN, Li TK, Cheung WH. How much do we know about the role of osteocytes in different phases of fracture healing? A systematic review. *Journal of orthopaedic translation*. 2020;21:111-21. DOI: 10.1016/j.jot.2019.07.005.
47. Gyori DS, Mocsai A. Osteoclast signal transduction during bone metastasis formation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:507. DOI: 10.3389/fcell.2020.00507

48. Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol*. 2015;48(2):61-8. DOI: 10.1007/s00795-015-0099-y
49. Понирко А, Теслик Т, Рябенко Т. Структурно-функціональні зміни остеобластів в умовах хронічної гіперглікемії. *Notes in Current Biology*. 2021;1(1):85-92. DOI: 10.29038/NCBio.21.1.85-92.
50. Taguchi T, Lopez MJ. An overview of de novo bone generation in animal models. *J Orthop Res*. 2021;39(1):7-21. DOI: 10.1002/jor.24852
51. Левченко ОО. Основні механізми ремоделювання кісткової тканини. *Дерматологія та венерологія*. 2016;2(72):5-11.
52. Перепелиця ЮВ, Захарцева ЛМ, Міхньов ВА, Ушко ЯА. Вплив хронічного негазового ацидозу на кісткову тканину у щурів. *Art of Medicine*. 2021;3(19):58-63.
53. Поворознюк ВВ, Резниченко НА, Майлян ЭА. Остеоиммунология: иммунологические механизмы в патогенезе постменопаузального остеопороза. *Reproductive Endocrinology*. 2013;(14):17-22.
54. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, Schmidt-Bleek K. Macrophages in bone fracture healing: their essential role in endochondral ossification. *Bone*. 2018;106:78-89. DOI: 10.1016/j.bone.2015.10.019
55. Ming J, Cronin SJ, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2020;10:1283. DOI: 10.3389/fonc.2020.01283
56. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified tissue international*. 2014;94(1):5-24. DOI: 10.1007/s00223-013-9790-y
57. Попсуйшапка АК, Литвишко АВ, Григорьев ВВ, Ашукина НА. Лечение несращения отломков кости после диафизарного перелома. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2014;1:34-41. DOI: 10.15674/0030-59872014134-41

58. Liu W, Zhang X. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2015;11:3212-3218. DOI: 10.3892/mmr.2015.3152
59. Cao X. RANKL-RANK signaling regulates osteoblast differentiation and bone formation. *Bone Res*. 2018;6:35. DOI: 10.1038/s41413-018-0040-9
60. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflamm Regen*. 2020;40(1):1-16. DOI: 10.1186/s41232-019-0111-3
61. Xiong J, Cawley K, Piemontese M, Fujiwara Y, Zhao H, Goellner JJ, O'Brien CA. Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nature communications*. 2018;9(1):1-7. DOI: 10.1038/s41467-018-05244-y
62. Matsumoto T, Endo I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2021;39(1):91-105. DOI: 10.1007/s00774-020-01153-7
63. Tsourdi E, Zillikens MC, Meier C, Body JJ, Gonzalez Rodriguez E, Anastasilakis AD, Langdahl B. Fracture risk and management of discontinuation of denosumab therapy: a systematic review and position statement by ECTS. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2021;106(1):264-281. DOI: 10.1210/clinem/dgaa756
64. Слободян ОМ, Лаврів ЛП, Лопушняк ЛЯ, Бамбуляк АВ, Бойчук ОМ. Сучасний погляд на молекулярно-генетичні механізми міжклітинної взаємодії у процесі кісткового ремоделювання. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2018;17(3):88-97.
65. Salazar V, Gamer L, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12:203-21. DOI: 10.1038/nrendo.2016.12
66. Stewart S, Bryant SJ, Ahn J, Hankenson KD. Bone Regeneration. *Translational Regenerative Medicine*. 2015:313-333. DOI:10.1016/b978-0-12-410396-2.00024-4

67. Wigner NA, Luderer HF, Cox MK, Sooy K, Gerstenfeld LC, Demay MB. Acute Phosphate Restriction Leads to Impaired Fracture Healing and Resistance to BMP2. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(4):724-733. DOI: 10.1359/jbmr.091021
68. Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone research*. 2015;3(1):1-20. DOI: 10.1038/boneres.2015.5
69. Gómez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93-101. DOI:10.1016/j.bone.2014.07.033
70. Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, et.al. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. *The Journal of Cell Biology*. 2013;200(4):537–49. DOI:10.1083/jcb.201207142
71. Steinhart Z, Angers S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. *Development*. 2018;145(11):dev146589. DOI:10.1242/dev.146589
72. Оразгалиева МГ, Нусупбекова АМ, Габдулина ГХ. Молекулярно-генетические аспекты деградации сустава. *Вестник Казахского Национального медицинского университета*. 2015;1:367-72.
73. Van Den Bosch MHJ. Inflammation in osteoarthritis: is it time to dampen the alarm (in) in this debilitating disease? *Clinical Experimental Immunology*. 2019;195(2):153-66. DOI:10.1111/cei.13237
74. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*. 2017;8(20):33972. DOI:10.18632/oncotarget.15687
75. Einhorn T, Gerstenfeld L. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11:45-54. DOI:10.1038/nrrheum.2014.164
76. Grigorie D, Lerner UH. The crucial role of the WNT system in bone remodelling. *Acta endocrinologica* (Bucharest, Romania:2005). 2018;14(1):90-101. DOI:10.4183/aeb.2018.90

77. Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*. 2017;96:29-37. DOI:10.1016/j.bone.2016.10.007
78. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2021;39(1):19–26. DOI:10.1007/s00774-020-01162-6
79. Fard D, Tamagnone L. Semaphorins in health and disease. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 2020;(5):1-9. DOI:10.1016/j.cytogfr.2020.05.006
80. Rajabinejad M, Asadi G, Ranjbar S, Hezarkhani LA, Salari F, Karaji AG, Rezaieyanesh A. Semaphorin 4A, 4C, and 4D: Function comparison in the autoimmunity, allergy, and cancer. *Gene*. 2020;746:144637. DOI:10.1016/j.gene.2020.144637
81. Alesi N, Charles JF, Nakamura MC. Basic Aspects of Osteoclast. *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management*. 2020:17-42. DOI:10.1007/978-3-319-69287-6_2
82. Koh J.M. Osteoclast-derived SLIT3 is a coupling factor linking bone resorption to bone formation. *BMB reports*. 2018;51(6):263-4. DOI:10.5483/BMBRep.2018.51.6.109
83. Greenblatt MB, Tsai JN, Wein MN. Bone turnover markers in the diagnosis and monitoring of metabolic bone disease. *Clinical chemistry*. 2017; 63(2):464-74. DOI:10.1373/clinchem.2016.259085
84. Konukoglu D. Bone markers. *Int J Med Biochem*. 2019;2(2):65-78. DOI:10.14744/ijmb.2019.60362
85. Szulc P, Bauer DC, Eastell R. Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Marcus and Feldman's Osteoporosis*. Academic Press. 2021;1545-88. DOI:10.1016/B978-0-12-813073-5.00065-4
86. Yoon BH, YuW. Clinical utility of biochemical marker of bone turnover: fracture risk prediction and bone healing. *Journal of Bone Metabolism*. 2018;25(2):73-78. DOI:10.11005/jbm.2018.25.2.73

87. Chapurlat RD, Confavreux CB. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. 2016;55(10):1714-25. DOI:10.1093/rheumatology/kev410
88. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ, Понирко АО, Теслик ТП, Гула ВІ. Імуногістохімічний аналіз експресії катепсину К та остеопонтину клітинними елементами кісткової тканини регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021;2(160):236-241.
89. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855. DOI:10.1016/j.gene.2020.144855
90. Roland D. Chapurlat, Cyrille B. Confavreux. Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*. 2016; 55(10):1714–1725. DOI:10.1093/rheumatology/kev410
91. Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2018;33(1):890-904. DOI:10.1080/14756366.2018.1465417
92. Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, et.al. Cathepsin K: The action in and beyond bone. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:433. DOI:10.3389/fcell.2020.00433
93. Costa A, Cusano N, Silva B, Cremers S, Bilezikian JP. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2011;7(8):447-56. DOI:10.1038/nrrheum.2011.77
94. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocrine reviews*. 2017;38(4):325-350. DOI:10.1210/er.2015-1114.
95. Ono T, Hayashi M, Sasaki F, Nakashima T. RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. *Inflammation and regeneration*. 2020;40(1):1-16. DOI:10.1186/s41232-019-0111-3
96. Bonnet N, Douni E, Perréard Lopreno G, Besse M, Biver E, Ferrari S. RANKL-induced increase in cathepsin K levels restricts cortical expansion in a

periostin dependent fashion: a potential new mechanism of bone fragility. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2021;36(8): 1636-45.DOI:10.1002/jbmr.4307

97. Ігнат'єв ОМ, Ермоленко ТО, Турчин МІ, Панюта ОІ, Прутіян ТЛ. Маркери метаболізму кісткової тканини. *Вісник морської медицини*. 2020;2(87):127-48. DOI:10.5281/zenodo.3976574

98. Lyndin M, Gluschenko N, Sikora V, Lyndina Yu, Hyryavenko N, Tkach G, Kurochkina V, Romaniuk A. Morphofunctional features of articular cartilage structure. *Folia Medica Cracoviensia*. 2019;59(3):81-93. DOI:10.24425/fmc.2019.131138

99. Romaniuk A, Lyndina Yu, Sikora V, Lyndin M, Karpenko L, Gladchenko O, Masalitin I. Structural features of bone marrow. *Interventional Medicine & Applied Science*. 2016;8(3):121-6. DOI:10.1556/1646.8.2016.3.3

100. Bailey S, Karsenty G, Gundberg C, Vashishth D. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1409(1):79-84. DOI:10.1111/nyas.13470

101. An J, Leeuwenburgh S, Wolke J, Jansen J. Mineralization processes in hard tissue. *Bio mineralization and Biomaterials*. 2016:129–146. DOI:10.1016/b978-1-78242-338-6.00005-3

102. Murshed M. Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(12):a031229.DOI: 10.1101/cshperspect.a031229.

103. Depalle B, McGilvery CM, Nobakhti S, Aldegaiter N, Shefelbine SJ, Porter AE. Osteopontin regulates type I collagen fibril formation in bone tissue. *Acta biomaterialia*. 2021;120:194-202. DOI:10.1016/j.actbio.2020.04.040

104. Rodriguez DE, Thula-Mata T, Toro EJ, Yeh YW, Holt C, Holliday LS, et.al. Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts. *Acta biomaterialia*. 2014;10(1):494-507. DOI:10.1016/j.actbio.2013.10.010

105. Si J, Wang C, Zhang D, Wang B, Hou W, Zhou Y. Osteopontin in bone metabolism and bone diseases. *Medical science monitor: international medical*

journal of experimental and clinical research. 2020;26:e9191591.
DOI:10.12659/MSM.919159

106. Halling Linder C, Ek-Rylander B, Krumpel M, Norgård M, Narisawa S, Millán JL, Magnusson P. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization. *Calcified tissue international.* 2017;101(1):92-101. DOI:10.1007/s00223-017-0259-2

107. Hasegawa T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. *Histochem Cell Biol.* 2018;149:289–304. DOI: 10.1007/s00418-018-1646-0

108. Reznikov N, Hoac B, Buss DJ, Addison WN, Barros NMT, McKee MD. Biological stenciling of mineralization in the skeleton: Local enzymatic removal of inhibitors in the extracellular matrix. *Bone.* 2020;138:115447. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115447

109. Upadhyay RK. Role of calcium bio-minerals in regenerative medicine and tissue engineering. *J Stem Cell Res Ther.* 2017;2(6):166-175. DOI: 10.15406/jsrt.2017.02.00081

110. Ciosek Ż, Kot K, Kosik-Bogacka D, Łanocha-Arendarczyk N, Rotter I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules.* 2021;11(4):506. DOI: 10.3390/biom11040506

111. Столярова О. Ю. Остеопонтин и остеокальцин при раке легких. *Боль. Суставы. Позвоночник.* 2017; 7 (4):167-71.

112. Скочило ОВ. Експериментальна оцінка процесів регенерації кісткової тканини шляхом аналізу ферментативної активності кислої та лужної фосфатаз. *Клінічна стоматологія.* 2016(4):5-10.

113. Данильченко ЛІ. Забезпеченість вітаміном D, маркери кісткового ремоделювання і механічна міцність кісткової тканини у жінок у постменопаузі. *Одеський медичний журнал.* 2015(6):47-50.

114. Bouleftour W, Juignet L, Bouet G, Granito RN, Vanden-Bossche A, Laroche N, Malaval L. The role of the SIBLING, Bone Sialoprotein in skeletal

biology – Contribution of mouse experimental genetics. *Matrix Biology*. 2016;52:60-77. DOI:10.1016/j.matbio.2015.12.011

115. Wang L, Song L, Li J, Wang Y, Yang C, Kou X, et.al. Bone sialoprotein- $\alpha v \beta 3$ integrin axis promotes breast cancer metastasis to the bone. *Cancer science*. 2019;110(10):3157-3172. DOI:10.1111/cas.14172

116. Laronha H, Caldeira J. Structure and function of human matrix metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076. DOI:10.3390/cells9051076

117. Garcia-Garcia P, Reyes R, Rodriguez JA, Martín T, Evora C, Díaz-Rodríguez P, Delgado A. The Bone Regeneration Capacity of BMP-2+MMP-10 Loaded Scaffolds Depends on the Tissue Status. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):979. DOI:10.3390/pharmaceutics13070979

118. Mao L, Yano M, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Kaji H. Role of matrix metalloproteinase-10 in the BMP-2 inducing osteoblastic differentiation. *Endocrine journal*. 2013:EJ13-0270. DOI:10.1507/endocrj.EJ13-0270

119. Яковенчук Н. Клітинно-молекулярні взаємодії на межі суглобового хряща та субхондральної кістки. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2019;4:50-58. DOI:10.15674/0030-59872019450-58

120. Машейко ИВ. Биохимические маркеры в оценке процессов ремоделирования костной ткани при остеопении и остеопорозе. *Журнал Гродненского государственного медицинского университета*. 2017;2:149-53.

121. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ, Ковалюк ТМ. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021;6(33):116-26.

122. Konukoglu D. Bone markers. *Int J Med Biochem*. 2019;2(2):65-78. DOI:10.14744/ijmb.2019.60362

123. Zimmermann E, Busse B, Ritchie R. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. *Bone KEY Reports*. 2015;4:1-13. DOI:10.1038/bonekey.2015.112

124. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3):308–27. DOI:10.1177%2F0004563218759371
125. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, Hankenson KD. Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research®.* 2019;37(1):35-50. DOI:10.1002/jor.24170
126. Lorenzo J. The many ways of osteoclast activation. *J Clin Invest.* 2017 Jun 30;127(7):2530–32. DOI:10.1172/JCI94606
127. Думанський ЮВ, Столярова ОВ, Синяченко ОВ, Егудина ЕД. Костний метаболізм і остеопороз в онкологічній практиці. *Біль. Сугави. Позвоночник.* 2015;3(19):5-9.
128. Kukita A, Kukita T. Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis. *Future Oncology.* 2013;9(11): 1609–22. DOI:10.2217/fon.13.115
129. Ardura JA, Portal-Nunes S, Castelbon-Calvo I, Martinez de Toda I, De la Fuente M, Esbri P. Parathyroid hormone-related protein protects osteoblastic cells from oxidative stress by activation of MKP1 phosphatase. *J. Cell. Physiol.* 2017;232(4):785-96. DOI:10.1002/jcp.25473
130. Esbrit P, Herrera S, Portal-Nunez S, Nogués X, Díez-Pérez A. Parathyroid Hormone-Related Protein analogs as Osteoporosis Therapies. *Calcified Tissue international.* 2016;98(4):359-69. DOI:10.1007%2Fs00223-015-0050-1
131. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P. The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *Journal of clinical periodontology.* 2019; 46:33-51. DOI: 10.1111/jcpe.13051
132. Maurizi A, Rucci N. The osteoclast in bone metastasis: player and target. *Cancers.* 2018;10(7):218. DOI:10.3390/cancers10070218
133. Sisay M, Mengistu G, Edessa D. The RANK/RANKL/OPG system in tumorigenesis and metastasis of cancer stem cell: potential targets for anticancer therapy. *OncoTargets and therapy.* 2017; 10:3801. DOI: 10.2147/OTT.S135867

134. Clézardin P. Pathophysiology of bone metastases from solid malignancies. *Joint Bone Spine.* 2017;84(6):677-84. DOI:10.1016/j.jbspin.2017.05.006
135. Rachner TD, Hofbauer LC, Göbel A. Bone Metabolism in Cancer. Central Nervous System Metastases. *Springer, Cham.* 2020:503-11. DOI:10.1007/978-3-030-42958-4_36
136. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta pharmaceutica sinica B.* 2015;5(5):402-418. DOI:10.1016/j.apsb.2015.07.005
137. Shapiro CL. Management of osteoporosis in women with breast cancer. *Breast Cancer Management.* 2020;9(2):BMT40. DOI:10.2217/bmt-2020-0012
138. Zagzag J, Hu MI, Fisher SB, Perrier ND. Hypercalcemia and cancer: Differential diagnosis and treatment. *CA: a cancer journal for clinicians.* 2018;68(5):377-386. DOI:10.3322/caac.21489
139. Guise TA, Wysolmerski JJ. Cancer-Associated Hypercalcemia. *New England Journal of Medicine.* 2022;386(15):1443-51. DOI:10.1056/NEJMcp2113128
140. Salamanna F, Borsari V, Brogini S, Torricelli P, Cepollaro S, Cadossi M, Fini M. A human 3D in vitro model to assess the relationship between osteoporosis and dissemination to bone of breast cancer tumor cells. *Journal of cellular physiology.* 2017;232(7):1826-34. DOI: 10.1002/jcp.25708.
141. Вырва ОЕ, Головина ЯА, Головина ОА, Малык РВ. Дифференцированный подход к лечению больных с метастатическим поражением длинных костей конечностей. *Клиническая онкология.* 2012 5(1):43-48.
142. Asonitis N, Angelousi A, Zafeiris C, Lambrou GI, Dontas I, Kassi E. Diagnosis, pathophysiology and management of hypercalcemia in malignancy: a review of the literature. *Hormone and Metabolic Research.* 2019;51(12):770-8. DOI: 10.1055/a-1049-0647

143. Kuchuk M, Addison CL, Clemons M, Kuchuk I, Wheatley-Price P. Incidence and consequences of bone metastases in lung cancer patients. *Journal of bone oncology*. 2013;2(1):22-9. DOI:10.1016/j.jbo.2012.12.004
144. Hain BA, Xu H, Wilcox JR, Mutua D, Waning DL. Chemotherapy-induced loss of bone and muscle mass in a mouse model of breast cancer bone metastases and cachexia. *JCSM Rapid communications*. 2019;2(1):1-12. DOI:10.1002/j.2617-1619.2019.tb00011.x
145. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, Schmitz KH, Waning DL. Cancer-and Chemotherapy-Induced Musculoskeletal Degradation. *JBMR plus*. 2019;3(3):e10187. DOI:10.1002/jbm4.10187
146. Висоцький АО. Метастази раку молочної залози у кістки: механізм кісткової деструкції та їх лікування. *Український науково-медичний молодіжний журнал*. 2014;79(1):155-156.
147. Esposito M, Guise T, Kang Y. The biology of bone metastasis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018;8(6):a031252. DOI:10.1101/cshperspect.a031252
148. Fornetti J, Welm AL, Stewart SA. Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2018;33(12):2099-113. DOI:10.1002/jbmr.3618
149. Piccioli A, Maccauro G, Spinelli MS, Biagini R, Rossi B. Bone metastases of unknown origin: epidemiology and principles of management. *J Orthopaed Traumatol*. 2015;16(2):81-86. DOI:10.1007/s10195-015-0344-0
150. Coleman R, Body J, Aapro M, Hadji P, Herrstedt J. Bone health in cancer patients: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology*. 2014;25:124-37. DOI:10.1093/annonc/mdu103.
151. Walker C, Mojares E, del Río Hernández A. Role of extracellular matrix in development and cancer progression. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10):3028. DOI:10.3390/ijms19103028

152. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADM. Paget's "seed and soil" theory of cancer metastasis: an idea whose time has come. *Advances in anatomic pathology*. 2019;26(1):69-74. DOI:10.1097/PAP.0000000000000219
153. Zhang W, Bado I, Wang H, Lo HC, Zhang XHF. Bone metastasis: find your niche and fit in. *Trends in cancer*. 2019;5(2):95-110. DOI:10.1016/j.trecan.2018.12.004.
154. Coleman RE, Holen I, Lefley DV, Francis SE, Rennicks S, Bradbury S, et.al. IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget*. 2016;7(46):75571. DOI:10.18632 / oncotarget.12289
155. Shupp AB, Kolb AD, Mukhopadhyay D, Bussard KM. Cancer metastases to bone: concepts, mechanisms, and interactions with bone osteoblasts. *Cancers*. 2018;10(6):182. DOI:10.3390/cancers10060182
156. Bhowmik D, Song X, Intorcchia M, Gray S, Shi N. Examination of burden of skeletal-related events in patients naive to denosumab and intravenous bisphosphonate therapy in bone metastases from solid tumors population. *Current medical research and opinion*. 2019;35(3):513-23. DOI:10.1080/03007995.2018.1532884
157. McDougall JA, Bansal A, Goulart BH, McCune JS, Karnopp A, Fedorenko C, et.al. The clinical and economic impacts of skeletal-related events among medicare enrollees with prostate cancer metastatic to bone. *The oncologist*. 2016;21(3):320. DOI:10.1634/ theoncologist.2015-0327
158. Renema N, Navet B, Heymann MF, Lezot F, Heymann D. RANK–RANKL signalling in cancer. *Bioscience reports*. 2016;36(4):e00366. DOI:10.1042/BSR20160150
159. Trieb K, Windhager R. Receptor activator of nuclear factor κ B expression is a prognostic factor in human osteosarcoma. *Oncol. Lett*. 2015;10:1813-15. DOI:10.3892/ol.2015.3489
160. Papanastasiou AD, Sirinian C, Kalofonos HP. Identification of novel human receptor activator of nuclear factor- κ B isoforms generated through

alternative splicing: implications in breast cancer cell survival and migration. *Breast Cancer Res.* 2012;14:112. DOI:10.1186/bcr3234

161. Li X, Liu Y, Wu B, Dong Z, Wang Y, Lu J, Wang Z.. Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis. *Oncology reports.* 2014;32(6):2605-2611. DOI:10.3892/or.2014.3511

162. Freeman AK, Sumathi VP, Jeys L. Metastatic tumors of bone. *Surgery (Oxford).* 2018;36(1):35-40. DOI:10.1016 /j.mpsur.2017.10.002

163. Ferreira A, Alho I, Casimiro S, Costa L. Bone remodeling markers and bone metastases: From cancer research to clinical implications. *BoneKEY Reports.* 2015;4. DOI:10.1038 / bonekey.2015.35

164. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. *Nature reviews Cancer.* 2016;16(6):373-86. DOI:10.1038/nrc.2016.44

165. Clézardin P, Coleman R, Puppo M, Ottewill P, Bonnelye E, Paycha F, et. al. Bone metastasis:Mechanisms, therapies and biomarkers. *Physiological reviews.* 2021;101(3):797-855. DOI:10.1152/physrev.00012.2019

166. Gdowski AS, Ranjan A, Vishwanatha JK. Current concepts in bone metastasis, contemporary therapeutic strategies and ongoing clinical trials. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:108. DOI:10.1186/s13046-017-0578-1

167. Neuwirt H, Bouchal J, Kharraishvili G, Ploner C, Jöhrer K, Pitterl F, et.al. Cancer-associated fibroblasts promote prostate tumor growth and progression through upregulation of cholesterol and steroid biosynthesis. *Cell Communication and Signaling.* 2020;18(1):1-18. DOI:10.1186/s12964-019-0505-5

168. Koob S, Kehrer M, Strauss A, Janzen V, Wirtz DC, Schmolders J. Bone metastases-pathophysiology, diagnostic testing and therapy (part 1). *Zeitschrift fur Orthopadie und Unfallchirurgie.*2017;155(6):716-26. DOI:10.1055 / s-0043-116799

169. Quiroz-Munoz M, Izadmehr S, Arumugam D, Wong B, Kirschenbaum A, Levine AC. Mechanisms of osteoblastic bone metastasis in prostate cancer: role

of prostatic acid phosphatase. *Journal of the Endocrine Society*. 2019;3(3):655-64. DOI:10.1210/js.2018-00425

170. Ottewell PD. The role of osteoblasts in bone metastasis. *Journal of bone oncology*. 2016;5(3):124-7. DOI:10.1016/j.jbo.2016.03.007

171. Паламарчук ВБ, Плакида АО, Даценко ГВ. Рак молочної залози, етіологічні чинники, клінічні ознаки, методи діагностики, лікування та профілактики. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2015;24:225-30.

172. Літвіняк Р. Паранеопластичні синдроми, що супроводжуються ураженням нирок. Феномен людини. *Здоровий спосіб життя*. 2015;44(110):21-30.

173. Король ПО, Ткаченко ММ. Рак метастазує до кісткового мозку, а не до кістки: час для зміни парадигми (огляд літератури). *Травма*. 2019;20(2):32-37.

174. Dewulf J, Vangestel C, Verhoeven Y, van Dam P, Elvas F, Van den Wyngaert T, et.al. Bone metastases in the era of targeted treatments: insights from molecular biology. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2019;63(2):98-111. DOI:10.23736/s1824-4785.19.03203-5

175. Заремба ЄХ, Заремба О.В, Заремба-Федчишин ОВ, Вірна ММ, Матвіїв ІД. Клінічний випадок раку легень із метастатичним ураженням кісткової тканини. *Практикуючий лікар*. 2015;(4):59-62.

176. Шармазанова ОП, Лисенко НС, Солковська ОВ. Особливості кісткових метастазів нирковоклітинного раку. *Радіологічний вісник*. 2016; 3-4:94-94.

177. Артамонова НО, Павліченко ЮВ, Бакай ТС, Кривуля ОС. Сучасні підходи до діагностики метастазів та рецидивів злоякісних пухлин (дайджест). *Український радіологічний журнал*. 2014;22(4):53-59.

178. Salim X, D'Alessandro P, Little J, Mudhar K, Murray K, Carey Smith R, et.al. A novel scoring system to guide prognosis in patients with pathological fractures. *J Orthop Surg Res*. 2018;13(1):1-8. DOI:10.1186/s13018-018-0931-x

179. Angelini A, Trovarelli G, Berizzi A, Pala E, Breda A, Maraldi M, Ruggieri P. Treatment of pathologic fractures of the proximal femur. *Injury*. 2018;49:S77-S83. DOI:10.1016/j.injury.2018.09.044
180. Anract P, Biau D, Boudou-Rouquette P. Metastatic fractures of long limb bones. *Orthopaedics Traumatology: Surgery Research*. 2017;103(1):S41-S51. DOI:10.1016/j.otsr.2016.11.001
181. Есентаева СЕ, Серикбаев ГА, Телеусова ЗТ, Абдрахманова АЖ, Нурғалиев НС, Аяпбергенова ГО, и др. Актуальность оценки здоровья костей у больных раком молочной и предстательной железы. *Онкология и радиология Казахстана*. 2014;1:6-12.
182. Philipp TC, Mikula JD, Doung YC, Gundle KR. Is There an Association Between Prophylactic Femur Stabilization and Survival in Patients with Metastatic Bone Disease? *Clinical orthopaedics and related research*. 2020;478(3):540-6. DOI:10.1097%2FCORR.0000000000000803
183. Györi DS, Mócsai A. Osteoclast signal transduction during bone metastasis formation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:507. DOI:10.3389/fcell.2020.00507
184. Hill T, D'Alessandro P, Murray K, Yates P. Prognostic factors following pathological fractures. *ANZ Journal of Surgery*. 2015;85(3):159-63. DOI:10.1111/ans.12830
185. Sturgeon KM, Mathis KM, Rogers CJ, Schmitz KH, Waning DL. Cancer- and Chemotherapy-Induced Musculoskeletal Degradation. *JBMR Plus*. 2019;3(3):e10187. DOI:10.1002/jbm4.10187
186. Мельниченко ГА, Мамедова ЕО. Ятрогенные поражения скелета. *Ожирение и метаболизм*. 2016;13(2):41-47.
187. Тихонова ОА, Крутикова НЮ, Карелин АФ, Жуковская ЕВ, Румянцев АГ. Влияние злокачественных новообразований на состояние костно-мышечной системы у детей (обзор литературы). *Онкогематология*. 2018;4:60-65.

188. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. Ефект від experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. *Clinical oral implants research*. 2017;28(9):e101-e110. DOI:10.1111/clr.12936
189. Brook N, Brook E, Dharmarajan A, Dass CR, Chan A. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *The international journal of biochemistry cell biology*. 2018;96:63-78. DOI:10.1016/j.biocel.2018.01.003
190. Saad F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*. 2007;110(8):1860-7. DOI:10.1002/cncr.22991
191. Piddubnyi AM, Moskalenko RA. Molecular aspects of the bone metastases development in prostate cancer. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019;7(2):96-108. DOI:10.21272/eumj.2019;7(2):96-108
192. Переводчикова НИ. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 4-е изд. 2018:688.
193. Wijdeven RH, Pang B, Assaraf YG, Neefjes J. Old drugs, novel ways out: Drug resistance toward cytotoxic chemotherapeutics. *Drug Resistance Updates*. 2016;28:65-81. DOI:10.1016/j.drug.2016.07.001
194. Liu Z, Delavan B, Roberts R, Tong W. Lessons learned from 2 decades of anticancer drugs. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38:(10):852-72. DOI:10.1016/j.tips.2017.06.005
195. Alam A, Farooq U, Singh R, Dubey VP, Kumar S, Kumari R, et.al. Chemotherapy treatment and strategy schemes: A review. *Open Access J Toxicol*. 2018;2(5):555600. DOI:10.19080/OAJT.2018.02.555600
196. Пономарева ОВ, Терновой НК, Туз ЕВ, Колотилов НН, Пивнюк ВМ. Современный алгоритм лечения больных раком предстательной железы с метастазами в кости. *Онкология*. 2017;3(19):206-211.
197. Gül G, Sendur MAN, Aksoy S, Sever AR, Altundag K. A comprehensive review of denosumab for bone metastasis in patients with solid

tumors. *Curr Med Res Opin.* 2016;32(1):133-45. DOI:10.1185/03007995.2015.1105795.

198. Rühle A, Huber PE, Saffrich R, Lopez Perez R, Nicolay NH. The current understanding of mesenchymal stem cells as potential attenuators of chemotherapy-induced toxicity. *International journal of cancer.* 2018;143(11):2628-39. DOI:10.1002/ijc.31619

199. Nayir E. Pathogenesis of bone metastasis. *Journal of Oncological Science.* 2016;1:13-16. DOI:10.1016/j.jons.2015.11.004

200. Чорний ВС, Коноваленко ВФ, Проценко ВВ. Оценка эффективности и осложнений неoadъювантной полихимиотерапии в комбинированном лечении больных остеосаркомой длинных трубчатых костей. *Травма.* 2017;2(18):23-29.

201. Рябенко ТВ, Понирко АО. (Огляд літератури). Аналіз впливу злоякісних новоутворень на стан кісткової системи та з'ясування дії протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Буковинський медичний вісник.* 2020;24(1(93)):242-249.

202. Kimura T. Multidisciplinary Approach for Bone Metastasis: A Review. *Cancers.* 2018;10(6):156. DOI:10.3390/cancers10060156

203. Ganguly R, Anand S, Metkari S, Bhartiya D. Effect of aging and 5-fluorouracil treatment on bone marrow stem cell dynamics. *Stem Cell Reviews and Reports.* 2020;16(5):909-921. DOI:10.1007/s12015-020-09998-1

204. Lucas D, Scheiermann C, Chow A, Kunisaki Y, Bruns I, Barrick C, et.al. Chemotherapy-induced bone marrow nerve injury impairs hematopoietic regeneration. *Nature medicine.* 2013;19(6):695-703. DOI:10.1038/nm.3155

205. Diker-Cohen T, Uziel O, Szyper-Kravitz M, Shapira H, Natur A, Lahav M. The effect of chemotherapy on telomere dynamics: clinical results and possible mechanisms. *Leukemia Lymphoma.* 2013;54(9):2023-9. DOI:10.3109/10428194.2012.757765

206. Mancini R. Chemotherapy Administration Sequence: a review of the literature and Creation of a Sequencing Chart. *Journal of Hematology Oncology Pharmacy*. 2011;1(1):17-25.
207. Georgiou KR, Scherer MA, Fan CM, Cool JC, King TJ, Foster BK, et.al. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenic potential in the bone marrow. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(3):909-18. DOI:10.1002/jcp.22807
208. Fan CM, Foster BK, Hui SK, Xian CJ. Prevention of bone growth defects, increased bone resorption and marrow adiposity with folinic acid in rats receiving long-term methotrexate. *PLOS ONE*. 2012;7(10):e46915. DOI:10.1371/journal.pone.0046915
209. Pirker-Frühauf UM, Friesenbichler J, Urban EC, Obermayer-Pietsch B, Leithner A. Osteoporosis in children and young adults: a late effect after chemotherapy for bone sarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2012;470(10):2874-2885. DOI:10.1007/s11999-012-2448-7
210. Rizzoli R, Body JJ, Brandi ML. Cancer-associated bone disease. *Osteoporos. Int*. 2013;24(12):2929-53. DOI:10.1007/s00198-013-2530-3
211. Shapiro CL, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(26):1997-2008. DOI:10.1056 / NEJM200106283442607
212. Вибирана РЙ, Жулкевич ІВ. Зміни структурно-функціонального стану кісткової тканини під впливом хіміотерапевтичних середників у хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію. *Шпитальна хірургія*. 2013;3:86-92.
213. Панчук Р, Бойко Н, Стойка Р. Молекулярні механізми регуляції проліферації та клітинного циклу в клітинах мишачої лімфоми НК/Лу за умов хіміотерапії in vivo. *Праці наукового товариства ім. Шевченка*. 2008;21:263-271.
214. Поворознюк ВВ, Бистрицька МА, Орлик ТВ. Остеопороз у пацієнтів зі злюкисними новоутвореннями. *Проблеми остеології*. 2015; 18(3):3-11.

215. Rachner TD, Coleman R, Hadji P, Hofbauer LC. Bone health during endocrine therapy for cancer. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2018; 6(11):901-910. DOI:10.1016/S2213-8587(18)30047-0.

216. Taxel P, Faircloth E, Idrees S, Van Poznak C. Cancer treatment–induced bone loss in women with breast cancer and men with prostate cancer. *Journal of the Endocrine Society*. 2018;2(7):574-88. DOI:10.1210/js.2018-00052

217. Проценко ВВ, Костюк АН, Бурьянов АА. Использование стержневых аппаратов внешней фиксации Костюка как этап комплексного лечения больных с метастатическим поражением костей конечностей. *Травма*. 2013;14(3):1-6.

218. Hain B, Xu H, Wilcox J, Mutua D, Waning D. Chemotherapy-induced loss of bone and muscle mass in a mouse model of breast cancer bone metastases and cachexia. *JCSM Rapid communications*. 2019;2(1):1-12. DOI:10.1002/j.2617-1619.2019.tb00011.x

219. Kenyon M, Mayer DK, Owens AK. Late and long-term effects of breast cancer treatment and surveillance management for the general practitioner. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*. 2014;43(3):382-398. DOI:10.1111/1552-6909.12300

220. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовують для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року. Верховна Рада України. Офіц. веб-сайт. (Міжнародний документ Ради Європи). Available from: http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?reg=994_137

221. Кожемякин ЮМ, Хромов ОС, Филоненко МА, Сайфетдинова ГА. Научно-практические рекомендации по содержанию лабораторных животных и работе с ними. Киев.:2002;319.

222. Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Стаття 26).

223. Багрій ММ, Діброва ВА, Попадинець ОГ, Грищук МІ. Методики морфологічних досліджень. *Нова книга*, 2016:328.

224. Кухарук ВР. Алгоритми генерування імуногістохімічних зображень. 2020:74.
225. Shah FA, Ruscsák K, Palmquist A. 50 years of scanning electron microscopy of bone – a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease and taphonomy. *Bone Res.* 2019;7(1):1-15. DOI: 10.1038/s41413-019-0053-z
226. Stagi S, Cavalli L, Cavalli T, de Martino M, Brandi ML. Peripheral quantitative computed tomography (pQCT) for the assessment of bone strength in most of bone affecting conditions in developmental age: a review. *Italian journal of pediatrics.* 2016;42(1):1-20. DOI: 10.1186/s13052-016-0297-9
227. Grey ML, Ailinani JM. CT and MRI pathology: a pocket atlas. McGraw-Hill. 2012. Available from: http://repository.vnu.edu.vn/handle/VNU_123/77684
228. Riabenko TV, Korenkov OV, Dmytruk SM, Yarmolenko OS, Ponyrko AA, Pernakov MS, et.al. Morphological features of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie.* 2022;75(3):570-576. DOI: 10.36740/WLek202203102.
229. Hadji P. Cancer Treatment-Induced Bone Loss in women with breast cancer. *BoneKEY reports.* 2015;4:692. DOI: 10.1038/bonekey.2015.60
230. Rana T, Chakrabarti A, Freeman M, Biswas S. Doxorubicin-Mediated Bone Loss in Breast Cancer Bone Metastases Is Driven by an Interplay between Oxidative Stress and Induction of TGF β . *PLoS ONE.* 2013;8(10):78043. DOI: 10.1371/journal.pone.0078043
231. Pountos I, Giannoudis PV. Effect of methotrexate on bone and wound healing. *Expert Opinion on Drug Safety.* 2017;16(5):535-45. DOI: 10.1080/14740338.2017.1310839
232. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *American*

Journal of physiology. Endocrinology and Metabolism. 2012;302(11):E1440-9. DOI: 10.1152/ajpendo.00587.2011

233. Fan C, Georgiou KR, Morris HA, McKinnon RA, Keefe DM, Howe PR, et.al. Combination breast cancer chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide damages bone and bone marrow in a female rat model. *Breast cancer research and treatment.* 2017;165(1):41-51. DOI: 10.1007/s10549-017-4308-3

234. Hernandez-Becerra E, Londoño-Restrepo SM, Hernández-Urbiola MI, Jimenez-Mendoza D, Aguilera-Barreiro MDLÁ, Perez-Torrero E, et.al. Determination of basal bone mineral density in the femur bones of male and female Wistar rats. *Laboratory Animals.* 2021;55(1):30-42. DOI: 10.1177/0023677220922566

235. Riabenko TV. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal.* 2021;9(3):95-307.doi: DOI: 10.21272/eumj.2021;9 (3):295–307

236. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. *Clinical oral implants research.* 2017;28(9),e101-e110. DOI: 10.1111/clr.12936

237. Robin F, Cadiou S, Albert JD, Bart G, Coiffier G, Guggenbuhl P. Methotrexate osteopathy: five cases and systematic literature review. *Osteoporosis International.* 2020;32(2);225-232. DOI: 10.1007/s00198-020-05664-x.

238. Рябенко ТВ, Кореньков ОВ. Комп'ютерно-томографічна оцінка динаміки загоєння дефекту діафіза стегнової кістки в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Актуальні проблеми сучасної медицини.* 2020;20(2):165–170. DOI:10.31718/2077-1096.20.2.165

239. Григор'єва НВ, Поворознюк ВВ, Гопкалова ІВ, Орлик ТВ. Вікові та статеві особливості показників мінеральної щільності кісткової тканини щурів. *Фізіол. журнал.* 2017;63(1):26-32.

240. Riabenko TV, Dmytruk SM, Yarmolenko OS, Pernakov MS, Teslyk TP, Ponyrko AA, et.al. Influence of antitumor chemotherapeutics on mechanical properties of injured tubular skeletal bone. *Azerbaijan Medical Journal*. 2021;9(3):295-307. DOI:10.21272/eumj.

241. Handforth C, D'Oronzo S, Coleman R. et al. Cancer Treatment and Bone Health. *Calcif Tissue Int*. 2018;102:251–264. DOI:10.1007/s00223-017-0369-x

242. Quach JM, Askmyr M, Jovic T, Baker EK, Walsh NC, Harrison SJ, et al. Myelosuppressive therapies significantly increase pro-inflammatory cytokines and directly cause bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(5):886-897. DOI:10.1002/jbmr.2415

243. Straszkowski L, Jovic T, Castillo-Tandazo W, Ritchie D, Purton L. Effects of chemotherapy agents used to treat pediatric acute lymphoblastic leukemia patients on bone parameters and longitudinal growth of juvenile mice. *Experimental Hematology*. 2020;82:1-7. DOI:10.1016/j.exphem.2020.01.010

244. Rana T, Chakrabarti A, Freeman, M, Biswas S. Doxorubicin-mediated bone loss in breast cancer bone metastases is driven by an interplay between oxidative stress and induction of TGF β . *PLoS One*. 2013;8(10):e78043. DOI:10.1371/journal.pone.0078043

245. Liu Y., Cui Y., Chen Y., Gao X., Su Y., Cui L. Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy Sprague Dawley rats. *Clinical interventions in aging*. 2015;10:1245. DOI:10.2147/CIA.S85225

246. Пикалюк ВС. Фракційний склад органічного матрикса, мінерального компонента і механіко-пластичні властивості кістки. *Український морфологічний альманах*. 2008;6(2):149-154.

247. Fonseca H, Carvalho A, Esteves J, Esteves VI, Moreira-Gonçalves D, Duarte JA. Effects of doxorubicin administration on bone strength and quality in sedentary and physically active Wistar rats. *Osteoporosis International*. 2016;27(12):3465-3475. DOI:10.1007/s00198-016-3672-x

248. Fan C, Georgiou, KR, McKinnon RA, Keefe DM, Howe PR, Xian CJ. Combination chemotherapy with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil causes trabecular bone loss, bone marrow cell depletion and marrow adiposity in female rats. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2016;34(3):277–290. DOI:10.1007/s00774-015-0679-x.

249. Fan CM, Foster BK, Hui SK, Xian CJ. Prevention of bone growth defects, increased bone resorption and marrow adiposity with folinic acid in rats receiving long-term methotrexate. *PloS one*. 2012;7(10):e46915. DOI:10.1371/journal.pone.0046915

250. Shandala T, Shen NgY, Hopwood B, Yip YC, Foster BK, Xian CJ. The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy-induced bone loss. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(7):2889-2897. DOI:10.1002/jcp.23034

251. Georgiou KR, King TJ, Scherer MA, Zhou H, Foster BK, Xian CJ. Attenuated Wnt/ β -catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats. *Bone*. 2012;50(6):1223-33. DOI:10.1016/j.bone.2012.03.027

252. Gawade PL, Hudson MM, Kaste SC, Neglia JP, Wasilewski-Masker K, Constine LS, Ness KK. A systematic review of selected musculoskeletal late effects in survivors of childhood cancer. *Current pediatric reviews*. 2015;10(4):249-62 PMID:25403639.

ДОДАТКИ

Таблиця А.1

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) результатів дослідження відносної площі (%) новоутворених тканин регенерату стегнової кістки щурів зрілого віку ($n = 6$)

Група експерименту	Тканина в ділянці дефекту	Площа, яку займають тканини в ділянці регенерату ($M \pm SD$)			
		15доба	30доба	45доба	60доба
Контроль	Сполучна	56,17 ± 3,80	47,67 ± 5,05	33,00 ± 4,15	7,50±2,88
	Ретикулофіброзна кісткова	43,83 ± 5,88	28,83 ± 4,07	18,50 ± 5,72	11,17±4,17
	Пластинчаста кісткова	-	23,5 ± 4,23	48,50 ± 3,39	81,33±4,89
I експериментальна група	Сполучна	64,83 ± 4,71	68,67 ± 4,46*	52,50 ± 4,23*	28,50±4,64*
	Ретикулофіброзна кісткова	35,17 ± 4,02	19,5 ± 3,99*	26,33 ± 3,61*	30,50±5,58*
	Пластинчаста кісткова	-	11,83 ± 3,71	21,17 ± 3,66*	41,00±3,46
II експериментальна група	Сполучна	59,33 ± 6,50	62,50 ± 4,09*	38,50 ± 5,47	13,00±4,43
	Ретикулофіброзна кісткова	40,67 ± 3,93	20,17 ± 3,19	19,67 ± 4,08	14,67±5,16
	Пластинчаста кісткова	-	17,33 ± 2,50	41,83 ± 5,04*	72,33±4,63*
III експериментальна група	Сполучна	60,83 ± 2,99	59,83 ± 4,02*	54,67 ± 3,61	21,67±4,27*
	Ретикулофіброзна кісткова	39,17 ± 4,17	25,67 ± 4,13	21,50 ± 2,74	18,83±3,82*
	Пластинчаста кісткова	-	14,50 ± 3,83	23,83 ± 5,27	59,50±3,27*

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), * $p < 0,05$ для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту.

p^* - при порівнянні контрольної групи з експериментальними групами I, II, III; p^{**} - при порівнянні I експериментальної групи з групами II і III експериментальними групами; p^{***} - при порівнянні II експериментальної групи з III експериментальною групою (за t-тестом Стьюдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А. 1.1

Дані морфометричних досліджень площі новоутворених тканин (%) кісткового регенерату у тварин контрольної та експериментальної груп у динаміці експерименту (n = 6)

Доба експерименту	Група	Площа сполучної тканини (M ± SD)	p*	p**	p***	Площа ретикулофіброзної тканини (M ± SD)	p*	p**	p***	Площа пластинчастої тканини (M ± SD)	p*	p**	p***
15 доба	Контроль	56,17 ± 3,80	-	-	-	43,83 ± 5,88	-	-	-	-	-	-	-
	I група	64,83 ± 4,71	*	-	-	35,17 ± 4,02	*	-	-	-	-	-	-
	II група	59,33 ± 6,50	-	-	-	40,67 ± 3,93	-	**	-	-	-	-	-
	III група	60,83 ± 2,99	-	-	-	39,17 ± 4,17	-	-	-	-	-	-	-
30 доба	Контроль	47,67 ± 5,05	-	-	-	28,83 ± 4,07	-	-	-	23,5 ± 4,23	-	-	-
	I група	68,67 ± 4,46	*	-	-	19,5 ± 3,99	*	-	-	11,83 ± 3,71	*	-	-
	II група	62,5 ± 4,09	*	**	-	20,17 ± 3,19	-	-	-	17,33 ± 2,5	*	**	-
	III група	59,83 ± 4,02	*	**	-	25,67 ± 4,13	-	**	***	14,5 ± 3,83	*	-	-
45 доба	Контроль	33,0 ± 4,15	-	-	-	18,5 ± 5,72	-	-	-	48,5 ± 3,39	-	-	-
	I група	52,5 ± 4,23	*	-	-	26,33 ± 3,61	*	-	-	21,17 ± 3,66	*	-	-
	II група	38,5 ± 5,47	-	**	-	19,67 ± 4,08	-	**	-	41,83 ± 5,04	*	**	-
	III група	54,67 ± 3,61	*	-	***	21,5 ± 2,74	-	**	-	23,83 ± 5,27	*	-	***
60 доба	Контроль	7,5 ± 2,88	-	-	-	11,17 ± 4,17	-	-	-	81,33 ± 4,17	-	-	-
	I група	28,5 ± 4,64	*	-	-	30,5 ± 5,58	*	-	-	41,0 ± 3,46	*	-	-
	II група	13 ± 4,43	*	**	-	14,67 ± 5,16	-	**	-	72,33 ± 4,63	*	**	-
	III група	21,67 ± 4,27	*	**	***	18,83 ± 3,82	*	**	-	59,5 ± 3,27	*	**	***

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), p<0,05 для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту. p* - при порівнянні контрольної групи з експериментальними групами I, II, III; p** - при порівнянні I експериментальної групи з групами II і III експериментальними групами; p*** - при порівнянні II експериментальної групи з III експериментальною групою (за t-тестом Ст'юдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А. 2.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) імуногістохімічного дослідження кісткового регенерату

Таблиця А. 2.1

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) експресії катепсину К та остеопонтину в кістковому регенераті діафіза травмованих стегнових кісток щурів контрольної та експериментальної груп (n=6)

Доба експерименту	Група експерименту	Катепсин К, $M \pm SD$		Остеопонтин, $M \pm SD$	
		% позитивно забарвлених клітин	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин	% позитивно забарвлених клітин	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин
15 доба	Контроль	31,00 ± 1,26	+++	18,17 ± 1,47	+
	I група	33,17 ± 1,94	+++	14,17 ± 1,17	+
	II група	32,67 ± 1,63	+++	15,83 ± 1,17	+
	III група	33,83 ± 1,47	+++	14,83 ± 1,17	+
30 доба	Контроль	28,50 ± 1,87	++	20,83 ± 1,17	+
	I група	31,17 ± 1,47	+++	17,33 ± 1,21	+
	II група	30,67 ± 1,37	+++	18,50 ± 1,05	+
	III група	31,67 ± 1,75	+++	17,50 ± 1,05	+
45 доба	Контроль	25,17 ± 1,47	+	24,00 ± 1,41	++
	I група	29,50 ± 1,87	++	17,47 ± 0,15	+
	II група	28,50 ± 1,05	++	19,17 ± 1,47	+
	III група	29,83 ± 1,47	++	20,67 ± 1,21	+
60 доба	Контроль	22,67 ± 1,63	+	26,67 ± 1,21	+++
	I група	28,50 ± 1,87	++	21,17 ± 1,47	++
	II група	26,67 ± 1,63	++	22,17 ± 1,47	++
	III група	27,83 ± 1,17	++	20,83 ± 1,17	++

Таблиця А. 2.2.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) експресії катепсину К діафіза травмованих стегнових кісток щурів щурів контрольної та експериментальної груп зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	Щури ($n = 6$)						% позитивно забарвлених клітин у кістковому регенераті, $M \pm SD$	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин	p*	p**	p***
		16	19	20	19	18	17					
15 доба	Контроль	16	19	20	19	18	17	$31,00 \pm 1,26$	+++			
	I група	13	16	14	15	13	14	$33,17 \pm 1,94$	+++	*		
	II група	17	14	16	15	16	17	$32,67 \pm 1,63$	+++			
	III група	13	15	16	16	15	14	$33,83 \pm 1,47$	+++	*		***
30 доба	Контроль	22	21	20	21	19	22	$28,50 \pm 1,87$	++			
	I група	18	16	19	17	18	16	$31,17 \pm 1,47$	+++	*		
	II група	18	19	18	18	20	17	$30,67 \pm 1,37$	+++	*		
	III група	19	18	17	17	18	16	$31,67 \pm 1,75$	+++	*		
45 доба	Контроль	22	24	25	23	24	26	$25,17 \pm 1,47$	+			
	I група	19	17	20	18	21	20	$29,50 \pm 1,87$	++	*		
	II група	20	21	22	22	19	20	$28,50 \pm 1,05$	++	*		
	III група	21	20	19	21	18	17	$29,83 \pm 1,47$	++	*		
60 доба	Контроль	28	25	27	26	26	28	$22,67 \pm 1,63$	+			
	I група	20	19	22	22	23	21	$28,50 \pm 1,87$	++	*		
	II група	23	22	24	21	20	23	$26,67 \pm 1,63$	++	*		
	III група	21	22	20	21	22	19	$27,83 \pm 1,17$	++	*	**	

Примітка: показники представлені як Mean \pm SD (Standard Deviation), *p<0,05;**p<0,001 для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту.

p* - при порівнянні групи 1 з групами 2.1, 2.2, 2.3; p** - при порівнянні групи 2.1 з групами 2.2 і 2.3; p*** - при порівнянні групи 2.2 з групою 2.3 (за t-тестом Стьюдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А. 2.3.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) експресії остеопонтину
діафіза травмованих стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	Щури (n=6)						% позитивно забарвлених клітин у кістковому регенераті, $M \pm SD$	Інтенсивність позитивно забарвлених клітин	p*	p**	p****
15 доба	Контроль	16	19	20	19	18	17	18,17 ± 1,47	+			
	I група	13	16	14	15	13	14	14,17 ± 1,17	+	*		
	II група	17	14	16	15	16	17	15,83 ± 1,17	+	*	**	
	III група	13	15	16	16	15	14	14,83 ± 1,17	+	*		
30 доба	Контроль	22	21	20	21	19	22	20,83 ± 1,17	+			
	I група	18	16	19	17	18	16	17,33 ± 1,21	+	*		
	II група	18	19	18	18	20	17	18,50 ± 1,05	+	*		
	III група	19	18	17	17	18	16	17,50 ± 1,05	+	*		
45 доба	Контроль	22	24	25	23	24	26	24,00 ± 1,41	++			
	I група	19	17	20	18	21	20	17,47 ± 0,15	+	*		
	II група	20	21	22	22	19	20	19,17 ± 1,47	+	*		
	III група	21	20	19	21	18	17	20,67 ± 1,21	+	*		
60 доба	Контроль	28	25	27	26	26	28	26,67 ± 1,21	+++			
	I група	20	19	22	22	23	21	21,17 ± 1,47	++	*		
	II група	23	22	24	21	20	23	22,17 ± 1,47	++	*		
	III група	21	22	20	21	22	19	20,83 ± 1,17	++	*		

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), *p<0,05;**p<0,001 для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту.

p* - при порівнянні групи 1 з групами 2.1, 2.2, 2.3; p** - при порівнянні групи 2.1 з групами 2.2 і 2.3; p**** - при порівнянні групи 2.2 з групою 2.3 (за t-тестом Стьюдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А.3.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) показників рентгенівського мікроаналізу кісткового регенерату діафіза стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Таблиця А.3.1

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) показників рівня кальцію діафіза стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	Кістковий регенерат, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	Межа регенерату і материнської кістки, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	Материнська кістка, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}
15 доба	Контроль	$8,99 \pm 0,15$				$19,07 \pm 0,22$				$22,57 \pm 0,16$			
	I група	$4,3 \pm 0,13$	*			$17,88 \pm 0,21$	*			$19,23 \pm 0,20$	*		
	II група	$7,44 \pm 0,12$	*	**		$14,47 \pm 0,16$	*	**		$18,39 \pm 0,15$	*	**	
	III група	$5,75 \pm 0,19$	*	**	***	$15,05 \pm 0,19$	*	**	***	$17,55 \pm 0,19$	*	**	***
30 доба	Контроль	$9,87 \pm 0,19$				$18,69 \pm 0,15$				$21,57 \pm 0,22$			
	I група	$4,55 \pm 0,10$	*			$17,25 \pm 0,22$	*			$18,65 \pm 0,17$	*		
	II група	$7,72 \pm 0,15$	*	**		$14,14 \pm 0,16$	*	**		$17,65 \pm 0,19$	*	**	
	III група	$5,99 \pm 0,23$	*	**	***	$14,65 \pm 0,19$	*	**	***	$16,87 \pm 0,21$	*	**	***
45 доба	Контроль	$11,2 \pm 0,21$				$18,32 \pm 0,17$				$21,45 \pm 0,19$			
	I група	$5,15 \pm 0,17$	*			$17,47 \pm 0,15$	*			$18,45 \pm 0,17$	*		
	II група	$8,5 \pm 0,14$	*	**		$14,37 \pm 0,18$	*	**		$17,22 \pm 0,23$	*	**	
	III група	$6,65 \pm 0,19$	*	**	***	$14,84 \pm 0,22$	*	**	***	$16,95 \pm 0,19$	*	**	
60 доба	Контроль	$12,37 \pm 0,21$				$18,85 \pm 0,19$				$22,25 \pm 0,19$			
	I група	$6,72 \pm 0,2$	*			$17,68 \pm 0,21$	*			$18,78 \pm 0,18$	*		
	II група	$9,15 \pm 0,19$	*	**		$14,55 \pm 0,14$	*	**		$17,7 \pm 0,23$	*	**	
	III група	$7,34 \pm 0,16$	*	**	***	$14,97 \pm 0,16$	*	**	***	$17,3 \pm 0,24$	*	**	

Таблиця А.3.2.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) показників рівня фосфору
діафіза стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	Кістковий регенерат, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	Межа регенера- ту і материнсь- кої кістки, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	Материнська кістка, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}
15 доба	Контроль	4,3 ± 0,14				9,3 ± 0,14				13,05 ± 0,19			
	I група	2,8 ± 0,22	*			4,55 ± 0,17	*			9,85 ± 0,17	*		
	II група	4,15 ± 0,19	*	**		9,04 ± 0,16	*	**		10,10 ± 0,18	*	**	
	III група	3,39 ± 0,17	*	**	***	8,02 ± 0,19	*	**	***	11,27 ± 0,20	*	**	***
30 доба	Контроль	4,8 ± 0,18				9,14 ± 0,18				12,85 ± 0,19			
	I група	2,98 ± 0,21	*			4,4 ± 0,22	*			9,43 ± 0,22	*		
	II група	4,29 ± 0,23	*	**		8,79 ± 0,23	*	**		9,59 ± 0,21	*		
	III група	3,65 ± 0,19	*	**	***	7,65 ± 0,19	*	**	***	10,85 ± 0,19	*	**	***
45 доба	Контроль	5,3 ± 0,18				9,04 ± 0,16				12,55 ± 0,19			
	I група	3,65 ± 0,17	*			4,25 ± 0,17	*			9,65 ± 0,17	*		
	II група	4,95 ± 0,19	*	**		8,65 ± 0,19	*	**		10,09 ± 0,25	*	**	
	III група	4,14 ± 0,22	*	**	***	7,57 ± 0,18	*	**	***	10,69 ± 0,15	*	**	***
60 доба	Контроль	6,15 ± 0,19				9,22 ± 0,23				12,75 ± 0,19			
	I група	4,83 ± 0,16	*			4,88 ± 0,21	*			10,38 ± 0,21	*		
	II група	5,1 ± 0,24	*			9,34 ± 0,22	*	**		10,54 ± 0,22	*		
	III група	4,6 ± 0,18	*	**	***	7,8 ± 0,18	*	**	***	10,89 ± 0,23	*	**	***

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), * $p < 0,05$ для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту. p^* - при порівнянні контрольної групи з експериментальними групами I, II, III; p^{**} - при порівнянні I експериментальної групи з групами II і III експериментальними групами; p^{***} - при порівнянні II експериментальної групи з III експериментальною групою (за t-тестом Стьюдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А.4.

Дані варіаційно–статистичної обробки ($M \pm m$) показників оптичної щільності діафіза стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	ОЩ кісткового регенерату, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	ОЩ дистальної частини МК, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	ОЩ проксимальної частини МК, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}
15 доба	Контроль	646,50 ± 31,72				1849,30 ± 18,51				2463,00 ± 59,86			
	I група	444,33 ± 31,94	*			1553,50 ± 14,84	*			2287,00 ± 30,25	*		
	II група	503,50 ± 17,75	*	**		1378,50 ± 21,18	*	**		2029,50 ± 33,22	*	**	
	III група	398,00 ± 30,58	*	**	***	1258,50 ± 10,99	*	**	***	1983,00 ± 30,61	*	**	***
30 доба	Контроль	922,33 ± 33,15				2115,50 ± 33,85				2599,00 ± 53,48			
	I група	711,00 ± 27,49	*			1844,50 ± 21,82	*			2419,00 ± 36,52	*		
	II група	756,33 ± 32,16	*	**		1689,00 ± 30,48	*	**		2448,50 ± 24,42	*		
	III група	841,50 ± 23,49	*	**	***	1826,00 ± 20,17	*		***	2008,50 ± 25,70	*	**	***
45 доба	Контроль	1462,00 ± 30,89				2333,00 ± 39,27				2676,00 ± 28,30			
	I група	1098,00 ± 43,27	*			2164,00 ± 19,50	*			2465,50 ± 23,04	*		
	II група	1367,00 ± 20,67	*	**		2175,50 ± 42,09	*			2586,30 ± 26,79	*	**	
	III група	1327,00 ± 21,25	*	**	***	2087,50 ± 44,78	*	**	***	2256,00 ± 19,66	*	**	***
60 доба	Контроль	2150,00 ± 31,81				2983,00 ± 27,20				3071,00 ± 24,16			
	I група	1352,80 ± 25,18	*			2424,00 ± 27,67	*			2505,50 ± 27,85	*		
	II група	1655,00 ± 32,69	*	**		2329,50 ± 39,59	*	**		2647,50 ± 32,50	*	**	
	III група	1550,80 ± 21,33	*	**	***	2430,00 ± 32,06	*	**	***	2519,00 ± 14,68	*		***

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), * $p < 0,05$ для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту.

p^* - при порівнянні контрольної групи з експериментальними групами I, II, III; p^{**} - при порівнянні I експериментальної групи з групами II і III експериментальними групами; p^{***} - при порівнянні II експериментальної групи з III експериментальною групою (за t-тестом Ст'юдента для двох незалежних виборок)

Таблиця А.5.

Дані варіаційно–статистичної обробки біомеханічних показників: межі міцності на стиск та мікротвердості ($M \pm m$) кісткового регенерату діафіза стегнових кісток щурів зрілого віку ($n = 6$)

Доба експерименту	Група експерименту	Напруження при стисканні, МПА, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}	Мікротвердість кісткового регенерату, МПА, $M \pm SD$	p^*	p^{**}	p^{***}
15 доба	Контроль	95,53 ± 1,67				485,83 ± 36,22			
	I група	82,48 ± 6,71	*			413,33 ± 50,14	*		
	II група	81,96 ± 3,40	*			428,67 ± 34,79	*		
	III група	88,36 ± 2,90	*		***	441,00 ± 69,66		**	
30 доба	Контроль	102,21 ± 3,03				506,00 ± 19,33			
	I група	84,47 ± 4,47	*			415,83 ± 17,02	*		
	II група	87,18 ± 3,70	*			453,50 ± 18,11	*	**	
	III група	89,64 ± 3,70	*			443,17 ± 31,69	*		
45 доба	Контроль	110,88 ± 5,2				518,50 ± 12,60			
	I група	86,34 ± 4,29	*			417,50 ± 12,65	*		
	II група	92,48 ± 4,09	*	**		456,67 ± 13,41	*	**	
	III група	90,85 ± 3,35	*			445,00 ± 21,23	*	**	
60 доба	Контроль	120,24 ± 3,25				532,33 ± 18,18			
	I група	87,17 ± 4,89	*			418,67 ± 12,44	*		
	II група	98,02 ± 4,82	*	**		468,83 ± 18,57	*	**	
	III група	91,92 ± 2,91	*		***	446,50 ± 24,54	*	**	

Примітка: показники представлені як Mean±SD (Standard Deviation), * $p < 0,05$ для всіх параметрів при парних порівняннях показників на відповідну добу експерименту.

p^* - при порівнянні контрольної групи з експериментальними групами I, II, III; p^{**} - при порівнянні I експериментальної групи з групами II і III експериментальними групами; p^{***} - при порівнянні II експериментальної групи з III експериментальною групою (за t-тестом Ст'юдента для двох незалежних виборок)

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Рябенко Т. В., Понирко А. О. (Огляд літератури). Аналіз впливу злоякісних новоутворень на стан кісткової системи та з'ясування дії протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Буковинський медичний вісник*. 2020. Т. 24, № 1 (93). С. 243–249. DOI: 10.24061/2413-0737.
2. Рябенко Т. В. (Огляд літератури). Сучасні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини та аналіз показників кісткового метаболізму. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2020. Т. 5, № 3 (25). С. 89–98. DOI: 10.26693/jmbs05.03.089.
3. Рябенко Т. В., Кореньков О. В. Комп'ютерно-томографічна оцінка динаміки загоєння дефекту діафіза стегнової кістки в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2020. Т. 20, № 2 (70). С. 165–170. DOI: 10.31718/2077-1096.20.2.165.
4. Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Понирко А. О., Теслик Т. П., Гула В. І. Імуногістохімічний аналіз експресії катепсину К та остеопонтину клітинними елементами кісткової тканини регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2021; 2 (160). С. 236–34. DOI: 10.29254/2077-4214-2021-2-160-236-
5. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2021; 9 (3): 95-307. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2021; 9 \(3\): 295–307](https://doi.org/10.21272/eumj.2021; 9 (3): 295–307) (Особистий внесок: брала участь в опрацюванні даних, написанні статті, статистичному обробленні матеріалу).
6. Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Ковалюк Т. М. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; Т. 6, № 5 (33). С. 116–126. *VI Міжнародна науково-практична*

конференція з міжнародною участю. *Проблеми, досягнення та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук*. Миколаїв, 29 вересня 2021 р. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116

7. Riabenko T. V., Korenkov O. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Ponyrko A. A., Pernakov M. S., Hula V. I. Morphological features of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*. 2022; № 75 (3):P. 570–576. DOI: 10.36740/WLek202203102.

8. Riabenko T. V., Dmytruk S. M., Yarmolenko O. S., Pernakov M. S., Teslyk T. P., Ponyrko A. A., Gordienko O. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on mechanical properties of injured tubular skeletal bone. *Azerbaijan Medical Journal*. 2022. № 1. P. 117–124. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.019>.

9. Рябенко Т. В. Вплив протипухлинних хіміопрепаратів на регенерацію кісткової тканини. *Збірник тез доповідей VII Конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України*. –2019. Одеса. С. 283.

10. Riabenko T. V. The effect of antitumor chemotherapy on the healing of the femoral defect according to the results of computed tomography. *International Scientificand Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy, 2020. October «Biomedical perspectives II». P. 29.

11. Рябенко Т. В. Зміни механічних властивостей травмованих трубчастих кісток при дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Здобутки клінічної та експериментальної медицини: Збірник тез–доповідей*. м. Тернопіль, 11 червня 2021 р. С. 176–178.

12. Riabenko T. V. Influence of antitumor chemotherapeutics on bone metabolism in the area of long bone diaphysis defect. *International Scientificand Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific*. Sumy. 2021. October «Biomedical perspectives III». P. 24.

13. Рябенко Т. В. Особливості репаративної регенерації щурів та зміни рівня мікроелементів травмованих довгих трубчастих кісток в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. *II міжнародна наукова конференція «Здобутки та досягнення прикладних та фундаментальних наук XXI століття»*. Збірник тез доповідей. Рівне, 5 листопада 2021р. С. 65–66.

ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

Основні положення дисертаційної роботи викладено та обговорено на науково – практичних конференціях різного рівня:

1. VII конгрес наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України. (м. Одеса. 2-4 жовтня 2019 р., форма участі – публікація тез).

2. International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific. Sumy, October «Biomedical perspectives II». (м. Суми. 20 – 22 жовтня 2020 р., форма участі – постерна доповідь).

3. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. (м. Тернопіль. 11 червня 2021 р., форма участі – публікація тез).

4. International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientific. Sumy, October «Biomedical perspectives III». (м. Суми. 26 – 28 жовтня 2021р., форма участі – постерна доповідь).

5. II міжнародна наукова конференція «Здобутки та досягнення прикладних та фундаментальних наук XXI століття». (м. Рівне, 5 листопада 2021 р., форма участі – публікація тез).

6. VI Міжнародна науково-практична конференція з міжнародною участю. Проблеми, досягнення та перспективи розвитку медико-біологічних і спортивних наук. (м. Миколаїв, 29 вересня 2021 р. форма участі – публікація статті).

"ЗАТВЕРДЖУЮ"

Проректор з науково-педагогічної роботи
Буковинського державного
медичного університету
доц. Геруш І.В.

« 18 » 02 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфологічні аспекти репаративного остеогенезу за умов використання протипухлинної хіміотерапії.

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології. Автор: асистент кафедри морфології Рябенко Тетяна Василівна та співавтори.

3. Джерело інформації: Riabenko T.V., Korenkov A.V., Dmytruk S.M., Yarmolenko O.S., Ponyrko A.O, Pernacov M.S., Hula V.I. Morphological feature of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*. 2022;75(3):570-576. DOI: 10.36740/WLek202203102.

Рябенко Т.В., Кореньков О.В., Ковалюк Т. М. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021; Том 6, №5(33). С.116-126. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини імені М. Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету.

5. Термін впровадження: січень-лютий 2022 року.

6. Форма впровадження: введено у навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.

7. Зауваження та пропозиції: не поступило.

*Обговорено та затверджено на засіданні кафедри анатомії людини
ім. М.Г. Туркевича. Протокол № 27 від 18 лютого 2022 року.*

Завідувач кафедри анатомії людини
імені М.Г. Туркевича
Буковинського державного
медичного університету
доктор медичних наук, професор

В.В. Кривецький

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф:  Кліщ І. М.

2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфологічні аспекти репаративного остеогенезу за умов використання протипухлинної хіміотерапії.

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології. Автор: асистент кафедри морфології Рябенко Тетяна Василівна та співавтори.

3. Джерело інформації: Riabenko T.V., Korenkov A.V., Dmytruk S.M., Yarmolenko O.S., Ponyrko A.O, Pernacov M.S., Hula V.I. Morphological feature of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*. 2022;75(3):570-576. DOI: 10.36740/WLek202203102.

Рябенко Т.В., Кореньков О.В., Ковалюк Т.М. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. Український журнал медицини, біології та спорту. 2021; Том 6, №5(33). С.116-126. DOI: 10.26693/jmbs06.05.116

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

5. Форми впровадження: у наукову роботу кафедри, а також у матеріалах лекцій і практичних занять з гістології.

6. Термін впровадження: травень-червень 2022 року.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри анатомії людини
Тернопільського національного
медичного університету
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
д.мед.наук, професор

І. Є. Герасимюк

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор

Сумського державного університету

д.екон.н., проф. Лєонов С.В.

« 10 »

05

2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфологічні аспекти репаративного остеогенезу за умов використання протипухлинної хіміотерапії.

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології. Автор: асистент кафедри морфології Рябенко Тетяна Василівна та співавтори.

3. Джерело інформації: Riabenko T.V., Korenkov A.V., Dmytruk S.M., Yarmolenko O.S., Ponyrko A.O, Pernacov M.S., Hula V.I. Morphological feature of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*. 2022;75(3):570-576. DOI: 10.36740/WLek202203102.

Riabenko T.V. Influence of antitumor chemotherapeutics on the structure and phosphorus-calcium metabolism of injured long tubular skeletal bones. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2021; 9(3): 295-307. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9\(3\):295-307](https://doi.org/10.21272/eumj.2021;9(3):295-307)

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії Сумського державного медичного університету.

5. Форми впровадження: у наукову роботу кафедри, а також у матеріалах лекцій і практичних занять з патологічної анатомії.

6. Термін впровадження: травень-червень 2022 року.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної анатомії,

Сумського державного університету

д. мед. н., професор

А. М. Романюк

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького

д.мед.н., проф. А.Й. Наконечний

«11» 05 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: Морфологічні аспекти репаративного остеогенезу за умов використання протипухлинної хіміотерапії.

2. Установа-розробник: Сумський державний університет МОН України, кафедра морфології. Автор: асистент кафедри морфології Рябенко Тетяна Василівна та співавтори.

3. Джерело інформації: Riabenko T.V., Korenkov A.V., Dmytruk S.M., Yarmolenko O.S., Ponyrko A.O, Pernacov M.S., Hula V.I. Morphological feature of tubular bones reparative regeneration under the influence of antitumor chemotherapeutics. *Wiadomości Lekarskie*. 2022;75(3):570-576. DOI: 10.36740/WLek202203102.

Рябенко Т.В., Кореньков О.В. Комп'ютерно-томографічна оцінка динаміки загоєння дефекту діяфізу стегнової кістки в умовах дії протипухлинних хіміопрепаратів. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2020. том 20, №2(70). С.165-170. DOI: 10.31718/2077-1096.20.2.165

4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра нормальної анатомії людини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

5. Форми впровадження: у наукову роботу кафедри, а також у матеріалах лекцій і практичних занять з нормальної анатомії людини.

6. Термін впровадження: травень-червень 2022 року.

7. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри нормальної анатомії людини

Львівського національного медичного університету

імені Данила Галицького

д. мед. н., професор

Л. Р. Матешук-Вацеба

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Волинського національного
університету імені Лесі Українки

проф. Цьось А.В.

« 10 » 02 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертаційної роботи.
2. **Установа-розробник:** Сумський державний університет.
3. **Автор:** студент Сумського державного університету Ковалюк Тетяна Миколаївна.
4. **Науковий керівник:** асистент кафедри морфології Сумського державного університету Рябенко Тетяна Василівна.
5. **Джерело інформації:** наукова робота у вітчизняному фаховому виданні: Рябенко Т.В., Кореньков О.В., Ковалюк Т.М. Морфологічні аспекти репаративної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинної хіміотерапії. *Український журнал медицини, біології та спорту*. 2021. № 6 (5). С. 116–126.
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини Волинського національного університету імені Лесі Українки.
7. **Форми впровадження:** впроваджено у наукову роботу кафедри.
8. **Термін впровадження:** січень 2022 року – лютий 2022 року.

Професор кафедри
анатомії людини
Волинського національного
університету імені Лесі Українки,
доктор медичних наук,
професор

В. С. Пикалюк