МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»

Кваліфікаційна наукова

праця на правах рукопису

КУЗІВ ЄВГЕН ЛЮБОМИРОВИЧ

УДК [616.71-007.234-02:577.175.5]-021.6:616-085:[577.161.1+577.161.3]:001.891.53(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ ЗАСТОСУВАННЯ ВІТАМІНІВ D_3 ТА Е НА ЗМІНИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ КІСТКОВОЇ ТА ХРЯЩОВОЇ ТКАНИН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ГЛЮКОКОРТИКОЇД-ІНДУКОВАНІЙ ОСТЕОХОНДРОПАТІЇ

14.01.21 – травматологія і ортопедія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

_____Кузів Є. Л.

Науковий керівник:

д.мед.н., професор

Калашніков А.В.

Київ –2019

АНОТАЦІЯ

Кузів Є.Л. Вплив поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е на зміни структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин при експериментальній глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.21 – «Травматологія та ортопедія» – Міністерство охорони здоров'я України – ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, 2019.

В дисертації представлене нове вирішення наукової задачі суттєвого значення в галузі травматології та ортопедії – визначення та оцінка превентивного ефекту поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е на розвиток змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин при експериментальній глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії.

У відповідності до мети та завдань наукова робота носить експериментальних характер.

В експеримент було включено 68 щурів-самців лінійної породи Вістар віком 2 місяці з масою тіла 100,0±5,0 г після двотижневого знаходження на карантині. Перебування експериментальних тварини у віварію відповідало загальноприйнятим нормам щодо утримування лабораторних тварин. Експериментальні тварини були розділені на чотири дослідні групи по 17 щурів у кожній. Всім тваринам протягом 30 діб спостереження щоденно виконували пероральне введення відповідної діючої речовини за допомогою зонду з оливою.

Інтактні тварини (I серія) щоденно отримували по 0,5 мл 0,9 % розчину хлориду натрію. Тваринам II серії вводили розчин преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла. У цих тварин вивчали вплив тривалого введення преднізолону на мінеральний та D-вітамінний обміни, на

структурно-функціональну організацію тканинних структур кістки, суглобового та епіфізарного хрящів.

Тваринам III серії, аналогічно до тварин II серії, вводили щоденно таку ж дозу преднізолону, а також, додатково, 100 МО вітаміну D_3, з метою визначення профілактичної дії вітаміну D щодо розвитку порушень мінерального та D-вітамінного обміну, структурно-функціональної організації кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів на фоні тривалого введення преднізолону.

Експериментальні тварини IV серії отримували щоденно зазначені дози преднізолону, вітаміну D_3 та, додатково, 0,726 МО (0,6 мг) вітаміну Е. Метою при цьому стала оцінка можливого потенціювання профілактичної дії вітаміну D_3 вітаміном Е щодо змін мінерального та D-вітамінного обміну, структурно-функціональної організації кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів на фоні тривалого введення преднізолону.

Протягом експерименту спостерігали за тваринами, оцінюючі їх стан за наступними параметрами: рухова активність, поїдання кормів, стан хутряного покриву. Після завершення експерименту тварин зважували, проводили забір крові для визначення біохімічних показників. Після виведення тварин з експерименту проводили забір матеріалів для гістоморфологічних та гістоморфометричних досліджень

З-поміж біохімічних досліджень, у експериментальних тварин у крові визначали рівень кальцію та фосфору, активність лужної фосфатази (ЛФ) та її ізоферментів, рівень вітаміну D_3 ($25(OH)D_3$). Також у тварин досліджували зольність кісткової тканини, вміст кальцію і фосфору в золі кісткової тканини.

Остеометричні дослідження стегнової кістки включали вимірювання її довжини та товщини. Після цього з неї за відповідною гістологічною технологією готовили фронтальні зрізи проксимального епіметафіза, а також поперечні зрізи із середньої третини діафіза, які фарбували

гематоксиліном та еозином, а також – гематоксиліном та пікрофуксином за Ван Гізоном. Після гістологічного дослідження визначали низку гістоморфометричних показників: кістковий об'єм вторинної спонгіози проксимального епіметафіза стегнової кістки; площу компактної кісткової тканини у поперечних зрізах середини діафіза; питоме число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортекса; товщину суглобового та епіфізарного хрящів; питому кількість хондроцитів на одиницю площі зрізу хрящів у тестовому вікні; кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу в зрізах суглобового та епіфізарного хрящів.

У експериментальних тварин після 30-денного курсу преднізолону відзначено погіршення загального стану, рухової активності, зменшення інтенсивності поїдання кормів, втрата блискоту хутра в порівнянні з серією інтактних тварин. У них відзначені суттєво нижчі ($p \leq 0,001$) маса тіла ($p \leq 0,001$) (160,0±3,6 г проти 190,0±4,0 г), маса великогомілкової кістки (229,7±1,9 мг проти 254,6±4,0), менша довжина і товщина стегнової кістки (28,81±0,25 мм та 3,07±0,04 мм проти 31,01±0,05 мм та 3,49±0,06 мм відповідно). Також у тварин II серії мали місце суттєво менші ($p \leq 0,05$) середні значення таких показників як зольність кісткової тканини (53,3±0,1 % проти 59,5±1,2 %), вміст кальцію у золі великогомілкової кістки (15,7±0,4 мг/100 мг тканини проти 19,4±0,3 мг/100 мг тканини), вміст фосфору у золі великогомілкової кістки (9,2±0,1 мг/100 мг тканини проти 10,8±0,2 мг/100 мг тканини). Достовірно відмінними ($p \leq 0,05$) у цих тварин в порівнянні з інтактними виявились середні параметри вмісту кальцію в плазмі крові (1,91±0,02 ммоль/л проти 2,29±0,03ммоль/л), фосфору (1,82±0,02 ммоль/л проти 2,20±0,03 ммоль/л), лужної фосфатази (347,0±0,5 Од/л проти 235,0±0,5 Од/л) кількості $25(OH)D_3$ (7,9±0,2 нг/л проти 38,1±1,2 нг/л). У тварин II серії в порівнянні з інтактними тваринами у гістологічних зрізах компактної кісткової тканини та остеонних структурах діафіза були визначені ознаки порушення процесів формування, що

проявлялися зниженням щільності кісткової тканини, виникненням ділянок з численними щілинами та порожнинами, а також втратою можливості аппозиційного росту і формування систем пластинчастої будови кісткової тканини, внутрішніх та зовнішніх шарів генеральних кісткових пластинок. Щодо гістоморфологічних змін суглобового хряща, то було відзначене зниження інтенсивності фарбування клітинних елементів, а також збільшенням ділянок хрящового матриксу в проміжній та глибокій зонах, що не містили хондроцитів, при цьому зональна структура суглобового хряща була збереженою. В епіфізарному хрящі спостерігалися зменшення його товщини і порушення зональної будови, повна зупинка ендохондріального окостеніння та повздовжнього росту, порушення формування структури кісткових перекладок епіфіза та метафіза. Серед гістоморфометричних показників різнились такі параметри з відповідними показниками інтактних тварин: площа компактної кісткової тканини (1,88±0,16 мм^2 проти 2,37±0,15 мм^2) ($p \leq 0,05$), товщина суглобового хряща (0,160±0,006 мм проти 0,208±0,036 мм), питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі (2982,4±712,1 /1 мм^2 проти 2383,2±398,2 /1 мм^2), питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі (4381,9±380,3 /1 мм^2 проти 4106,6±163,2 /1 мм^2), кількість великих ділянок хрящового матриксу (2,333±0,558 проти 1,600±0,400). Всі визначні структурно-функціональні зміни кісткової та хрящової тканин у тварин, що отримували преднізолон, засвідчили про адекватність експериментальної моделі глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії, а також про можливість її використання для оцінки дії профілактичних або лікувальних медичних засобів при зазначеному патологічному стані.

Загальний стан щурів, у яких моделювали остеохондропатію на фоні прийому вітаміну D_3 (III серія) та поєднаному прийомі вітамінів D_3 та Е (IV серія), через 30 діб експерименту практично не відрізнявся від інтактних тварин. На відміну від тварин, у яких остеохондропатія розвивалась тільки під дією преднізолону (II серія), ці тварини залишались

рухливими, активно поїдали корма, їх хутряний покрив не відрізнявся від хутряного покриву тварин І серії дослідів. Визначена маса великогомілкової кістки у тварин, що отримували одночасно вітаміни D_3 та Е, була більшою ($p \leq 0,05$) ніж у тварин, яким вводили тільки вітамін D_3. При цьому середні параметри маси великогомілкової кістки, довжини і товщини стегнової кістки у тварин ІІІ та ІV серій відрізнялись від відповідних показників тварин ІІ серії. Такі ж відмінності встановлено і для показників зольності кісткової тканини, вмісту кальцію і фосфору в золі великогомілкової тканини. Але, при цьому показники зольність кісткової тканини (59,8±0,3 % проти 58,3±0,7 %), вмісту кальцію в золі кістки (32,1±0,4 % проти 30,6±0,3 %) тварин ІV серії суттєво різнились з відповідними, визначеними для тварин ІІІ серії дослідів. Подібна ж закономірність відзначена і для таких показників плазми крові як кількість кальцію (2,26±0,02 ммоль/л проти 2,20±0,03 ммоль/л), лужної фосфатази (260,0±1,0 Од/л проти 273,0±0,2 Од/л) та $25(OH)D_3$ (50,0±1,2 нг/мл проти 24,2±2,0 нг/мл). Зазначені вище зміни цих показників засвідчили про посилену дію поєднаного превентивного введення вітамінів D_3 та Е в порівнянні з введенням лише вітаміну D_3.

Гістоморфологічні структури компактної кісткової тканини, суглобового хряща головки та епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки у тварин, що отримували одночасно вітаміни D_3 та Е, в порівнянні з тваринами ІІІ серії, виявились більш наближеними до структур відповідних анатомічних утворень, що були визначені у тварин інтактної серії дослідів. Отримані гістоморфологічні ознаки були підтверджені низкою гістоморфометричних показників. Кістковий об’єм вторинної спонгіози метафіза стегнової кістки найбільшим був у тварин ІV серії і відрізнявся ($p \leq 0,1$) від середнього параметра ІІІ серії дослідів (44,18±1,53 % проти 40,92±1,68 %), обидва ці параметри були вищими, ніж у І та ІІ серіях. У ІІІ та ІV серіях середні параметри площі компактної кісткової тканин середини діафіза стегнової кістки були близькими між

собою, але при цьому вищими за параметр II серії тварин. Через 30 діб експерименту в IV серії тварин товщина суглобового хряща склала 0,177±0,007 мм, в III серії – 0,172±0,006 мм, в обох серіях ці параметри були меншими за параметри тварин серії інтактних і дещо вищими за параметр тварин II серії. Середні параметри питомої кількості хондроцитів в суглобовому хрящі тварин IV та III серій, що отримували вітаміни, відповідно склали 2592,0±150,9 одиниць на мм^2 та 2603,9±169,9 одиниць на мм^2, достовірної різниці між ними не визначено ($p>0,05$). Обидва ці параметри були меншими за відповідний параметр, визначений в II серії тварин і наближалися до середнього значення у групі інтактних тварин ($p>0,05$). Кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу в суглобовому хрящі виявилась найбільшою в IV серії тварин і дорівнювала 17,614±0,526 одиниць. Цей середній параметр суттєво відрізнявся від відповідного в III серії дослідів ($p\leq0,002$), де він склав 8,071±0,960 одиниць і був достовірно більшим за параметри тварин I серії (12,17±0,68, $p<0,001$) та II серії дослідів (11,857±1,326, $p<0,002$). Середні параметри товщини епіфізарного хряща, визначені у IV та III серіях тварин, була близькими ($p>0,05$) і склали відповідно 0,152±0,00075 мм та 0,150±0,0093 мм. Обидва ці параметри були меншими за відповідні, визначені в I та II серіях дослідів ($p>0,05$). Найнижчим параметр питомої кількості хондроцитів через 30 діб експерименту виявився в IV серії тварин: 3744,4±269,1 одиниць на мм^2, у III серії він склав 4272,3±244,7 одиниць на мм^2 і був дещо вищим за параметр інтактних тварин, але нижчим за параметр щурів II серії. Тільки показники III і IV серій достовірно різнились один від одного ($p\leq0,05$). Середній параметр кількості ділянок інтертериторіального хрящового матриксу епіфізарного хряща тварин IV серії максимально був наближеним до відповідного показника тварин інтактної групи і склав 1,667±0,333 ділянок. Даний параметр в III серії тварин склав 2,600±0,510 ділянок і був достовірно вищим за показник, визначений у тварин IV серії дослідів.

Ключові слова: глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія, мінеральний та D-вітамінний обмін, гістоморфологічні та гістоморфометричні показники компактної кісткової тканини, суглобовий хрящ, епіфізарний хрящ.

SUMMARY

Kuziv Ye.L. Effect of combined use of vitamins D_3 and E on changes in the structural and functional state of bone and cartilage tissues in experimental glucocorticoid-induced osteochondropathy. – Qualifying scientific work copyrighted as a manuscript.

Thesis for a Candidate of Medical Sciences degree in specialty 14.01.21 - "Traumatology and Orthopedics" – Ministry of Health of Ukraine – Institute of Traumatology and Orthopedics of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation presents a new solution to the scientific problem of essential importance in the field of traumatology and orthopedics - the definition and evaluation of the preventive effect of the combined use of vitamins D_3 and E on the development of changes in the structural and functional state of bone and cartilage tissues in experimental glucocorticoid-induced osteochondropathy.

The work has the experimental character in accordance with scientific aim and objectives

68 male rats, 2 months old, with a weight of 100,0 ± 5,0 g after two weeks of quarantine, were included in the experiment. The presence of experimental animals in vivarium was in accordance with generally accepted standards for the maintenance of laboratory animals. Experimental animals were divided into four experimental groups of 17 rats in each. The administration of the appropriate active ingredient by means of a probe with olive was performed orally daily for all animals for 30 days of observation.

Intact animals (Series I) received daily 0,5 ml of 0,9% sodium chloride solution. Animals of the second series received a solution of prednisolone at a dose of 0,5 mg/100 g body weight. In these animals, the effect of prolonged administration of prednisolone on mineral and D-vitamin metabolism, on the structural and functional organization of bone tissue, articular and epiphyseal cartilages were studied.

Animals of the III series, similar to the animals of the second series, received the same daily dose of prednisolone as well as, in addition, 100 IU of vitamin D_3, in order to determine the prophylactic action of vitamin D_3 in relation to the development of disorders of mineral and D-vitamin metabolism, structural and functional organization of bone tissue, articular and epiphyseal cartilage on the background of prolonged administration of prednisolone.

Experimental animals of the IV series received daily doses of prednisolone, vitamin D_3 and, additionally, 0,726 IU (0,6 mg) of vitamin E. The purpose of this was to assess the possible potentiation of the preventive action of vitamin D_3 by vitamin E on changes in mineral and D-vitamin metabolism, structural and functional organization of bone tissue, articular and epiphyseal cartilage against the background of prolonged administration of prednisolone.

During the experiment, the animals were observed, assessing their condition by the following parameters: motor activity, eating of food, condition of the fur. After the experiment, the animals were weighed and blood samples were taken to determine the biochemical parameters. After the animals were extracted from the experiment, a selection of materials for histomorphological and histomorphometric studies was performed.

Among the biochemical studies, in the experimental animals in the blood, the level of calcium and phosphorus, the activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes, and the level of vitamin D_3 ($25(OH)D_3$) were determined. Ash content of bone tissue, calcium and phosphorus content in bone ash were also studied in all animals.

Osteometric studies of the femur included measurement of its length and thickness. Subsequently, from the corresponding histological technology, the front sections of the proximal epimethaphysis were prepared, as well as transverse cuts from the middle third of the diaphysis, stained with hematoxylin and eosin, as well as hematoxylin and picrofusin for Van Gyzon. After histological examination, a number of histomorphometric parameters were determined: bone volume of secondary spongiosis of proximal epiphysis of the

femur; the area of compact bone tissue in transverse sections of the middle of the diaphysis; specific number of cross sections of the vascular channels per unit area of the test site of the tissue of the cortex; the thickness of articular and epiphyseal cartilage; specific number of chondrocytes per unit area of cartilage cut in the test window; number of large sections of interterritorial cartilage matrix in sections of articular and epiphyseal cartilage.

In experimental animals, after a 30-day course of prednisolone, deterioration of the general condition, motor activity, reduced intake of food, loss of glitter of fur compared with a series of intact animals were noted. They indicated significantly lower body mass ($p \leq 0,001$) ($p \leq 0,001$) (160,0 ± 3,6 g versus 190,0 ± 4,0 g), tibia mass (229,7 ± 1,9 mg vs. 254,6 ± 4,0), smaller length and thickness of the femur (28,81 ± 0,25 mm and 3,07 ± 0,04 mm versus 31,01 ± 0,05 mm and 3,49 ± 0,06 mm respectively). Also in animals of the second series there were significantly less ($p \leq 0.05$) mean values of such parameters as bone tissue ash (53,3 ± 0,1% vs. 59,5 ± 1,2%), calcium content in tibia ash (15,7 ± 0,4 mg/100 mg of tissue against 19,4 ± 0,3 mg/100 mg of tissue), the content of phosphorus in the ash of the tibia (9,2 ± 0,1 mg/100 mg tissue versus 10,8 ± 0,2 mg/100 mg of tissue). Compared to intact, significantly different ($p \leq 0,05$) in these animals had average parameters of calcium content in blood plasma (1,91 ± 0,02 mmol/l versus 2,29 ± 0,03 mmol/l), phosphorus (1,82 ± 0,02 mmol/l versus 2,20 ± 0,03 mmol/l), alkaline phosphatase (347,0 ± 0,5 units/l vs. 235,0 ± 0,5 units/l) of $25(OH)D_3$ (7,9 ± 0,2 ng/l versus 38,1 ± 1,2 ng/l). In Animals II series, in comparison with intact animals, in histological sections of compact bone tissue and osteonal structures of the diaphysis, signs of violation of formation processes were revealed, which were manifested by a decrease in the density of bone tissue, the emergence of areas with numerous cracks and cavities, as well as the loss of the possibility of appositional growth and formation of systems lamellar bone structure, internal and external layers of general bone plates. Regarding histomorphological changes in articular cartilage, there was a decrease in the intensity of dying of cellular elements, as

well as an increase in the sites of cartilage matrix in the intermediate and deep zones that did not contain chondrocytes, while the zonal structure of articular cartilage was preserved. In epiphyseal cartilage, there was a decrease in its thickness and violation of zonal structure, complete stop of endochondral ossification and longitudinal growth, violation of the formation of the structure of bone remnants of epiphysis and metaphysis. Among the histomorphometric indices, the following parameters with the corresponding indices of intact animals varied: the area of compact bone tissue (1,88 ± 0,16 mm^2 vs. 2,37 ± 0,15 mm^2) ($p \leq 0,05$), the thickness of the articular cartilage (0,16 ± 0,03 mm against 0,21 ± 0,04 mm), specific number of chondrocytes in articular cartilage (2982 ± 712 / mm^2 vs. 2383 ± 398 / mm^2), specific number of chondrocytes in epiphyseal cartilage (4381 ± 380 / mm^2 vs. 4106 ± 163 / mm^2), the number of large sections of the cartilaginous matrix (2,33 ± 0,56 versus 1,60 ± 0,40). All significant structural and functional changes in bone and cartilage tissues in animals receiving prednisolone have shown the adequacy of the experimental model of glucocorticoid-induced osteochondropathy, as well as the possibility of its use for the evaluation of the action of prophylactic or therapeutic medical devices at a specified pathological state.

The general condition of the rats in which the osteochondropathy was modeled on the background of vitamin D_3 intake (series III) and the combined intake of vitamins D_3 and E (series IV), after 30 days of the experiment, practically did not differ from intact animals. Unlike animals, in which osteochondropathy developed only under the action of prednisolone (series II), these animals remained mobile, actively eaten food, their fur coat did not differ from the fur of animals of series I of experiment. The mass of the tibia in animals receiving both vitamins D_3 and E was higher ($p \leq 0,05$) than in animals administered only vitamin D_3. At the same time, the average parameters of the tibia mass, length, thickness of the femur in the animals of the III and IV series differed from the corresponding indices of animals of the second series. The same differences are found for the bone tissue ash content, calcium and

phosphorus content in the ash of the tibia. However, in this case, the ash content of bone tissue (59,8 ± 0,3 % vs. 58,3 ± 0,7 %), calcium content in bone ash (32,1 ± 0,4 % versus 30,6 ± 0,3 %) animals of the IV series differed substantially from the corresponding, determined for animals of the III series of experiments. A similar pattern is noted for such parameters of blood plasma as the amount of calcium (2,26 ± 0,02 mmol/l versus 2,20 ± 0,03 mmol/l), alkaline phosphatase (260,0 ± 1,0 units/liter against 273,0 ± 0,2 units/liter) and 25(OH)D_3 (50,0 ± 1,2 ng/ml versus 24,2 ± 2,0 ng/ml). The above changes in these indicators have shown an enhanced effect of combined preventive administration of vitamins D_3 and E compared to the introduction of vitamin D_3 alone.

The histomorphological structures of compact bone tissue, articular cartilage of the head and epiphyseal cartilage of the proximal epithetic epiphysis of the femur in the animals receiving both vitamins D_3 and E in comparison with the animals of the III series were more closely related to the structures of the corresponding anatomical formations identified in the animals of the intact series experiments. The obtained histomorphological features were confirmed by a number of histomorphometric indices. The bone volume of the secondary spongiosum of the metaphysis of the femoral bone was greatest in animals of the IV series and was different ($p \leq 0,1$) from the average parameter of the III series of experiments (44,18 ± 1,53% vs. 40,92 ± 1,68%), both of these parameters were higher than in the first and second series. In III and IV series, the average parameters of the area of compact bone tissue in the middle of the diaphysis of the femur were close, but at the same time higher than the parameter of the second series of animals. After 30 days of the experiment in the IV series of animals, the thickness of the articular cartilage was 0,177±0,007 mm, in the III series – 0,172±0,006 mm, in both series these parameters were smaller than those of the series of intact animals and somewhat higher than parameter of animals of the second series. The average parameters of the specific number of chondrocytes in the articular cartilage of the IV and III series of vitamins were 2592,0±150,9 units per mm^2 and 2603,9±169,9 units per mm^2,

the true difference between them was not determined (p>0,05). Both of these parameters were smaller than the corresponding parameter defined in the second series of animals and were close to the mean value in the group of intact animals (p> 0,05). The number of large sections of the interterritorial cartilaginous matrix in the articular cartilage was highest in the IV series of animals and was 17,614±0,526 units. This average parameter significantly differed from that in the third series of experiments (p≤0,002), where it was 8,071±0,960 units and was significantly higher than the parameters of animals of the I series (12,17 ± 0,68, p≤0,001) and of the second series of experiments (11,857±1,326, p <0,002). The average parameters of the thickness of the epiphyseal cartilage, defined in the IV and III series of animals, were close (p>0.05) and were respectively 0,152 ± 0,0075 mm and 0,150 ± 0,0093 mm. Both of these parameters were smaller than the corresponding ones defined in the series I and II (p>0,05). The lowest parameter of the specific number of chondrocytes after 30 days of experiment was in the IV series of animals: 3744,4 ± 269,1 units per mm^2, in the III series it was 4272,3 ± 244,7 units per mm^2 and was slightly higher than the parameter of intact animals, but lower than the parameter of rats of the second series. Only indicators of series III and IV were significantly different from each other (p≤0,05). The average parameter of the number of sites of interterritorial cartilage matrix of epiphyseal cartilage of animals of the series IV was as close as possible to the corresponding index of animals intact group and made 1,667 ± 0,333 sites. This parameter in the 3rd series of animals was 2,600 ± 0,510 sites and was significantly higher than the animal IV series of experiments..

Keywords: glucocorticoid-induced osteochondropathy, mineral and D-vitamin metabolism, histomorphological and histomorphometric indices of compact bone tissue, articular cartilage, epiphyseal cartilage.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Калашніков А. В., Бруско А. Т., Кузів Є. Л., Вільцанюк О. О., Апуховська Л. І. Морфологічні зміни суглобового і проксимального епіфізарного хрящів та діафіза стегнової кістки щурів при короткотриваломоу введенні преднізолону. Вісник морфології. 2015; 2(21): С. 303-307.

(Особистий внесок дисертанта полягає у виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

2. Калашніков А. В., Апуховська Л. І., Кузів Є. Л., Вільцанюк О. О. Вплив преднізолону на мінеральний та D-вітамінний обмін при його короткотривалому введенні. Biomedical and Biosocial Antropology. 2015; 25: 16-19.

(Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

3. Калашніков А. В., Апуховська Л. І., Кузів Є. Л. Вплив вітаміну D3 на мінеральний та D-вітамінний обмін при поєднаному введенні з перднізолоном. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2017; 2(21): 370-374. (Журнал включений до міжнародної інформаційної науковометричної бази Google Scholar).

(Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

4. Калашніков А. В., Бруско А. Т., Кузів Є. Л. Морфологічна та морфометрична характеристика змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканини при поєднаному введенні вітаміну D3 з преднізолоном. Вісник морфології. 2017; 2(23): 207-211.

(Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

5. Калашніков А. В., Кузів Є. Л. Остеопороз та глюкокортикоїд-індукований остеопороз – медико-соціальна проблема. Biomedical and BiosocialAntropology. 2017; 28: 193-197.

(Особистий внесок дисертанта полягає у зборі літературних джерел, оформленні і підготовці статті до друку).

6. Григоровський В. В., Калашніков А. В., Кузів Є. Л., Апуховська Л. І. Гістопатологія, морфометричні показники кісток, суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті. Патологія. 2018; 2(43): 128-135. (Журнал включений до міжнародних інформаційних науковометричних баз Google Scholar, World Cat, Cite Factor, Science Index, OAJI, SCIARY).

(Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

7. Григоровський В. В., Калашніков А. В., Кузів Є. Л. Показники структурно-функціонального стану губчастої та компактної кістки та їхня кореляція за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу в умовах застосування вітамінів Dта Е. Вісник ортопедії, травматології та протезування. 2018; 1: 15-26. (Журнал включений до міжнародної інформаційної науковометричної бази РИНЦ).

(Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку).

8. Кузів Є. Л. Остеопороз та глюкокортикоїдіндукований остеопороз – медико-соціальна проблема. Збірник наукових праць Української військово-медичної академії. Випуск 48. Київ, 2017. с. 202-210.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 20
ВСТУП 21
РОЗДІЛ 1. ПРОБЛЕМА ОСТЕОПОРОЗУ: СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ, ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ 28
1.1. Остеопороз та глюкокортикоїд-індукований остеопороз – медико-соціальна проблема 28
1.2. Патогенетичні аспекти розвитку остеопорозу і глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу 33
1.3. Основні напрямки діагностики та лікування остеопорозу та глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу 43
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 53
2.1. Характеристика об’єктів експериментального дослідження 53
2.2. Методи біохімічного дослідження 55
2.3. Методики морфометричного та гістоморфометричного дослідження 56
2.4. Статистична обробка отриманих результатів 59
РОЗДІЛ 3. СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ, СУГЛОБОВОГО ТА ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ ПРЕДНІЗОЛОНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ 60
3.1. Вплив преднізолону на загальний стан, масу тіла та остеометрічні показники у експериментальних тварин 60
3.2. Зміни мінеральної щільності кісткової тканини та біохімічних показників у експериментальних тварин після проведення їм тривалого курсу преднізолону 61
3.3. Морфологічна будова діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарного хрящів у інтактних тварин 64
3.4. Зміни морфологічної будови діафіза стегнової кістки, 68

суглобового і проксимального епіфізарного хрящів під впливом преднізолону

3.5. Гістоморфометричні показники кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів у інтактних тварин та у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією 72

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ВІТАМІНІВ D_3 ТА Е НА МІНЕРАЛЬНИЙ ТА D-ВІТАМІННИЙ ОБМІН НА ФОНІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕДНІЗОЛОНУ 83

4.1. Зміни загального стану, маси тіла та остеометричних показників у експериментальних тварин під дією вітамінів D_3 та Е при тривалому застосуванні преднізолону 83

4.2. Мінеральна щільність кісткової тканини та біохімічні показники при експериментальній остеохондропатії, що розвивалась на фоні прийому вітаміну D_3 та одночасного прийому вітамінів D_3 та Е 85

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ВІТАМІНІВ D_3 ТА Е НА МОРФОЛОГІЧНУ БУДОВУ ДІАФІЗА СТЕГНОВОЇ КІСТКИ, СУГЛОБОВОГО І ПРОКСИМАЛЬНОГО ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГЛЮКОКОРТИКОЇД-ІНДУКОВАНОЇ ОСТЕОХОНДРОПАТІЇ 90

5.1. Зміни гістоморфологічної будови діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарного хрящів при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії з превентивним застосуванням вітаміну D_3 90

5.2. Зміни гістоморфологічної будови діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарнго хрящів при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії з превентивним одночасним застосуванням вітамінів D_3 та Е 93

5.3. Зміни гістоморфометричних показників кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів при моделюванні 97

глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії на фоні превентивного застосування вітаміну D_3 окремо та вітамінів D_3 та Е одночасно

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ 108

ВИСНОВКИ 120

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 122

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ 123

ДОДАТОК 146

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГІО – глюкокортикоїд індукований остеопороз

ГІОХП – глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія

ГК – глюкокортикоїди

ГК-індукована остеохондропататія –глюкокортикоїд-індукована остехондропатія

ОП – остеопороз

ЛФ – лужна фосфатаза

МЩКТ – мінеральна щільність кісткової тканини

25(OH) D3 – 25-гідроксихолекальціферол

ВСТУП

Актуальність теми. Остеопороз (ОП), як первинний, так і вторинний є одним із найбільш розповсюджених захворювань, що займає провідне місце в структурі захворюваності і смертності населення. За даними ВООЗ він є другою за значущістю хворобою після серцево-судинних захворювань [1, 2, 3, 4, 5]. За даними Міжнародного фонду остеопорозу біля 200 млн людей в світі страждають на ОП [6, 7, 8, 9]. Кожна третя жінка і кожний восьмий чоловік старше 50 років рано чи пізно протягом свого життя мають переломи кісток, що пов'язані з розвитком цього патологічного процесу [4]. Показник смертності протягом першого року у хворих після перелому проксимального відділу стегна досягає рівня 20 – 40 %, а інвалідність – 100 % [1, 10, 11, 12]. Щодо хребців, то частота їх переломів складає в середньому 4,9 % і 7,6 % у чоловіків і у жінок відповідно [1]. В США витрати на лікування ОП і зумовлені ним переломи складають 14 – 17 млрд доларів на рік [1]. В Україні кількість хворих на ОП є більшою за 3 млн осіб (2,5 млн – жінки, 900 тис. – чоловіки), тобто кожен 4-й дорослий мешканець нашої країни страждає на цю патологію [7, 11].

На сьогодні глюкокортикоїди (ГК) є однією з головних причин в розвитку тяжкої форми вторинного остеопорозу – глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу (ГІО). Ця патологія займає не лише перше місце в етіологічній структурі вторинного ОП, але і обумовлює більше половини усіх випадків ОП у молодому віці. [13, 14, 15]. ГІО характеризується швидкою втратою кісткової маси і підвищенням вірогідності переломів вже в ранні терміни після початку ГК-терапії, що викликає необхідність у первинній профілактиці переломів у пацієнтів групи високого ризику, що отримують стероїди [13, 16, 17, 18, 19].

Рівень ефективності при використанні сучасних препаратів для профілактики і лікування ОП дозволяє зменшити ризик виникнення малотравматичних (низькоенергетичних) переломів різної локалізації

приблизно на 50 %. З огляду на це, в даний час, дослідження, що мають на меті пошук нових засобів і способів профілактики та лікування такого соціально-значущого захворювання, яким є ОП, залишаються актуальними [8].

В останні роки серед інших лікарських засобів профілактики та терапії ГІО важливе місце займають препарати вітамінів D та Е. В Україні, як і в усьому світі, продовжують проводитись дослідження з вивчення впливу цих вітамінів на процеси розвитку ГІО, зокрема, їх дії на активність остеобластів і остеокластів, на процеси ремоделювання кісткової тканини та показники мінерального обміну [6, 20, 21, 22].

Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених проблемі ГІО, його профілактики та лікування, робіт, проведених на експериментальному матеріалі із залученням комплексу біохімічних, остеометричних, гістологічних та гістоморфологічних показників для вивчення запобіжного впливу вітамінів D та Е на структурно-функціональні властивості компактної та губчастої кістки, на суглобовий та епіфізарний хрящі, раніше не проводилось. Саме ця обставина і спонукала нас до проведення даного наукового дослідження.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами: Дисертаційне дослідження виконано відповідно з планом науково-дослідної роботи ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» та є фрагментом планової комплексної теми «Розробити технологію використання автолітичних матеріалів сполучної тканини для оптимізації репаративного остеогенезу після переломів кісток», за № 0108U000140 державної реєстрації.

Мета дослідження: визначити та оцінити превентивні ефекти поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е на розвиток змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин при експериментальній глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії.

Завдання дослідження:

1. Дослідити показники мінерального та D-вітамінного обміну, гістологічну будову та гістоморфометричні показники кортекса діафіза, суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки у експериментальних тварин після моделювання у них глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії.

2. Дослідити дію поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е на зміни показників мінерального та D-вітамінного обміну у експериментальних тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією та порівняти її з відповідною дією при застосуванні лише вітаміну D_3.

3. Дослідити зміни гістоморфологічної будови та гістоморфометричних показників діафіза стегнової кістки у експериментальних тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією на фоні застосування вітамінів D_3 та Е і провести їх порівняння з відповідними показниками у тварин з глюкокортикоїдною остеохондропатією на фоні застосування тільки вітаміну D_3.

4. Вивчити гістоморфологічні та гістоморфометричні показники суглобового хрящя проксимального епіметафіза стегнової кістки у експериментальних тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією на фоні поєднаного використання вітамінів D_3 та Е та провести їх порівняння з відповідними показниками, визначеними у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією, в яких з метою профілактики був застосований лише вітамін D_3.

5. Вивчити гістоморфологічні та гістоморфометричні показники епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки у експериментальних тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією на фоні застосування вітамінів D_3 та Е і провести їх порівняння з відповідними показниками, визначеними у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією, в яких був застосований тільки вітамін D_3.

Об'єкт дослідження – біологічна модель глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії.

Предмет дослідження – показники мінерального та D-вітамінного обміну, остеометричні, гістоморфологічні та гістоморфометричні показники компактної кісткової тканини, суглобового хряща та епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки при експериментальній глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії, профілактична дія вітаміну D_3 та поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остехондропатії.

Методи дослідження:

Біохімічні методи. Визначення зольності кісткової тканини, вмісту кальцію і фосфору в золі великогомілкової кістки, визначення кількості кальцію, фосфору, лужної фосфатази, $25(OH)D_3$ в плазмі крові експериментальних тварин.

Остеометричні методи. Визначення маси тіла тварин, маси великогомілкової кістки, довжини стегнової кістки, товщини стегнової кістки.

Гістоморфологічні методи. Вивчення гістологічної будови діафізу стегнової кістки, суглобого хряща проксимального епіфіза стегнової кістки, епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки.

Гістоморфометричні методи. Визначення кісткового об'єму трабекул вторинної спонгіози метафіза, площі компактної кісткової тканини середини діафіза, кількості перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки кортексу діафіза стегнової кістки, товщини суглобового та епіфізарного хрящів, питомої кількості хондроцитів кількості великих безклітинних ділянок інтертериторіального матриксу хрящової тканини суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки.

Статистичні методи: застосовувались для визначення середніх параметрів отриманих показників мінеральної щільності кісткової

тканини, рівнів біохімічних показників, гістоморфометричних показників, для визначення різниці відповідних середніх параметрів серій порівняння, а також для виявлення кореляційних зав'язків між гістоморфометричними показниками кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки.

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі доповнені дані щодо змін біохімічних показників при розвитку експериментальної глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії, зокрема, відзначене суттєве підвищення таких показників, як рівень лужної фосфатази та її ізоферментів в плазмі крові у порівнянні з відповідними показниками інтактної групи тварин. Так, рівень показника загальної лужної фосфатази у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохонропатією складав 347,0 ± 0,5 Од/л, а рівні її кишкового ензиму – 92,0 ± 0,7 Од/л та кісткового ензиму – 320,0 ± 1,0 Од/л, проти 235,0 ± 0,5 Од/л, 52,6 ± 0,9 Од/л, 200,0 ± 3.0 Од/л відповідно у інтактних тварин.

Вперше отримано дані про зміни остеометричних, біохімічих, і гістоморфометричних показників у експериментальних тварин з моделлю глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії на фоні превентивного поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е і проведено їх порівняння з відповідними показниками у тварин, в яких з метою профілактики розвитку глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії застосовувався лише вітамін D_3. Так визначено, що маса великогомілкової кістки при застосуванні двох вітамінів становила 272, 8 ± 2,4 г і була суттєво більшою за масу цієї кістки у тварин, що отримували тільки вітамін D_3 – 246,0 ± 1,2 г. Також відзначені суттєво вищі рівні показників зольності кісткової тканини – 59,8 ± 0,3 % та вмісту фосфору у золі великогомілкової кістки – 18,5 ± 0,2 % проти відповідних рівнів у групі порівняння (58,3 ± 0,7 % та 17,2 ± 0,1 %). Рівні показників лужної фосфатази та її ензимів при застосуванні вітаміні D_3 та Е були меншими за відповідні показники групи порівняння. Так, рівень загальної лужної фосфатази складав 260,0 ± 1,0

Од/л, її кишкового ензиму 83,0 ± 0,7 Од/л та кісткового ензиму 235,0 ± 1,2 Од/л проти 273,0 ± 0,2 Од/л, 87,0 ± 0,5 Од/л, 250,0 ± 1,5 Од/л відповідно. У порівнянні значно більшим виявився і показник кількості 25(OH)D3 50,0 ± 1,2 нг/мл проти 24,2 ± 2,0 нг/мл. Рівень показника об'єму вторинної спонгіози метафіза стегнової кістки при застосуванні двох вітамінів є більшим ніж при застосуванні тільки вітаміну D_3 (44,2 ± 1,5 % і 40,9 ± 1,6 % відповідно). Одночасне застосування вітамінів D_3 та Е при експериментальній остеохондропатії призводить до утворення суттєво меншої кількості ділянок інтертериторіального хрящового матрикса в епіфізарному хрящі проксимального епіметафіза стегнової кістки ніж при застосовуванні тільки вітаміну D_3 (1,667 ± 0,333 проти 2,600 ± 0,510).

Практичне значення отриманих результатів. Результати експериментального вивчення ефективності превентивного поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е на розвиток змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією, а саме зміни біохімічних, остеометричних, гістологічних та гістоморфометричних показників, можуть бути застосовані при подальших наукових експериментальних дослідженнях, присвячених профілактиці та корекції зазначеного патологічного процесу. Отриманий позитивний ефект поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е при експериментальній глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії може стати підґрунтям для майбутнього клінічного дослідження щодо використання цих засобів у хворих, що отримують тривалу глюкокортикоїдну терапію.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Дисертантом особисто проведено патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури з проблеми остеопорозу, його лікування та профілактики. Ідею дисертаційної роботи запропоновано дисертантом, спільно з науковим керівником, доктором медичних наук професором Калашніковим Андрієм Валерійовичем,

сформульовано мету і завдання дослідження, проведено обговорення результатів та висновків. Дисертант безпосередньо брав участь в проведенні експериментальних досліджень, особисто виконав обробку первинної документації, результатів експериментальних досліджень. Дисертант самостійно провів статистичну обробку результатів дослідження. Всі розділи дисертації написано та оформлено автором особисто. В статтях, що виконані у співавторстві, основний внесок належить дисертанту.

Апробація матеріалів (результатів) дисертації. Основні положення наукового дослідження доповідались і обговорені на: IV міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених (Вінниця, 2015); XVII з'їзді ортопедів-травматологів України (Київ, 2016); науково-практичній конференції, присвяченій 220-річчю заснування Одеського військового госпіталю «Актуальні питання надання хірургічної допомоги та анестезіологічного забезпечення в умовах воєнного і мирного часу» (Одеса, 2017); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні дослідження в ортопедії та травматології (Четверті наукові читання, присвячені пам'яті академіка О.О. Коржа) (Харків, 2018).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових друкованих робіт, з яких 7 статей, у тому числі 7 статей у фахових періодичних виданнях, рекомендованих МОН України, 3 з них – у виданнях, що цитуються в міжнародних наукометричних базах Google Scholar, World Cat, Cite Factor, Science Index, OAJI, SCIARY, РИНЦ, 1 тези.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 147 сторінках друкованого тексту, вона складається з анотації, вступу, 5 розділів, висновків, практичних рекомендацій, переліку літературних джерел та додатків, 15 таблиць та 23 рисунків включно. Перелік джерел медичної інформації містить 214 посилань, з яких 90 – кирилицею та 124 – латиницею.

РОЗДІЛ 1

ПРОБЛЕМА ОСТЕОПОРОЗУ: СУЧАСНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ, ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ

1.1. Остеопороз та глюкокортикоїд-індукований остеопороз – медико-соціальна проблема

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) визначила остеопороз (ОП) як системне захворювання кісток, що характеризується зниженням щільності кісткової тканини і порушенням мікроархітектури кістки з подальшим збільшенням її крихкості і почастішанням ризику переломів. [23, 24, 25, 26]. Актуальність проблеми ОП на сьогоднішній день зумовлена високою поширеністю серед населення у всіх країнах світу та соціально-економічними втратами, пов'язаними з серйозними ускладненнями ОП – переломи хребців, шийки стегнової кістки і інших зон скелету [27]. Відповідно до результатів оцінки стану проблеми остеопорозу в країнах Східної Європи і Центральної Азії, що була проведена в 2010 р. під егідою Міжнародного фонду остеопорозу, в Росії на це захворювання страждають 14 млн чоловік (10 % населення) [10, 28]. В Європі, США і Японії ОП вражає приблизно 75 мільйонів чоловік [29]. До 2020 року експерти ВООЗ очікують, що остеопороз буде вражати 61 млн американців старше 50 років [30]. В Україні 7 млн жінок в постменопаузі мають остеопороз чи остеопенію, що складає 28 % від загальної кількості жінок [31].

Зі всіх форм захворювання 85 % складає післяменопаузальний остеопороз. В економічно розвинутих країнах його виявляють у 15 % жінок, що досягнули 60 річного віку і у 38 % жінок у віці 80 років [10, 32]. Згідно критерію Bone mineral density (BMD) за даними Canadian Multicentre Osteoporosis Study (CMOS) поширеність ОП у жінок старше 50 років

складає 21,3 та 5,5 % у чоловіків [33]. При цьому кожна третя жінка і кожен п’ятий чоловік мають перелом, пов’язаний з ОП [29, 34].

Остеопоротичні переломи суттєво впливають на захворюваність і смертність населення. Дані ВООЗ свідчать про те, що число ліжко-днів за рік для жінок в післяменопаузальному періоді з остеопоротичними переломами перевищує показник таких захворювань, як рак молочної залози, гострий інфаркт міокарду, хронічні захворювання легенів і цукровий діабет [28, 35, 36].

Найбільш серйозним наслідком ОП є спонтанні руйнування кісткової тканини після незначної травми. Остеопоротичні переломи відрізняються від звичайних переломів трьома особливостями: 1) за показниками частоти – їх ризик збільшується з віком; 2) більш високою частотою у жінок у порівнянні з чоловіками; 3) частіше травмуються ділянки скелету, що містять підвищену кількість трабекулярної кістки [31]

Майже у кожної жінки після 65 років виникає як мінімум один перелом кісток, а ризик виникнення майбутніх переломів при наявності їх в анамнезі ризику збільшується. Приблизно 750 тисяч нових вертебральних переломів регіструється в США щорічно серед людей старше 50 років, і у чверті із них протягом життя виникає по крайній мірі ще один перелом тіла хребця [37].

В 1990 р. у світі було зареєстровано 1 млн 660 тисяч переломів проксимального відділу стегнової кістки внаслідок ОП, а до 2050 року експерти прогнозують збільшення приблизно до 6,5 млн, також 1,7 млн переломів передпліччя та 1,4 млн – вертебральних переломів [31, 37]. Переломи стегнової кістки призводять до зниження середньої тривалості життя на 12 – 15 %. Летальність серед хворих з остеопоротичними переломами проксимального відділу стегнової кістки в перші 6 місяців складає 20 %, біля 50 % пацієнтів не можуть пересуватись без сторонньої допомоги, а третина – втрачає здатність до самообслуговування [37, 38]. Кожен восьмий чоловік старше 65 років у своєму житті отримує перелом

як мінімум одного хребця, одну третину переломів у них складають переломи стегнової кістки, при цьому смертність внаслідок цих ушкоджень (37,5 %) перевищує аналогічний показник у жінок. [39, 40].

Витрати, що пов'язані з діагностикою (тільки дослідження щільності кісткової тканини) остеопорозу і лікуванням остеопоротичних переломів (до протезування суглобів включно), постійно зростають. Так, очікується, що тільки в США до середини сторіччя і тільки у зв'язку з переломом шийки стегна витрати можуть перевищити чверть млрд доларів. На сьогодні (за даними National Osteoporosis Foundation, США) прямі витрати (лікування в лікарні і догляд на дому) на остеопороз тільки у США складають приблизно 47 млн на рік [41].

Поліетіологічність розвитку ОП обумовлює різні варіанти класифікації цього захворювання. В клінічній практиці України використовують етіопатогенетичну класифікацію, прийняту Асоціацією ревматологів України, Всеукраїнською асоціацією остеопорозу в 2004 р. Зазначена класифікація розрізняє наступні види ОП [11, 41]:

1. За розповсюдженням: системний; локальний.
2. За етіологією: первинний; вторинний.

   До первинний відносять: постменопаузний (I типу); сенільний (II типу); ідіопатичний (ювенільний, у дорослих)

   До вторинного відносять остеопороз, що виник як наслідок:

   - захворювання ендокринної системи: хвороба і синдром Іценко-Кушинга – ендогенний гіперкортицизм; тіреотоксикоз; гіпогонадизм; гіперпаратіреоз, цукровий діабет, гіпопітуітаризм;
   - ревматичного захворювання: ревматоїдний артрит; системна червоний вовчак; хвороба Бехтерева;
   - захворювання органів травлення: мальабсорбція; хронічні захворювання печінки; стан після резекції кишечника;
   - захворювання нирок: хронічна ниркова недостатність,

синдром Фанконі;

- захворювання крові: мієломна хвороба, талассемія, системний мастоцитоз, лейкози, лімфоми;
- інші захворювання і стани: іммобілізація; стан після оваріоектомії, алкоголізм, хронічні обструктивні захворювання легень, нервова анорексія, порушення харчування; стан після трансплантації органів тощо;
- генетичне порушення: недовершений остеогенез; синдром Марфана; синдром Ендерса-Данлоса; гомоцистинурія і лізинурія тощо;
- вживання медикаментів: кортикостероїди; іммунодепресанти; антиконвульсанти; агоністи гонадотропін-рілізінг гормону; засоби, що містять алюміній – антациди; тіреоїдні гормони.

3. За локалізацією: трабекулярний, кортикальний, змішаний.
4. За характером процесу: плямистий, рівномірний.
5. За інтенсивністю метаболічних процесів в кістковій тканині: з високою інтенсивністю; з нормальною інтенсивністю; з низькою інтенсивністю.

Серед вторинних видів ОП важливе місце займає глюкокортикоїд-індукований ОП (ГІО). Глюкокортикоїди (ГК) є ефективними при лікуванні різноманітних запальних захворювань і широко використовуються в різних розділах медицини, включаючи трансплантологію і онкологію. Частота застосування пероральних і парентеральних ГК є однаковою у чоловіків і жінок, але збільшується з віком [42; 43, 44, 45, 46]. За даними дослідження GLOW 3,1 % жінок в постменопаузі приймають терапію пероральними глюкокортикоїдами [44, 47].

Застосування ГК у клінічній практиці нерідко порівнюють із

двосічним мечем. Відомий ревматолог Т. Пінкус образно порівняв використання ГК із вживанням вина:«Невеликі дози глюкокортикоїдів, як келих вина, можуть бути корисні багатьом пацієнтам, великі ж дози глюкокортикоїдів, як пляшка вина, шкідливі всім». ГК мають, з одного боку, найпотужнішу терапевтичну активність, що дозволяє швидко досягти позитивної динаміки, проте з іншого боку – численні побічні реакції, що спричиняє обмеження їх застосування в повсякденній клінічній практиці, та призначаються лише тоді, коли всі інші лікувальні можливості вичерпані. Частота і вираженість побічних ефектів ГК залежать насамперед від дози і тривалості прийому препарату, а також від стану органів і тканин, на які вони впливають [48].

Остеопороз, індукований ГК, стає одним із частих побічних ефектів тривалої глюкокортикоїдної терапії. Це ускладнення викликає найбільше занепокоєння у лікарів і пацієнтів, оскільки призводить до інвалідності та втрати самостійності у повсякденному житті [46, 48, 49, 50, 51, 52]. В результаті терапевтичного застосування ГК остеопороз розвивається у 30 – 50 % пацієнтів [42, 53, 54, 55, 56].

ГІО – це метаболічне захворювання кісткової тканини, що розвивається при лікуванні ГК внаслідок їх негативного впливу на обидва процеси кісткового ремоделювання – остеобласт-опосередковане формування і остеобласт-опосередковану резорбцію кісткової тканини – з подальшим розвитком переломів кісток [19, 44, 57, 58].

Частота розвитку остеопорозу у пацієнтів, які застосовують ГК понад 6 місяців, становить близько 50 %, 30 % пацієнтів при тривалому застосуванні ГК мають переломи кісток різної локалізації [44, 58]. При прийомі ГК у щоденній дозі 7,5 мг і вище відносний ризик переломів шийки стегнової кістки становить 2,27 (95% ДІ: 1,94–2,66), а вертебральних переломів – 5,18 (95% ДІ: 4,25–6,31) порівняно з пацієнтами, які отримували несистемну терапію ГК (інгаляційні, топічні, у вигляді назальних чи очних крапель) [22, 59]. Найінтенсивніша втрата

кісткової тканини відбувається впродовж перших 6 місяців ГК-терапії, а ризик невертебральних переломів істотно зростає в перші місяці системного прийому ГК і надалі залежить від тривалості їх прийому [48, 60]. Після припинення лікування ГК ризик переломів поступово повертається до вихідного рівня, і тому, здається, частково оборотним [22]. Тим не менш, у пацієнтів, що використовують високі дози (понад 1 г), було потрібно більше 15 місяців, щоб повернутися до вихідного ризику виникнення переломів [61].

Згідно Рекомендаціям Американської ревматологічної колегії (American College of Rheumatology) 2010 р. стрімке зниження мінеральної щільності кісткової тканин (МЩКТ) спостерігається вже через 3 міс від початку прийому ГК і досягає свого максимуму через 6 міс, після чого відбувається повільний постійний прогрес ГІО. Враховуючі ці рекомендації, а також дані великої кількості метааналізів, можна зробити висновок про те, що не існує «безпечних доз». Ризик розвитку ОП залишається високим при системному прийомі ГК у будь-яких дозах [62]

При однаковому значенні Bone mineral density (BMD; мінеральна щільність кістки), пацієнти з ГІО піддаються більшому ризику переломів [37, 44]. За іншими даними застосування глюкокортикоїдів є фактором ризику виникнення переломів незалежно від мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ). У пацієнтів, що приймали ГК, переломи виникають при Т-показнику >- 1,5 SD. Навіть доза преднізолону 2,5 мг/добу достовірно знижує МЩКТ і підвищує ризик виникнення вертебральних переломів і переломів стегнової кістки [53, 63].

1.2. Патогенетичні аспекти розвитку остеопорозу і глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу

Незалежно від етіології ОП, в його основі лежить порушення балансу між активністю остеобластів і остеокластів в процесі

ремоделювання кісткової тканини, що супроводжується накопиченням дефіциту її заповнення [8].

Кісткове ремоделювання – безперервний і добре скоординований гомеостатичний процес з повторними циклами резорбції и депозиції нової кістки, який допомагає усунути мікропошкодження в кістковому матриксі, що виникають протягом життя, зберегти кісткову архітектуру і підтримувати кісткову міцність. Ремоделювання виконується двома основними клітинами кісткової тканини: остеокластами, що резорбують кістку, і остеобластами, що формують нову кісткову тканину. Остеокласти – багатоядерні гігантські клітини, що трансформуються з мононуклеарних фагоцитів. Після приєднання до кістки вони розпочинають продукувати різні протеолітичні ферменти, що руйнують матрикс кістки, а також іони водню, що розсмоктують кристали гідроксиапатиту. Процес утворення кісткової тканини виконується остеобластами. Останні утворюються з мезенхімальних стромальних стволових клітин-попередників. Остеобласти значно менші розміром, ніж остеокласти, і мають одне ядро. Вони синтезують остеоїд, органічний матрикс кісткової тканани, і відповідальні за його мінералізацію. Приблизно один із десяти остеобластів при утворенні нового кісткового матриксу перетворюється на остеоцит. Остеоцити поєднані один з другим і з покровними клітинами довгими відростками, що дозволяють функціонувати цілій комунікаційній системі всередині кістки. Завдяки цьому остеоцити служать системою «швидкого реагування» на любі внутрішні і зовнішні стимули і регулюють процеси резорбції і утворення кістки [64].

Щорічно біля 4 – 10 % загального об’єму кісткової тканини дорослої людини піддаються оновленню [65, 66]. Дисбаланс у процесах резорбції і формування кістки призводить до прискорення кісткового обміну, переважанню резорбції над формуванням і, як наслідок, до зниження кісткової маси [8].

Кальцій є одним з основних структурних макроелементів і виконує

численні функції. Поза кістковою системою кальцій активний у вигляді іонів, входить до складу численних кальційвмісних сполук: білків, ферментів, вітамінів, гормонів, комплексів з амінокислотами та ін. Більше 90% кальцію і 70% фосфору знаходиться в кістках у вигляді неорганічних солей у складі матриксу: остеобластів, остеоцитів і остеокластів. Міжклітинна речовина є своєрідним депо, в якому кальцій знаходиться в стані динамічної рівноваги з кальцієм кровоносної системи і служить буфером для підтримки стабільного рівня його циркуляції [67, 68].

Регуляція обміну кальцію головним чином пов'язана з паратгормоном (ПТГ), який виробляється паращитовидними залозами, кальцитонін-, гормоном щитовидної залози і вітаміном D. Кальцитонін, що є антагоністом ПТГ, при гіперкальціємії знижує вміст кальцію в крові і число остеокластів, підсилює виведення фосфату кальцію нирками. Незважаючи на деяке посилення реабсорбції кальцію в ниркових канальцях під впливом ПТГ, виділення кальцію із сечею через наростаючу гіперкальціємію в кінцевому рахунку збільшується. Під впливом ПТГ в нирках стимулюється утворення активного метаболіту вітаміну D-1,25 диоксихолекальциферолу, який сприяє збільшенню всмоктування кальцію з кишечника [69, 70].

Вітамін D-жиророзчинний вітамін, існуючий у двох формах: вітамін D_2 (ергокальциферол) надходить в організм людини шляхом абсорбції у дванадцятипалій і тонкій кишці з харчових продуктів, вітамін D3 (холекальциферол) утворюється в шкірі з 7-дегідроксихолестеролу під впливом ультрафіолетового випромінювання. З віком (особливо після 65 років) знижується здатність шкіри синтезувати вітамін D_3, у зв'язку з ослабленням функції нирок знижується рівень вироблення в нирках активного метаболіту вітаміну D-1,25 диоксихолекальциферолу, що сприяє широкій поширеності дефіциту вітаміну D серед літніх людей [64].

Виявлення нових білків, що беруть участь в кістковому ремоделюванні, частково прояснило механізм низки патологічних станів,

що супроводжуються посиленням кісткової резорбції: постменопаузальний ОП, ревматоїдний артрит, псоріатичний артрит, множинна мієлома, асептичний некроз і хвороба Педжета. Відкриття сигнальної системи, що складається з рецептора активатора ядерного чинника кβ (RANK), його ліганда (RANKL – receptor activation of NF-kappa-ligand) і остеопротегерину (OPG), який є основним регулятором процесів диференціювання, функціонування та апоптозу остеокластів, призвело до прориву в розумінні патофізіології ОП [8, 45, 64; 71, 72, 73, 74].

RANK – клітинний мембранний рецептор, який походить з того ж сімейства, що і фактор некрозу пухлин (ФНП–α), і знаходиться на клітинах остеокластної лінії. При взаємодії з RANKL він активується і запускає внутрішньоклітинні сигнальні механізми, що зв'язують його з нуклеарним фактором кβ. Після повного охоплення сигнальних перетворювачів нуклеарний фактор кβ виділяється і переміщається до ядра остеокластів, де під дією кофакторів відбувається транскрипція генів, відповідальних за остеокластогенез. Білок RANKL також є членом суперсімейства ФНП-α, локус якого знаходиться на 13q14 людської хромосомі. Експресія RANKL відбувається під впливом низки гормонів, факторів росту, пептидів і цитокінів (вітаміну D3, ФНП–α, кісткового морфогенетичного білка 2, інтерлейкіну 1, інтерлейкіну 7) [75, 76].

Продукується RANKL клітинами остеобластичної лінії, стромальними клітинами кісткового мозку, синовіальними клітинами, активованими Т- і В-лімфоцитами, фібробластами, хондроцитами, ендотеліальними клітинами. RANKL є трансмембранним білком, розчинним лігандом, який зв'язується з OPG і відіграє координуючу роль в остеокластогенезі, дифференціюванні, активації та апоптозі остеокластів. Важливим підготовчим етапом розвитку остеокластів є активація RANKL, яка відбувається за допомогою зв'язування з RANK, розташованим на преостеокластах [77, 78].

OPG (відкритий і описаний в 1997 р.) відноситься до сімейства

ФНП–α і позиціонується як провідний компонент RANKL / RANK / OPG ланцюга. В основному OPG продукується клітинами остеобластної лінії, а також гладком'язовими судинними клітинами, а експресується він у тих же органах, що і RANKL. OPG, будучи природним рецептором-пасткою для RANKL, конкурує з RANK за зв'язування з RANKL. Блокуючи цей процес, OPG пригнічує кісткову резорбцію, віддаючи пріоритет утворенню кісткового матриксу. Порушення зв'язування RANKL і OPG – суттєве ланка патогенезу багатьох захворювань, що протікають із збільшенням кількості RANKL і супроводжуються посиленням кісткової резорбції [8, 79, 80].

В дослідженні D'Amelio P. etal. (2008) [81] проводилося визначення кількості остеокластів, їх активності та рівнів ФНП–α і сироваткового RANKL у постменопаузі та здорових пременопаузального віку жінок. У культурі нестимульованих мононуклеарних клітин, отриманих від постменопаузальних жінок, остеокласти дозрівали швидше і були більш активними, ніж у культурі клітин від пременопаузального віку жінок. Рівні ФНП–α і сироваткового RANKL, оцінені методом ELISA і в імуноблотінгу були значно вище у жінок в постменопаузі, ніж у здорових жінок у контрольній групі. Це свідчить про значний внесок Т-клітин у формування рівня ФНП-α і RANKL в тканині кісткового мозку.

Регуляція метаболізму кісткової тканини відбувається також за участю статевих стероїдів, естрогену і тестостерону, які в цілому сприяють процесам формування кісткової тканини. Отже, гормони, регулюючі баланс статевих стероїдів (наприклад, гонадотропні гормони, пролактин), також можуть брати участь у регуляції кісткового обміну. Статеві гормони беруть участь у підтримці балансу між рівнем кальцію в сироватці крові, паратиреоїдного гормону, кальцитріолом (активним метаболітом холекальциферолу) і кальцитоніном: сприяють підвищенню синтезу кальцитоніну, а також кальцитріолу в нирках, всмоктуванню кальцію в кишківнику, знижують синтез паратгормону [82, 83].

Крім опосередкованої регуляції ремоделювання кісткової тканини статевими стероїдами в даний час розглядаються й інші механізми. Так, встановлено наявність естрогенних рецепторів у остеобластоподібних клітинах, остеокластах, остеоцитах, трабекулярних активних і неактивних остеобластах. Вплив естрогенів здійснюється в тому числі за допомогою системи RANKL / RANK / OPG лігандів і рецепторів регуляції формування, диференціювання та активності клітин кісткової тканини [84, 85].

Важливу роль у регуляції метаболізму кальцію і моделювання кісткової тканини відіграють ГК. При підвищеній концентрації ГК посилюються процеси резорбції, пригнічується кісткоутворення, зростає втрата кальцію з сечею, відбувається зниження абсорбції кальцію в шлунково-кишковому тракті, блокуються анаболічні ефекти статевих стероїдів на кістку, що в кінцевому рахунку і призводить до розгорнутого системного генералізованного ГІО [42, 44, 50].

ГК викликають підвищену експресію ліганда активатора рецепторів ядерного фактору RANKL і макрофагального колоністимулюючого фактору (М-КСФ) остеобластами і пригнічення експресії остеопротегеріну, що призводить до збільшення остеокластогенезу, продовженню життя і активності остеокластів і, як наслідок, до підвищення резорбції кістки. В той же час ГК стимулюють підвищену експресію білка-активатора проліферації перксисом γ2 (PPARγ2) і зниження передачі сигналів по Wnt-шляху, що сприяє зменшенню остеобластогенезу, а активація каспази-3 призводить до збільшення апоптозу остеобластів і остеоцитів. ГК послабляють синтез проколагену I типу – попередника колагену I типу, що складає 90 % органічного матриксу кістки. Внаслідок порушення синтезу колагену I типу і підвищенної продукції інгібиторів мінералізації відбувається пошкодженя складу кісткового матриксу. Окрім того, ГК зменшують виробку простагландинів, місцевих факторів росту кісткової тканини, в наслідок чого пригнічується кісткоутворення [14, 44, 86].

В останні роки загальний механізм дії ГК став більш ясним. ГК чинять вплив в організмі за допомогою геномних і негеномних шляхів. Більшість важливих терапевтичних ефектів відбувається через геномні механізми зв’язування з ГК цитозольними рецепторами. Після цього ГК комплекс транслокується в ядро, де взаємодіє з конкретними транскрипційними факторами, призводить до індукції або інгібування транскрипції певних генів. ГК комплекс діє безпосередньо на фактори транскрипції активатора протеїну 1 і ядерного фактору-кВ, які відіграють важливу роль в регуляції багатьох запальних генів [87, 88].

Крім геномної дії, негеномний механізми ГК може надавати швидкий клінічний ефект, який може бути розділений на окремі механізми: сприяння виділенню сигнальних молекул, зв’язування ГК з мембранозв’язаними рецепторами. Нарешті, при дуже високих дозах, неспецифічні ефекти обумовлені фізико-хімічною взаємодією між ГК та клітинними мембранами. ГК впливають на транспорт іонів плазми клітин за допомогою прямого контакту з клітинною мембраною, а прямий контакт викликає витік протонів з мітохондріальної мембрани [89].

За останні кілька років деякі дослідження надали більш глибокого розуміння молекулярних механізмів розвитку ГІО. Вони включають в себе підвищений апоптоз остеобластів і остеоцитів, порушення диференціації остеобластів та збільшення тривалості життя остеокластів. ГК індукують апоптоз остеобластів і остеоцитів. Збільшення апоптозу остеобластів призводить до значного скорочення формування кісток, втрати остеоцитів, що призводить до порушенння остеоцитарно-каналікулярної мережі і відсутності реакції на пошкодження кістки [14, 90]. Це в кінцевому наслідку може призводити до зниження міцності кісток. Тим не менш, механізм функції остеобластів і остеоцитарного апоптозу не були до кінця повністю з’ясовані. Останні дані показують, що ГК індукують апоптоз остеобластів і остеоцитів шляхом активації caspase-3 [91]. Крім того, апоптоз остеобластів пов'язаний з активацією глікоген-синтази кінази 3β

(GSK3β), що відіграє важливу роль у сигнальному шляху Wnt [92]. Сигнальний шлях Wnt має важливу роль в кістковому метаболізмі і особливо остеобластогенезі. Як правило, зв’язування Wnt з ліпопротеїнами низької щільності рецептор-зв'язаного білка 5 і 6 (LRP5/6) і ко-рецепторів, стабілізує β-катенін, що призводить до транскрипції генів-мішеней і наступної індукції формування кісток. [93]. Крім збільшення апоптозу остеобластів, ГК погіршують їх функції шляхом перешкоджання процесу диференціювання [15, 94]. В додаток до цього, ГК стимулюють стромальні клітини кісткового мозку, клітини-попередники остеобластів диференціюватися в сторону адипоцитів, а не остеобластів [95].

На відміну від збільшення апоптозу остеобластів і остеоцитів, апоптоз остеокластів знижується під час лікування ГК. Тривалість життя остеокластів продовжено у зв’язку з активацією рецептора активатора ядерного чинника- кβ ліганда (RANKL) і пригнічення остеопротегерину (OPG) [50, 96]. ГК-опосередковане пригнічення OPG може відбутися через сигнальний шлях Wnt [14, 50, 97].

Крім прямого впливу на остеобласти, остеоцити, і остеокласти, ГК мають непрямий вплив на кістки шляхом інгібування резорбції кальцію в шлунково-кишковому тракті і інгібування в ниркових канальцях реабсорбції кальцію, що призводить до гіпокальціємії і тенденції до гіперпаратиреозу. Також прийом ГК може опосередковано збільшити ризик перелому за рахунок підвищення ризику падіння, викликаного стероїдною міопатією [44, 46, 98].

Вірогідність розвитку ОП у дорослої людини зумовлена двома основними факторами, першим з яких є пікова кісткова маса або максимальна «кількість» кістки, яку людина може досягти в своєму житті. Формування максимальної пікової маси вкрай важливо у зв’язку з тим, що від цього буде залежати рівень втрати кістки в подальшому житті [99]. Другим чинником, що обумовлює розвиток ОП, є швидкість втрати кістки протягом життя, а також порушення процесів її ремоделювання. Як

правило, кісткова маса досягає максимального значення у віці 20–22 років, коли домінують процеси кісткоутворення. Харчування, гормональні і механічні фактори відіграють важливу роль у формуванні маси кістки, а різні патогенні впливи можуть приводити до низького її значення [63]. В процесі створення пікової кісткової маси визначальне значення мають також генетичні чинники. Так набір пікової кісткової маси залежить від експресії безлічі генів: рецепторів (вітаміну D, кальцитоніну, естрогенів, андрогенів, глюкокортикоїдів, остеопротегерину та ін.), факторів росту і цитокінів, ферментів тощо [100, 101].

Розвиток ОП супроводжується змінами у хрящовій тканині. Гіаліновий хрящ суглобів є високоспеціалізованою тканиною, що здатна виконувати унікальні функції, що забезпечується формуванням і підтримкою необхідних структурних і функціональних характеристик екстрацелюлярного мартиксу [102, 103, 104]. Це придає хрящу множину специфічних властивостей: відносна мономорфність клітковинного складу, відсутність судин і нервів, виразна зональність будови. Однією із серйозних проблем, виникаючих внаслідок такої диференціації, стає вкрай низька здатність суглобового хряща до регенерації [103, 104, 105, 106, 107].

При глюкокортикоїд-індукованому експериментальному остеопорозі розвиваються зміни не тільки в кістковій тканині, а і в хрящі голівки стегнової кістки експериментальних тварин. При цьому посилюється проліферативна активність хондроцитів, збільшення їх числа за рахунок позаклітинного матриксу, що призводить в подальшому до їх якісних змін [108, 109]. Додатково при цьому відзначається значне збільшення проліферації хондробластів [9]. Загальна ширина епіфізарного хряща зменшується, переважно за рахунок зони остеогенезу. Об’ємний склад міжклітинної речовини збільшується, в той же час, об'ємний вміст первинної спонгіози в зоні остеогенезу, а також питома кількість клітин, розташованих на поверхневих трабекулах, зменшується [110].

Електронно-мікроскопічне дослідження при експериментальній глюкокортикоїдній дистрофії хряща у всіх його зонах демонструє виражену деструкцію хондроцитів. Численні клітини мають при цьому щільне ядро, їх цитоплазма містить значну кількість вакуолей та осередки деструкції. Деякі хондроцити при цьому містять порожнини із набряковою рідиною і клітинним детритом [111].

При хронічному впливі ГК при експериментальному дослідженні відзначено, що від 50 % до 70 % клітин суглобового хряща знаходяться на тій чи іншій стадії апоптичної загибелі. При цьому TUNEL-позитивні клітини локалізуються у проміжному і глибокому шарах хряща, спостерігається їх зональне розташування, що часто супроводжується наявністю «пустих» лакун [112]. Одним із факторів, що викликає апоптоз в клітинній лінії хондроцитів, авторами відзначена активація каспаз [113, 114].

Також при кортикостероїдній дистрофії у експериментальних тварин спостерігаються значні зміни біохімічних показників обміну сполучної тканини, що є аналогічними дистрофічним процесам, що маніфестують і спостерігаються при старінні організму: значно знижується вміст всіх фракцій і суми глікозаміногліканів в суглобовому хрящі, що підтверджує порушення динамічної рівноваги між анаболічними і катаболічними процесами в суглобовому хрящі на користь останніх; відбувається зниження біосинтезу і накопичення в хрящовій тканині неколагенових білкових фракцій і вуглеводно-білкових сполук; підвищується індекс хондроітинсульфатів у два рази [115].

Отже, на сучасному рівні знань ГІО можна розглядати як класичне мультифакторне захворювання, що призводить до порушення структурно-функціонального стану як кісткової так і хрящової тканини.

1.3. Основні напрямки діагностики та лікування остеопорозу та глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу

ОП не має клінічних проявів, поки не відбудеться перелом. Збір анамнестичних даних та об'єктивне обстеження повинні бути виконані з кількома цілями: 1) виявлення факторів, які можуть бути причиною втрати кісткової маси; 2) визначення чинників, які можуть прогнозувати майбутні переломи; 3) виключення вторинних причин остеопорозу [116]. При оцінці обстеженні пацієнта на ОП необхідно враховувати зріст, вагу, оцінку ходи та рухів при виконанні типових вправ. Рентгенологічне дослідження посідає одне з визначних місць у діагностиці патологічних переломів на фоні ОП [117].

Біохімічний скринінг проводиться для всіх хворих на ОП до початку фармакологічного лікування. Основними біохімічними маркерами при ОП є: кальцій, з поправкою на альбумін; клінічний аналіз крові; креатинін; лужна фосфатаза; тиреотропний гормон; спектр електрофорезу білків (для хворих з переломами хребців); 25OHD [64, 118].

Згідно епідеміологічних даних щодо зв'язку низької кісткової маси з підвищеним ризиком переломів, дослідницька група ВООЗ розробила критерій визначення ОП – BMD. На сьогодні більшість дослідників вважають BMD в якості основного критерію для початку терапії та можливістю для запобігання майбутніх переломів враховуючи комплексний підхід оцінки кісткового статусу пацієнта [119]. Оцінка BMD проводиться одночасно з показником подвійної енергії рентгенівської адсорбціометрії (DXA) [2, 120, 121, 122, 123]. В теперішній час технологія DXA признана «золотим стандартом» діагностики захворювань, повязаних з втратою кісткової маси і порушенням мінералізації скелету [124].

Виявлення пацієнтів з підвищеним ризиком переломів кісток тільки за допомогою вимірювання маси має ряд недоліків. Тому були рекомендовані моделі, які розраховують абсолютний ризик перелому для

кожного пацієнта індивідуально. Недоліком використання абсолютного ризику переломів є відсутність консенсусу щодо того, коли саме лікування має бути розпочато. Кілька алгоритмів в даний час доступні, щоб визначити, як запобігти ГІО і переломам, більшість з них засновані на добовій дозі преднізолону і на Т-критерії виміру МЩКТ стегнової кістки і хребта. Була розроблена також загальна база даних, відома як FIGS (Fracture in GIOP Score). Ця модель розраховує 5-ти і 10-річний ризик ОП, переломів стегнової кістки, хребців і зап'ястя. Використання цієї моделі є досить складним, але цей метод має ту перевагу, що враховується основне захворювання, ризик падіння і дозування ГК. Іншою моделлю оцінки ризику переломів є FRAX, запропонований ВООЗ. Ця модель враховує історію сім'ї і МЩКТ, але не включає оцінку факторів ризику падінь і наявність або відсутність поширення хребетної деформації. Крім того, в цій моделі не враховується дозування ГК [56].

Радіографія або денситометрія (VFA) повинні проводитись до початку глюкокортикоїдної терапії, кожні 6 місяців протягом першого року використання ГК, а потім кожні 1-2 роки при продовженні лікування ГК [125].

Лабораторними маркерами на даний час для кісткової тканини є визнаними такі як вміст остеокальцину, колагену I типу, OPG, інтерлейкіну-17 в крові. До маркерів резорбції кісток відносять екскрецію оксипроліну з сечею, визначення піридиноліну, деоксипиридиноліну і N-кінцевого телопептиду в сечі, активності кислої тартратрезистентної фосфатази, продуктів деградації колагену I типу (Cross-Laps) і RANKL в крові [4, 64, 126, 127].

Вітамін D і його активні метаболіти є компонентами, що регулюють фосфорно-кальцієвий обмін, і приймають участь, з одної сторони, у мінералізації кісткової тканини, з іншої – у підтриманні гомеостазу кальцію. Біологічна дія активних метаболітів вітаміну D полягає головним

чином у стимуляції кишкової абсорбції кальцію і фосфору, активації обміну і посиленні екскреції кальцію із сечею.[64, 69].

Мета-аналіз, у якому при ОП використовували 17,5-20 мкг (700-800 МО) вітаміну D_3, показав зменшення кількості переломів на 23 %, а при поєднанні вітаміну D_3 (10-20 мкг або 400-800 МО) з кальцієм цей ризик склав 18 % [128, 129]. У дорослих старше 50 років та осіб з високим ризиком недостатності вітаміну D дозу рекомендується збільшувати до 20-50 мкг (800-2000 МО) на добу, деякі з цих пацієнтів можуть навіть потребувати дози, що перевищують 50 мкг (2000 МО) на день. Для моніторингу відповіді визначають 25-OH-D в сироватці крові. [130].

Хоча термін «вітамін D» використовується для позначення як кальциферолів (холекальциферол та ергокальциферол) так і активних аналогів вітаміну D, їх терапевтичні профілі дуже різні. Найбільш часто використовувані форми активних метаболітів вітаміну D: кальцитріол (1,25-дигідроксивітамін D) і альфакальцидол (1-α гідроксивітамин D). В якості первинної та вторинної профілактики ГІО активні аналоги вітаміну D є більш ефективними щодо збереження BMD і зниження ризику переломів хребців у порівнянні з кальциферолом, кальцієм в монотерапії, плацебо або відсутністю лікування. Пряме порівняння альфакальцидолу в дозі 0,25-1,0 мкг/добу і неактивного вітаміну D показали, що активна форма була значно більш ефективною у відношенні кісткової маси та посилення зниження ризику переломів, тому що альфакальцидол значно скорочував (61 %) переломи хребців і на 52 % знижував всі види переломів [131].

Дієтичний кальцій має вплив як на мінеральний обмін кісток, так і на BMD [132, 133]. У мета-аналізі було встановлено, що прийом кальцію з або без вітаміну D призводило до меншої частоти переломів. Тим не менш, є розбіжності щодо потенційних побічних ефектів високих доз кальцію на нирки і серцево-судинну систему у жінок, раку простати у літніх чоловіків [134]. Обстеження жінок, хворих на системний червоний вовчак після двох

років вживання кальцій карбонату (500 мг/добу) окремо чи в поєднанні в тій же дозі з кальцитріолом (0,25 мкг/добу) показало відсутність суттєвих змін BMD. Тому препарати кальцію в якості монотерапії вважають достатніми, як для запобігання, так і лікування ГІО [135, 136].

Добавки кальцію і вітаміну D відіграють істотну роль в перебігу ГІО. Пацієнтам рекомендується загальне споживання кальцію, принаймні, від 1000 до 1200 мг/добу. Адекватний рівень вітаміну D є необхідним, а мінімальний рівень сироваткового $25(OH)D_3$ більше 50 нмоль/л рекомендується протягом усього року [137].Добавки вітаміну D у дозах не менше 800 МО/добу рекомендується для досягнення цих терапевтичних рівнів. Терапевтичні добавки з кальцієм і вітаміном D вважаються першим кроком у лікуванні ГІО з огляду на їх низькі показники токсичності і вартості. Поєднання кальцію і вітаміну D значно покращує BMD в поперековому відділі хребта на 33 % у хворих що використовують ГК, але не має істотного впливу на виникнення частоти переломів. Тим не менше, вибір кращої форми вітаміну D (кальциферол, альфакальцидол або кальцитріол) залишається спірним. На теперішній час тільки асоціації альфакальцидол з кальцієм показали значне зниження ризику переломів хребців, при відсутності ефекту на виникнення переломів інших кісток [138].

Фізичні вправи часто рекомендуються для людей з ОП. Програми, які включають аеробні вправи і силові тренування мають позитивний вплив на BMD [83, 139]. Наступні фактори ризику, як відомо, негативно позначаються на кістковій масі, навіть у молодих жінок, при використанні ГК: куріння, високий рівень споживання алкоголю, сидячий спосіб життя (витрата енергії менше 1682 ккал/добу) і мала вага [140, 141].

Вітамін Е відіграє важливу роль у збільшенні щільності кісткової тканини. На моделі ОП у щурів, які отримували вітамін Е, зростала губчаста кісткова тканина, знижувалась втрата кальцію в кістках [142]. Вітамін Е захищає кістки від окислювального пошкодження вільними

радикалами, підтримує живлення кісткової матриці, стимулює утворення трабекулярної кістки [143]. Більш ранні дослідження показали, що вітамін Е захищає від втрати кісткової маси і ушкодження, викликаного окислювальним стресом, який індукується дефіцитом статевих гормонів, сприяє відновленню міцності кісток у літніх мишей з остеопенічними моделями та ГІО [144, 145].

Основною групою для патогенетичного лікування ОП є антирезорбтивні препарати, що зменшують рівень кісткової резорбції, сповільнюють загальну швидкість обміну кісткової тканини і застосовуються для профілактики ОП. До цих засобів відносяться бісфосфонати, деносумаб, кальцитонін, естрогени і селективні модулятори рецепторів естрогену [146, 147, 148].

В експериментальному дослідженні було продемонстровано, що при ГК-індукованому остеопорозі бісфосфонати зменшують експресію генів, що пригнічують мінералізацію, тим самим збільшуючи масу губчастої кістки [149]. Ефективність бісфосфонатів щодо попередження ГК-індукованої втрати кісткової маси була продемонстрована в кількох рандомізованих контрольованих випробуваннях. Алендронат поліпшує МЩКТ поперекового відділу хребта у хворих з довготривалим вживанням ГК протягом двох років. Додавання вітаміну D до терапії бісфосфонатами на 6 % збільшувало позитивний вплив [150, 151]. Мета–аналіз 11 досліджень, в які були включені 12068 жінок у постменопаузі з ОП і які одержували протягом одного року алендронат, показав значне скорочення частоти переломів хребців по всьому спектру ризику переломів [67]. Щодо інших засобів, то використання етідронату, різедронату продемонструвало зниження відносного ризику переломів хребців на 41 %, з огляду на це зроблено висновок, що циклічний етідронат доцільно використовувати для вторинної профілактики переломів хребців [152, 153, 154, 155]. Бісфосфонати (алендронат, остемакс, ризедронат) як в монотерапії так і в поєднанні з альфакальцидолом, препаратами кальцію продемонстрували

позитивний ефект на збереження кісткової маси хворих, що отримували ГК [42, 156, 157, 158, 159].

Вплив ібандронату було вивчено у чоловіків після трансплантації серця. Застосування ібандронату запобігає втраті кісткової тканини і переломів хребта у кардіологічних хворих після трансплантації з імуносупресивною терапією, в тому числі ГК [160]. Використання ібандронової кислоти рахується безпечною та економічно обґрунтованою профілактикою системних та місцевих порушень кісткової архітектоніки для попередження остеопоротичних переломів у пацієнтів з системним використанням кортикостероїдів [53, 161].

Золедронова кислота також призводить до збільшення BMD і може бути використана для профілактики і лікування ГІО. Вона є зручною щодо дозування і може бути альтернативою для лікування ОП у людей з шлунково-кишковими розладами і труднощами у використанні пероральних бісфосфонатів [162].

Гормональна терапія в цілому при ОП забезпечує зменшення загальної кількості переломів на 30 %. Але при використанні ралоксифену, кальцитоніну було відзначене зменшення ризику лише для переломів хребців [163, 164].

Паратгормон, терипаратид (hPTH–1-34) також призводять до суттєвого зменшення ризику переломів хребта і решти кісток. Терипаратид – форма гормону паращитовидних залоз, отриманий з використанням рекомбінантної ДНК-техніки (PTH 1-34). Він є анаболічним засобом, що підвищує функціональність і зменшує апоптоз остеобластів і остеоцитів, а також сприяє диференціації остеобластів, отже стимулює утворення кістки, діючи протилежно ГК. Теоретично, виходячи з патогенезу ГІО, анаболічні засоби повинні бути препаратами першого вибору для ГК-пацієнтів. Клінічні випробування продемонстрували, що ПТГ 1-34 (терипаратид) був більш ефективним у запобіганні ГІО, ніж бісфосфонати (МЩК зростала на 7,2% проти 3,4%). [165]. Лікування терипаратидом не

тільки знижувало частоту переломів, але зменшувало відчуття болю в спині і позитивно впливало на якість життя [166]. ПТГ 1-34 відновлює обсяг трабекулярної кістки, збільшує формування і міцність кісток у тварин на моделі ГІО [167]. РТН лікування нейтралізує негативний вплив ГК на остеобласти та остеоцитарний апоптоз. Цей ефект пов'язують зі збільшенням агоністів експресії Wnt сигналізації. Тому терипаратид може бути запропонований ГК-пацієнтам як препарат першої лінії. Через відносно високу вартість терипаратид є економічно невигідним. Тим не менш, терипаратид привабливий не тільки завдяки його механізму дії, але й за те, що він перевершує ефективність бісфосфонатів для ГК-пацієнтів [168]. Через свою високу вартість терипаратид рекомендується для застосування при відсутності ефекту від бісфосфонатів чи протипоказаннях щодо їх використання [169, 170].

Побічні ефекти були відзначені в RCTs при проведенні оцінки ефективності лікування ОП з використанням усіх сучасних препаратів. Було показано, що застосування цих засобів викликають розлади з боку шлунково-кишкового тракту. Кандидоз відзначений при застосуванні золедронової кислоти, одною із побічних дій використання ралоксіфену є підвищення ризику легеневої тромбоемболії [171]. Іншими побічними ефектами, що були виявлені при проведені RCTs та постмаркетингових дослідженнях, були остеонекроз щелепи та атипові переломи стегнової кістки [172, 173].

Розширення знань про фізіологічні і біохімічні процеси регулювання кісткового ремоделювання сприяло розвитку нових терапевтичних стратегій щодо лікування ОП. Дані про вирішальну роль RANKL в прискоренні резорбції кістки призвели до створення нових лікарських препаратів, механізм дії яких заснований на інгібуванні RANKL. Першим таким засобом став OPG. У доклінічних дослідженнях на мишах і щурах було показано, що рекомбінантна форма OPG, прикріплена до Fc-

фрагменту людського IgG (OPG-Fc), здатна швидко пригнічувати кісткову резорбцію і не впливати при цьому на маркери кісткоутворення [174].

Наступним у цій лінійці засобів став деносумаб («Prolia »), що являє собою нативні людські антитіла, високоспецифічні до RANKL, що імітують дію OPG на RANKL. Оскільки нативні людські антитіла мали більш значущий антирезорбтивний потенціал і створювали більш тривалий ефект на кісткові маркери, OPG–Fc не отримав подальшого розвитку в якості лікарського засобу. [175]. Деносумаб має унікальну структуру і низький антигенний потенціал, що дозволяє уникати перехресного реагування з іншими ендогенними компонентами. Разова доза деносумаба, створеного компанією AMGEN, становить 60 мг. Препарат вводиться підшкірно кожні 6 місяців у вигляді 1 мл розчину з 5% сорбітолом і 10 ммоль ацетату натрію у воді для ін’єкцій [176, 177].

Проведені клінічні дослідження деносумабу, продемонстрували відсутність небажаних ефектів на імунну систему і розвитку антитіл до деносумабу. Був продемонстрований його виражений вплив на кортикальну кістку, що був більш вираженим, ніж при застосуванні бісфосфонатів. Подальші дослідження за допомогою комп’ютерної томографії високої роздільної здатності 3D формату підтвердили ці дані. Була відзначена швидка оборотна динаміка біохімічних показників кісткового обміну на ранніх стадіях лікування. Рівень маркерів кісткової резорбції (СТх) і кісткоутворення (КС–ЛФ) протягом 2 років після припинення терапії деносумабом повертався до вихідного. Також було відзначене збільшення МЩКТ через 2 роки лікування [178, 179, 180, 181, 182].

В порівняльному дослідженні DECIDE (подвійне сліпе, подвійне маскувальне) вивчалась ефективність деносумаба і референт-стандарту терапії ОП алендронату. Незважаючи на те, що обидва препарати підвищують МЩК шляхом зниження остеокластичної кісткової резорбції, механізм дії та фармакодинамічний профіль у них різняться. Різниця у

швидкості зниження рівня маркера кісткової резорбції при застосуванні цих засобів може бути пов’язана з різними механізмами дії препаратів, оскільки алендронат має високу аффінність до гідроксиапатиту, інкорпорує в кістковий матрикс і в основному інгібує активність зрілих остеокластів, а деносумаб інгібує ключовий медіатор диференціювання, функціонування та виживання остеокластів – RANKL. Ймовірно, що більше підвищення МЩК при лікуванні деносумабом пов’язано з більшим зниженням швидкості кісткового обміну [183, 184, 185, 186].

Остеопоротичні переломи і особливо переломи стегнової кістки, є причиною високого рівня смертності. До цих пір не було доведено вплив ефективних антиостеопоротичих препаратів на показники смертності. Виконаний метааналіз масштабних рандомізованих контрольованих досліджень препаратів з доведеною антипереломною ефективністю і схваленими дозами для використання у людей показав, що ефективна антиостеопоротична терапія знижує загальну смертність незалежно від віку і попередніх хребетних або периферичних переломів. В аналіз були включені рандомізовані контрольовані дослідження, в яких вивчались дія таких препаратів як ризедронат, стронцію ранелат, золедронова кислота і деносумаб. В результаті метааналізу було показано, що ефективна антиостеопоротична терапія асоціюється зі зниженням ризику смерті на 11 %, особливо у літніх і немічних пацієнток з високим ризиком переломів [187, 188, 189].

Проведений аналіз літератури показав, що проблема ОП в цілому та ГІО залишається актуальною, оскільки має глобальне поширення, особливо у старших вікових категоріях пацієнтів, супроводжується розвитком серйозних ускладнень, серед яких найчастішим є виникнення переломів кісток, що значно погіршує якість життя пацієнтів, призводить до інвалідності і навіть є причинною летальності. Сучасні наукові дослідження дозволили більш глибоко розкрити важливі патогенетичні механізми на клітинно-гуморальному рівні, а відкриття сигнальної системи

RANKL/RANK/OPG-ланцюга, що є основним регулятором процесів диференціювання, функціонування і апоптозу остеобластів, здійснило прорив в розумінні патофізіології ОП. Дані про вирішальну роль RANKL в прискоренні резорбції кістки привели до створення нових лікарських препаратів, механізм дії яких заснований на інгібуванні RANKL. Проте, не зважаючи на досягнуті результати в розумінні перебігу розвитку ОП, проблема вивчення різних форм патології та їх лікування залишається не вирішеною і потребує проведення подальших досліджень.

Проаналізувавши сучасну літературу, нами було встановлено, що проблема глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу залишається однією з найважливіших проблем сучасної медицини. Не дивлячись на велику кількість робіт присвячених цій проблемі, залишаються ще до кінця не вирішеними питання лікування та профілактики цієї патології. Основна маса робіт з вивчення глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу присвячена патогенезу цієї патології, що виникає на фоні тривалого прийому глюкокортикоїдів. Останнім часом покази до застосування глюкокортикоїдів значно розширились і вони призначаються короткотривалими курсами. В доступній літературі нами була виявлена незначна кількість робіт з вивчення змін кісткової і хрящової тканин. Тому дослідження змін кісткової та хрящової тканин при короткотривалому курсі глюкокортикоїдної терапії насьогодні залишається актуальною проблемою, що потребує детального вивчення та розробки методів медикаментозної корекції цих змін. Саме цей аспект і послужив для нас підставою для проведення наступного експериментального дослідження.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У відповідності до мети та завдань наукова робота носить експериментальний характер.

При виконанні даного дослідження дотримувались загальноприйнятих світових та вітчизняних норм відповідно до основних положень Першого національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (2001 р.), GCP (1996 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та інших цілях (від 18.03.1986 р.) та Закону України №3447-IV від 21.02.2006р. «Про захист тварин від жорстокого поводження».

2.1. Характеристика об'єктів експериментального дослідження

Для вивчення профілактичної дії вітамінів D_3 та Е на зміни з боку обміну кальцію в організмі, структурно-функціонального стану суглобового та епіфізарного хрящів, кісткової тканини, що виникають при застосуванні глюкокортикоїдів, нами було проведене експериментальне дослідження на 68 щурах-самцях лінійної породи Вістар віком 2 місяці з масою 100,0±5,0 г у віварії ДУ «Інститут травматології та ортопедії». Експериментальні тварини у віварії утримувались відповідно до загальноприйнятих норм [190, 191]. Перед проведенням дослідження відібрані для експерименту тварини два тижні знаходились на карантині. У період карантину і під час експерименту тварини перебували в стандартних пластикових клітках при належних кліматичних умовах (температура повітря – 18–22^{0}С, вологість повітря – 50–60 %), зі звичайним світовим режимом «день-ніч», на стандартному харчовому

раціоні. Відбір тварин у дослідні групи проводився за методом «випадкових чисел» [192].

Експериментальних тварин було розподіллено на чотири дослідні групи по 17 щурів у кожній (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

Розподіл експериментальних тварин за дослідними серіями

Група	Кількість тварин	Термін спостереження (доба)
Інтактні тварини (I серія)	17	30
ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	17	30
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3 (III серія)	17	30
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та Е (IV серія)	17	30
Всього	68	-

Всім тваринам протягом зазначеного терміну спостереження щоденно виконували пероральне введення відповідної діючої речовини за допомогою зонду з оливою.

Інтактні тварини щоденно отримували по 0,5 мл 0,9 % розчину хлориду натрію.

Тваринам II серії вводили розчин преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла. У цих тварин вивчали вплив тривалого введення преднізолону на мінеральний та D-вітамінний обміни, на структурно-функціональну організацію тканинних структур кістки, суглобового та епіфізарного хрящів.

Тваринам III серії, аналогічно до тварин II серії, вводили щоденно туж саму дозу преднізолону, а також, додатково, 100 МО вітаміну D_3 з метою визначення профілактичної дії вітаміну D_3 щодо розвитку порушень мінерального та D-вітамінного обміну, структурно-функціональної організації кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів на фоні тривалого введення преднізолону.

Експериментальні тварини четвертої серії отримували щоденно зазначені дози преднізолону, вітаміну D_3 та, додатково, 0,726 МО (0,6 мг) вітаміну Е. Метою при цьому стала оцінка можливого потенціювання профілактичної дії вітаміну D_3 вітаміном Е щодо змін мінерального та D-вітамінного обміну, структурно-функціональної організації кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів на фоні тривалого введення преднізолону.

Протягом експерименту спостерігали за тваринами, оцінюючи їх стан за наступними параметрами: рухова активність, поїдання кормів, стан хутряного покриву.

У термін завершення експерименту тварин зважували, проводили забір крові для визначення біохімічних показників та виводили з досліду шляхом передозування ефіру для наркозу. Після цього проводився забір матеріалу для гістоморфологічних та гістоморфометричних досліджень.

2.2. Методи біохімічного дослідження

Біохімічні дослідження проводились на базі відділу Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

З-поміж біохімічних досліджень, у експериментальних тварин в крові визначали рівень кальцію та фосфору, активність лужної фосфатази (ЛФ) та її ізоферментів, рівень вітаміну D – $25(OH)D_3$.

Рівень кальцію в сироватці крові визначали за допомогою біотест-набору ЛАХЕМА (Чехія).

Вміст неорганічного фосфору в сироватці крові визначали після зсідання білків 12% розчином трихлороцтової кислоти за методом Dyce [193].

Активність загальної лужної фосфатази в сироватці крові визначали за допомогою біо-тест наборів виробництва ЛАХЕМА (Чехія).

Активність ізоферментів лужної фосфатази визначали з використанням їхніх інгібіторів [194].

Для визначення рівня $25(OH)D_3$ в сироватці крові застосували метод імуноферментного аналізу з використанням відповідної тест-системи 25-Hydroxy Vitamin D, IDS, Immunodiagnostic (Німеччина) [195, 196].

2.3. Методики морфометричного та гістоморфометричного дослідження

Гістоморфологічні та гістоморфометричні дослідження змін кісткової та хрящової тканин у експериментальних тварин проведені у відділі патоморфології ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України».

На початку зазначених досліджень у виведених з експерименту тварин видаляли та очищували від м’яких тканин великогомілкові та стегнові кістки.

Зольність кісткової тканини визначали після її знежирення гексаном методом сухої мінералізації при температурі 600-800°С, при цьому кістки спалювались в муфельній печі у фарфорових тиглях протягом 12 годин. Після розтирання кістки в порцеляновій ступці отриману золу зберігали в герметично закритих мікропробірках. За різницею маси сухої кістки й золи визначалась кількість органічних і мінеральних речовин [197]. Зважування проводилися за допомогою аналітичних ваг ВЛА-200 (точність – до 0,1 мг).

Для хімічного дослідження брали 10 мг золи і розчиняли її в 2 мл 0,1 М розчину соляної кислоти, після чого добавляли бідистильовану воду

до загального об’єму в 25 мл. Вміст кальцію в отриманій рідині визначали за допомогою фотометру атомної абсорбції типу «Сатурн-2» в режимі емісії у повітряно-пропановому полум’ї, кількість фосфору – шляхом фотоколориметрії за Брігсом на електрофотоколориметрі КФК-3 [198].

Остеометричні дослідження стегнової кістки включали вимірювання її довжини між верхнім полюсом голівки та найбільш дистальною точкою суглобової поверхні медіального виростка, вимірювання товщини кістки в горизонтальній площині в середній третині діафіза. При вимірюванні застосовували штангенциркуль з точністю до 0,1 мм [199].

Після зазначених вимірювань стегнові кіски піддавали фіксації в 10% розчині нейтрального формаліну, декальцинації у 5% розчині азотної кислоти, вирізали повздовжні та поперечні шматочки, після зневоднення і знежирювання в спиртах наростаючої міцності, заливали в целоїдин. За допомогою мікротому отримували тонкі повздовжні зрізи у фронтальній площині проксимального відділу стегнової кістки та поперечні зрізи із середньої третини діафіза товщиною 10 мкм. Фарбування виконували гематоксиліном та еозином, а також гематоксиліном та пікрофуксином за Ван Гізоном. [199].

Гістологічні дослідження проводились на мікроскопах МБС-2 та OlympusCX-41. Мікрофотографії робили за допомогою фотоапарату NiconD90, що закріплювався на тубусі мікроскопу.

З-поміж гістоморфометричних показників, що характеризують структурно-кількісні особливості стегнових кісток, хрящів проксимального епіметафіза стегнових кісток щурів, досліджували наступні показники:

- Кістковий об’єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки (bone volume / total volume BV / TV%): у квадратному тестовому вікні з числом перетинів сітки 10×10 визначали число перетинів, що накладалися на зображення кісткових трабекул вторинної спогіози, до сумарного числа перетинів у двох полях зору при збільшенні 20×7.

- Площа компактної кісткової тканини у поперечних зрізах середини діафіза (площа компактної кісткової тканини всього «кісткового кільця») у мм^2. Для цього застосовували окулярну квадратно-сітчасту вставку при збільшенні мікроскопу 4×7, вираховували сумарне число перетинів сітки, що припадали на зображення кортекса «кісткового кільця» та множили його на абсолютне значення площі, що було розраховане за допомогою контрольного засобу вимірювання (окуляр-мікрометр) та відповідало одному перетину сітки при цьому збільшенні (0,036864 мм^2).
- Питоме число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортекса (число перетинів / мм^2). Тестова ділянка кортекса завжди вибиралася по передній ділянці «кісткового кільця» у поперечному зрізі діафіза. Для розрахунку індивідуальних параметрів попередньо визначали площу ділянки кортекса, що при збільшенні мікроскопу 20×7 потрапляла на зображення ділянки кортекса у тестовому вікні (площа одного квадрату складала 0,001521 мм^2) та підраховували число перетинів судинних каналів кортекса в ділянці, що потрапляла до тестового вікна. Потім число перетинів судинних каналів ділили на площу ділянки кортекса у тестовому вікні.
- Товщина суглобового хряща та епіфізарного хрящів голівки стегнової кістки у найбільш проксимально розташованих ділянках хрящів поблизу місця приєднання зв’язки голівки стегнової кістки, у мм.
- Питома кількість хондроцитів на одиницю площі зрізу хрящів у тестовому вікні, число клітин / мм^2. При цьому тестову ділянку у суглобовому і епіфізарному хрящах вибирали в найбільш проксимальній частині на фронтальному зрізі проксимального кінця стегнової кістки.

- Кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матрикса (великих ділянок матрикса) у зрізах суглобового хряща та епіфізарного хряща. При цьому у зрізах хрящів підраховували число великих ділянок матрикса, що не містили хондроцитів.

2.4.Статистична обробка отриманих результатів

Статистичний аналіз отриманих показників здійснений за допомогою пакету прикладних програм Statistica (StatSoftInc., США), версія 6.1 (ліцензійний №BXXR901E246022FA). Для порівняння відповідних показників незалежних груп застосовували непараметричний критерій Колмогорова-Смірнова. Дослідження кореляційних зав’язків між окремими гістоморфометричними показниками визначали за допомогою коефіцієнта кореляції Пірсона. Різниця між відповідними показниками рахувалась значущою при $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ, СУГЛОБОВОГО ТА ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ ПРЕДНІЗОЛОНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

3.1.Вплив преднізолону на загальний стан, масу тіла та остеометрічні показники у експериментальних тварин

Після щоденного введення преднізолону протягом 30 діб стан експериментальних тварин ІІ серії відрізнявся від загального стану інтактних тварин. Рухова активність цих тварин була зниженою, поїдання корму стало менш інтенсивним, їх хутро втратило блиск [201].

Щодо маси тіла, то до проведення дослідження у інтактних тварин (І серія) і тварин ІІ серії вона була рівнозначною і складала 105,0±1,0 г та 105,0±1,7 г відповідно ($p>0,05$) (табл. 3.1.1).

Після експерименту маса тварин у зазначених серіях дослідів суттєво відрізнялась ($p\leq0,001$). Так у тварин І серії середня маса тіла склала 190,0±4,0 г, а в групі тварин з ГК-індукованою остеохондропатією – 160,0±3,6г. Загалом приріст маси тіла у тварин І та ІІ серій відповідно склав 80,9±1,2 % і 55,0±1,4 %.

Середня маса великогомілкової кістки на момент закінчення експерименту у тварин І серії також була достовірно більшою у порівнянні з серією тварин, що отримували преднізолон, і відповідно склала 254,6±4,0 мг та 229,7±1,9мг ($p<0,001$). Отже, маса великогомілкової кістки у тварин ІІ серії була меншою на 11,0 % ніж у інтактних тварин.

Середні довжини стегнової кістки у тварин І та ІІ серії також вірогідно відрізнялась ($p\leq0,001$) і відповідно склали 31,01±0,05 мм та 28,81±0,25 мм. Така ж закономірність відзначена і для товщини стегнової

кістки. В І серії цей параметр склав 3,49±0,06 мм, в ІІ серії – 3,07±0,04 мм (p≤0,05)

Таблиця 3.1.1

Маса тіла та остеометричні показники у експериментальних тварин І та ІІ серій

Група	Досліджуваний показник після експерименту				
	Маса тіла до експерименту (г)	Маса тіла після експерименту (г)	Маса великогомілкової кістки (мг)	Довжина стегнової кістки (мм)	Товщина стегнової кістки (мм)
Інтактні тварини (І серія)	105,0±1,0	190,0±4,0	254,6±4,0	31,01±0,05	3,49±0,06
ГК-індукована остеохондро-патія (ІІ серія)	105,0±1,7	160,0±3,6	229,7±1,9	28,81±0,3	3,07±0,04
P	>0,05	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001

3.2. Зміни мінеральної щільності кісткової тканини та біохімічних показників у експериментальних тварин після проведення їм тривалого курсу преднізолону

Для оцінки змін мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) під впливом тривалого курсу преднізолону були визначені такі параметри як зольність кісткової тканини та вміст в ній кальцію та фосфору (табл. 3.2.1).

Як видно з даних, представлених у таблиці, зольність кісткової тканини у інтактних тварин склала 59,5±1,2 %, в той же час, у тварин, що

отримували преднізолон, цей параметр був суттєво нижчим – 53,3±0,1 % (p≤0,001) [202].

Таблиця 3.2.1

Показники мінеральної щільності кісткової тканини у експериментальних тварин I та II серій

Група	Досліджуваний показник після експерименту				
	Зольність кісткової тканини (%)	Вміст кальцію у золі великогомілкової кістки (мг/100 мг тканини)	Вміст кальцію у золі великогомілкової кістки (%)	Вміст фосфору у золі великогомілкової кістки (мг/100 мг тканини)	Вміст фосфору у золі великогомілкової кістки (%)
Інтактні тварини (I серія)	59,5±1,2	19,4±0,3	39,0±0,2	10,8±0,2	18,8±0,3
ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	53,3±0,1	15,7±0,4	26,0±0,3	9,2±0,1	16,3±0,2
P	≤0,001	≤0,05	≤0,001	≤0,05	≤0,05

Щодо вмісту кальцію у золі великогомілкової кістки, то у інтактних тварин він склав 39,0±0,2 %, у абсолютному значенні – 19,4±0,3 мг на 100 мг тканини. Дані показники у тварин I серії були суттєво нижчими (p≤0,05) і відповідно склали 26,0±0,3 % і 15,7±0,4 мг на 100 мг тканини.

Вміст фосфору у золі великогомілкової кістки у тварин I серії склав 18,8±0,3 %, тобто 10,8±0,2 мг на 100мг тканини. Кількість цього мінералу в золі великогомілкової кістки у тварин II серії склала 16,3±0,2%, тобто 9,2±0,1 мг на 100мг тканини. Відповідні середні параметри в зазначених серіях тварин достовірно відрізнялись один від одного (p≤0,05).

Введення преднізолону тваринам II серії протягом 30 діб призвело до суттєвих змін їх біохімічних показників, що відображають стан мінерального та D- вітамінного обміну (табл. 3.2.2).

Таблиця 3.2.2

Біохімічні показники, визначені в плазмі крові у експериментальних тварин I та II серій

Досліджуваний показник після експерименту	Інтактні тварини (I серія)	ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	P
Кальцій (ммоль/л)			
-загальний	2,29±0,03	1,91±0,02	≤0,05
-білковозв'язаний	0,23±0,01	0,22±0,01	>0,05
-ультрафільтрувальний	2,06±0,01	1,69±0,02	≤0,05
Фосфор (ммоль/л)	2,20±0,03	1,82±0,02	≤0,05
Лужна фосфатаза (Од/л)			
-загальна	235,0±0,5	347,0±0,5	≤0,001
-кишковий ензим	52,6±0,9	92,0±0,7	≤0,001
-кістковий ензим	200,0±3,0	320,0±1,0	≤0,001
$25(OH)D_3$ (нг/мл)	38,1±1,2	7,9±0,2	≤0,001
$25(OH)D_3$ (нмоль/л)	92,3±3,0	19,85±0,5	≤0,001

Рівень загального кальцію в сироватці крові у інтактних тварин склав 2,29±0,03 ммоль/л, білковозв'язаного кальцію – 0,23±0,01 ммоль/л, ультрафільтрувального кальцію – 2,06±0,01 ммоль/л. Відповідні параметри в серії тварин, що отримували преднізолон, склали 1,91±0,02 ммоль/л, 0,22±0,01 ммоль/л і 1,69±0,02 ммоль/л. Відповідні параметри рівнів загального і ультрафільтрувального кальцію в зазначених групах достовірно відрізнялись один від одного ($p \leq 0,05$). Достовірної різниці між

параметрами рівнів білковозв'язаного кальцію в даних серіях не виявлено ($p>0,05$).

Рівень фосфору у тварин I серії склав 2,20±0,03 ммоль/л, а у тварин II серії цей рівень був достовірно нижчим ($p\leq0,05$) і склав 1,82±0,02 ммоль/л.

Параметри рівнів загальної лужної фосфатази, її кишкового і кісткового ізоферментів у інтактних тварин відповідно склали 235,0±0,5 Од/л, 52,6±0,9 Од/л і 200,0±3,0 Од/л. Всі вони були достовірно нижчими за відповідні параметри в серії тварин, що отримували преднізолон (≤0,001). В II серії тварин середній параметр загальної лужної фосфатази був 347,0±0,5 Од/л, її кишкового ізоферменту – 92,0±0,7Од/л, кісткового ізоферменту – 320,0±1,0 Од/л.

Значення рівня 25(0H)D_3 в крові тварин I серії склало 38,1±1,2 нг/мл, в крові тварин II серії – 7,9±0,2 нг/мл. Зазначені параметри також достовірно відрізнялись один від одного (≤0,001).

3.3.Морфологічна будова діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарного хрящів у інтактних тварин

Компактна кістковій тканина діафіза стегнової кістки у інтактних тварин на поперечному зрізі середньої третини діафіза чітко містила два шари генеральних пластинок – ендостальний та періостальний (рис. 3.3.1). При цьому у трьох тварин між ендостальним та періостальним прошарками був відзначений прошарок незакінченої перебудови попередніх остеонних структур, які були утворенні в процесі потовщення діафізарного відділу кістки (ріст у товщину).

У переважній більшості тварин періостальний прошарок компактної кісткової тканини був товщим, ніж ендостальний. Тільки в двох спостереженнях ці прошарки були однакової товщини. Проміжний шар компактної кісткової тканини мав вигляд невеликих, з нерівномірною товщиною витончених ділянок циркулярної форми., тільки в двох

випадках він визначався по всьому периметру діафіза. Шари зовнішніх та внутрішніх генеральних пластинок у даної серії тварин повністю сформованими не були.

Рис. 3.3.1. Структура компактного шару стегнової кістки. Гістопрепарат середньої третини діафіза стегнової кістки тварини із серії інтактних. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

Гістологічна будова суглобового хряща головки стегнової кістки контрольних тварин характеризується зональністю без наявних ознак її порушення. Чітких меж переходу поверхневої зони суглобового хряща в проміжну та з проміжної у глибоку не визначалося. У формуванні поверхневої та проміжної зон суглобового хряща брали участь дрібні типові сплющенні хондроцити та їх ізогенні групи. Зона кальцинованого хряща, що межувала з підхрящовою кістковою пластинкою, містила великі об’ємні хондроцити, які, порівняно з клітинами поверхневої та проміжної зон суглобового хряща, були з ознаками слабкого фарбування та пікнозу.

Структура підхрящової кісткової пластинки була з явищами активної перебудови, що пов’язано з віковими особливостями (незакінченим ростом) тварин (рис. 3.3.2).

Рис. 3.3.2. Зональна будова клітинних елементів та основної речовина центральної частини суглобового хряща. Гістопрепарат головки стегнової кістки тварини із серії інтактних. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 150.

Гістологічна картина структурно-функціональної організації проксимального епіфізарного хряща стегнової кістки у тварин І серії представлена на рис. 3.3.3. На гістологічних зрізах інтактних тварин епіфізарний хрящ мав форму дуги, що була спрямована вигином у проксимальному напрямку і утворював прошарок між губчастою кісткою епіфіза і зоною окостеніння метафіза. До метафізарного боку епіфізарного хряща прилягає комплекс видовжених, орієнтованих паралельно осі кістки первинних кістково-хрящових перекладок, що є складовою частиною зони окостеніння метафіза. Кісткова частина епіфіза мала звичайну, характерну для кісткової тканини цієї локалізації будову у вигляді кісткових перекладок, оточених по периферії епіфіза замикальною кістковою

пластинкою. У метафізі кісткові перекладки мали повздовжню спрямованість та складалися з проксимального шару первинних тонких перекладок, що тільки формуються, та дистального шару потовщених вторинних перекладок.

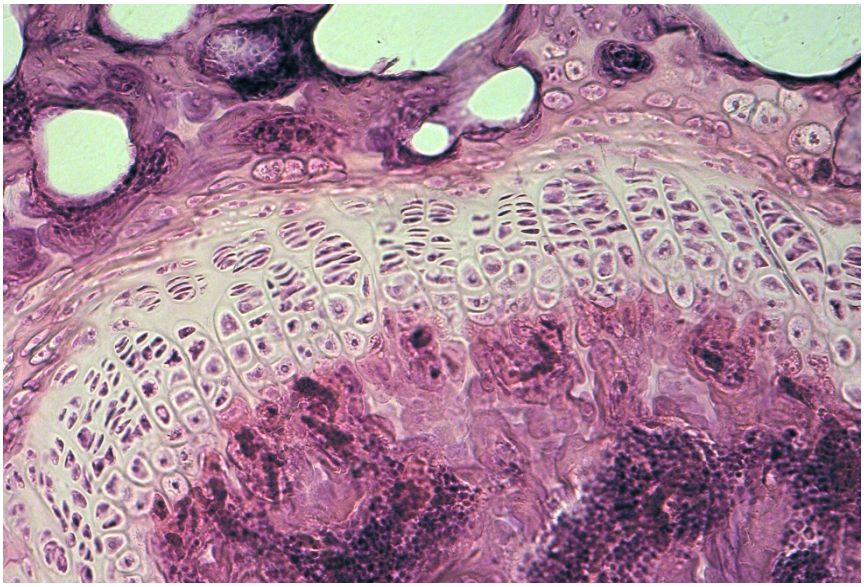

Рис. 3.3.3. Зональна будова проксимального епіфізарного хряща стегнової кістки на ділянці активного кісткоутворення. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із серії інтактних. Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

Дані про будову компактного шару та губчастої кісткової тканини діафіза та епіметафіза проксимального відділу стегнової кістки, суглобового та епіфізарного хрящів, що були отримані у інтактних тварин, стали контрольними ознаками для оцінювання впливу преднізолону на структурно-функціональну організацію компактної кісткової тканини діафіза і на процес росту кістки.

3.4. Зміни морфологічної будови діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарного хрящів під впливом преднізолону

У тварин, що отримали 30-денний курс преднізолону, у порівнянні з інтактними тваринами на гістологічних зрізах компактної кісткової тканини та остеонних структур діафіза були визначені ознаки порушення процесів формування, що проявлялися зниженням щільності кісткової тканини, виникненням ділянок з численними щілинами та порожнинами, а також втратою можливості аппозиційного росту і формування систем пластинчастої будови кісткової тканини, внутрішніх та зовнішніх шарів генеральних кісткових пластинок, характерних для діафізарного відділу кістки (рис. 3.4.1).

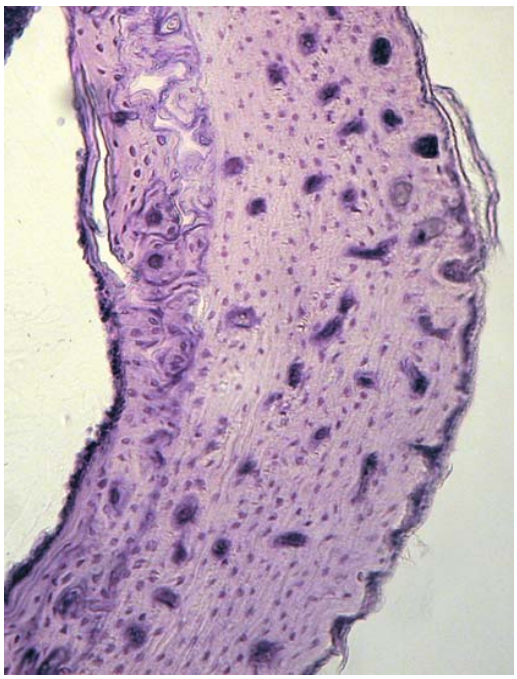

Рис. 3.4.1. Структура компактного шару стегнової кістки. Гістопрепарат середньої третини діафіза стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

При цьому в компактній кістці, особливо на ендостальній та періостальній поверхнях діафіза, визначались ділянки з дистрофічними та некротичними змінами.

У тварин II серії, що отримували преднізолон, відбувались також зміни і в морфологічній будові суглобового хряща (рис. 3.4.2).

Рис. 3.4.2. Клітинні елементи та основана речовина центральної частини суглобового хряща голівки стегнової кістки. Гістопрепарат головки стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 150.

Ці гістологічні зміни характеризувалися зниженням інтенсивності фарбування клітинних елементів й основної речовини кісткової тканини, а також збільшенням ділянок хрящового матриксу у проміжній та глибокій зонах, що не містять хондроцитів. При цьому зональна структура суглобового хряща була збереженою (рис. 3.4.3).

Рис. 3.4.3. Підвищення кількість великих ділянок хрящового матриксу (позначені стрілками) у проміжній та глибокій зонах суглобового хряща голівки стегнової кістки. Гістопрепарат головки стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 150.

Виявлені зміни гістологічної структури епіфізарного хряща у тварин, що отримували преднізолон, в першу чергу проявлялися зменшенням товщини і порушенням зональної будови. При цьому визначалися зменшення кількості клітин хряща та дегенеративно-некротичні зміни як клітин так і тканини епіфіза та метафіза. Також ці зміни на більшому протязі епіфізарного хряща супроводжувалися повним зупиненням ендохондріального окостеніння та повздовжнього росту, порушенням формування структури кісткових перекладок епіфіза та метафаза. Над шаром вторинних кісткових перекладок шар новоутворених первинних перекладок був практично відсутнім (рис. 3.4.4; 3.4.5).

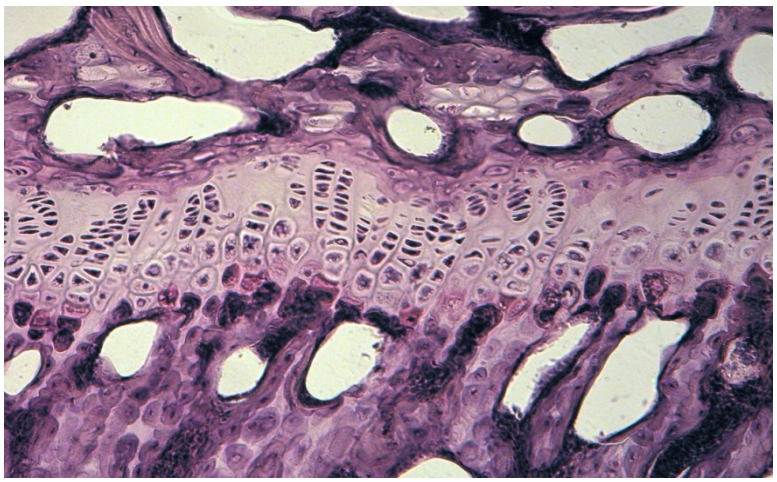

Рис. 3.4.4. Зміни зональної структури епіфізарного хряща. Поширені ділянки зникнення колонок хрящових клітин. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 150.

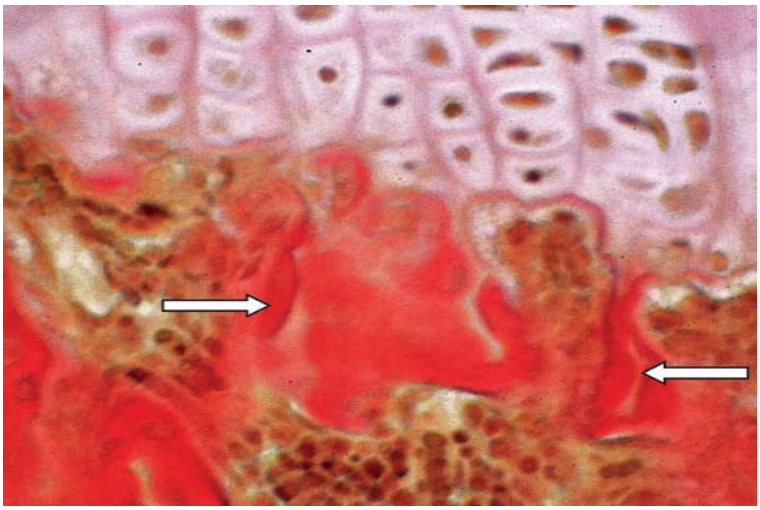

Рис. 3.4.5. Вкорочення первинних кісткових перекладок в зоні окостеніння метафіза (позначено стрілками). Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 150.

3.5. Гістоморфометричні показники кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів у інтактних тварин та у тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією

У вторинній спонгіозі проксимального метафіза стегнової кістки у досліджуваних тварин визначали утворену широкопетлясту сітку, в якій товщина перекладок, особливо в ділянках їхнього злиття та розгалуження, була збільшеною та значно варіювала за площею, що її займала кісткова тканина в зрізах (рис. 3.5.1; 3.5.2). У товщі трабекул вторинної спонгіози в деяких місцях виявлялися дрібні інтерстиціальні острівці залишків нерезорбованого хрящового матриксу. Кістковий мозок у вторинній спонгіозі метафізу у всіх тварин відповідав червоному кровотворному [203].

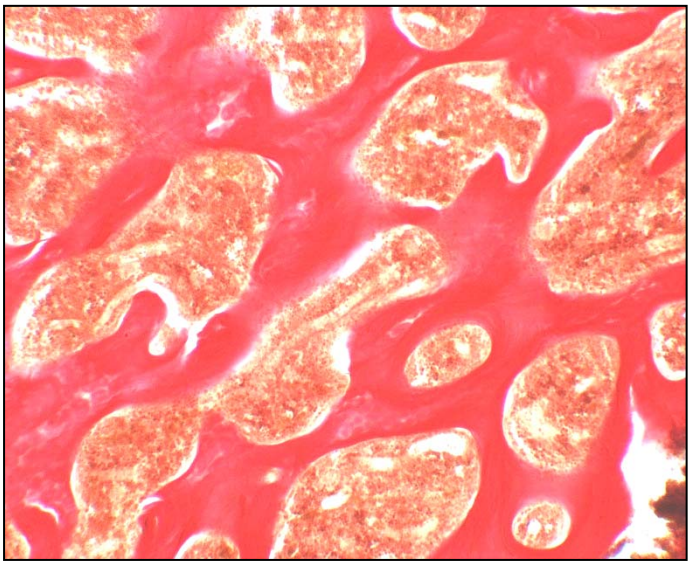

Рис. 3.5.1. Вторинна спонгіоза у поздовжньому зрізі проксимального метафіза стегнової кістки. Гістопрепарат проксимального метафіза стегна інтактної тварини. Забарвлення гематоксилін-пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 75.

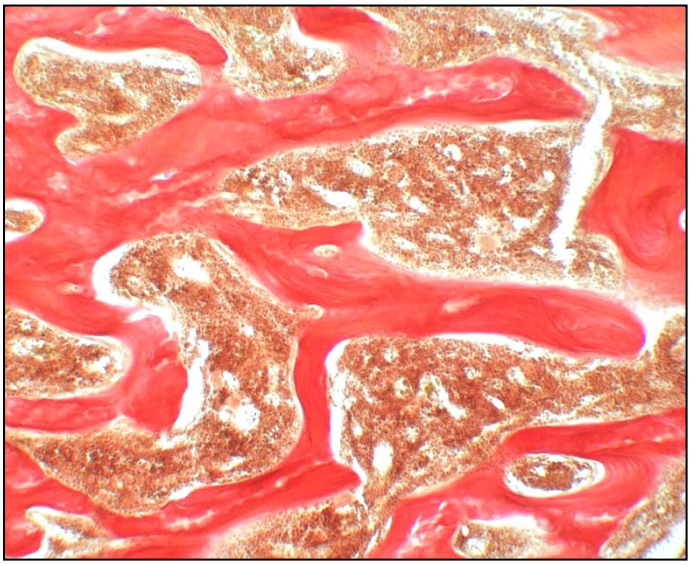

Рис. 3.5.2. Вторинна спонгіоза у поздовжньому зрізі проксимального метафіза стегнової кістки. Гістопрепарат проксимального метафіза стегна тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксилін-пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 75.

Конфігурація поперечного зрізу діафіза стегнової кістки щура відрізнялась у тварин I та II серій. У всіх випадках добре визначалася розташована по задній поверхні шорстка лінія стегна, іноді – у вигляді доволі масивного виступу, всередині якого містилася ділянка спонгіози. Кістковий мозок діафіза стегнових кісток завжди був змішаним кровотворним (рис. 3.5.3; 3.5.4).

Ділянка кортексу, де вимірювали кількість перетинів судинних каналів, була розташована по передній поверхні діафіза. Будова компактної кісткової тканини в цій ділянці кортексу стегнової кістки щура має певні особливості, які відрізняють її від аналогічних кісток більш великих тварин та людини. Остеони в діфізі стегнової кістки щурів здебільшого дуже дрібні та зазвичай складаються з не більше ніж 2-3 циркулярних пластинчатих циліндрів. Остеони подекуди зовсім не утворюють добре вираженого остеонного шару між шарами генеральних пластинок, або цей шар доволі вузький.

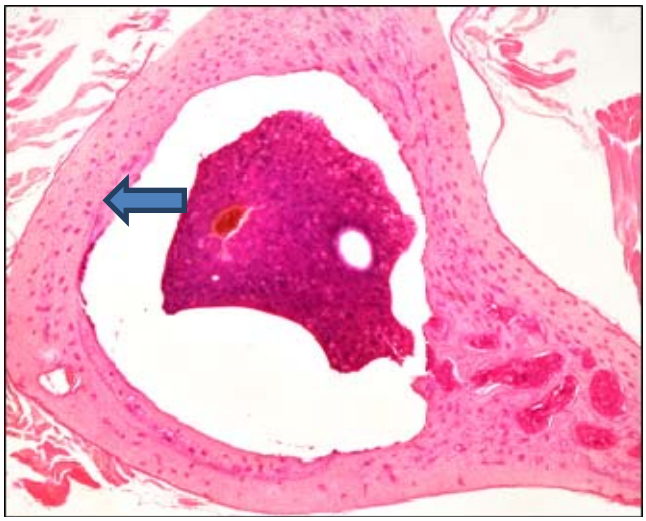

Рис. 3.5.3. Поперечний зріз діафіза стегнової кістки. Стрілкою позначено ділянку, де визначали кількість перетинів судинних каналів на одиницю площі зрізу кортексу. Гістопрепарат діафіза стегна інтактної тварини. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення × 24.

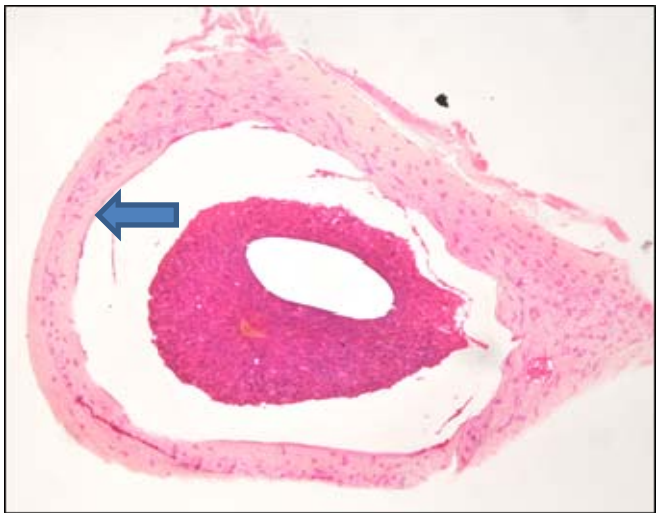

Рис. 3.5.4. Поперечний зріз діафіза стегнової кістки. Стрілкою позначено ділянку, де визначали кількість перетинів судинних каналів на одиницю площі зрізу кортексу. Гістопрепарат діафіза стегна тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення × 24.

Часто дрібні остеони рівномірно розподілені серед суцільних циркулярних пластинок, які утворюють основну масу компактної тканини кортексу. Більшість судинних каналів в кортексі проходять вздовж довгої осі діафіза, проте деякі – під певним кутом до неї, при цьому перетин має вигляд відрізка (рис. 3.5.5; 3.5.6)

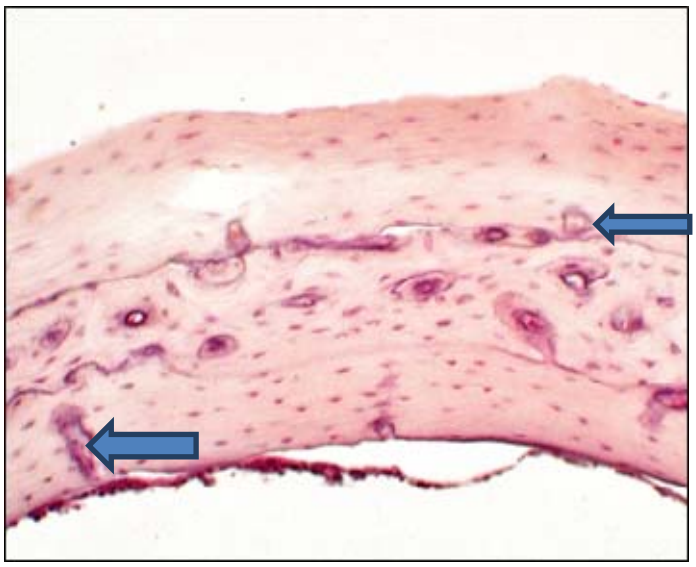

Рис. 3.5.5. Ділянка кортексу, де проводився підрахунок кількості перетинів судинних каналів (позначені стрілками) при відносно «низькому» параметрі питомої щільності перетинів на одиницю площі зрізу кортексу Гістопрепарат діафіза стегна інтактної тварини. Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення × 150.

Кількість перетинів визначених судинних каналів в різних ділянках сегмента поперечного зрізу діафіза стегнової кістки варіювала. У деяких тварин у шарах внутрішніх та зовнішніх генеральних пластинок судинних каналів їх було доволі мало, а самі перетини судинних каналів були зосередженні у доволі тонкому остеонному шарі. Тому для підсилення об’єктивізації вимірювання кількості судинних каналів у кортексі нами

використовувавсяч метод визначення питомої кількості перетинів судинних каналів на одиницю площі поперечного зрізу кортексу діафіза.

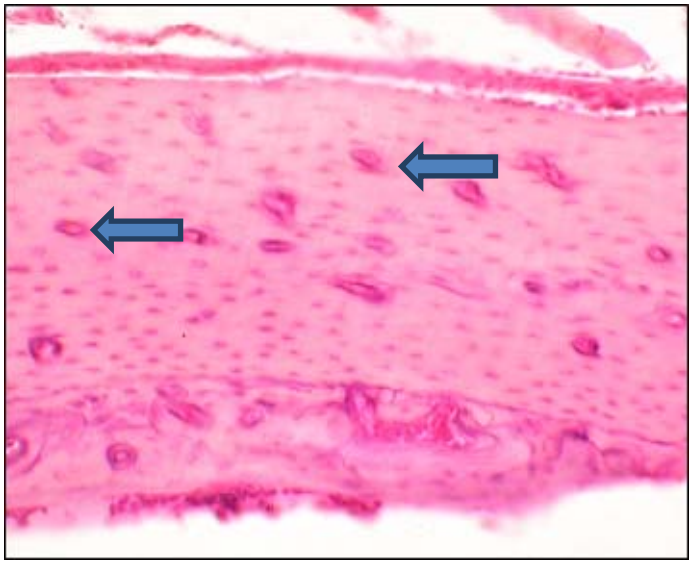

Рис. 3.5.6. Ділянка кортексу, де проводився підрахунок кількості перетинів судинних каналів (позначені стрілками) при відносно «високому» параметрі питомої щільності перетинів на одиницю площі зрізу кортексу. Гістопрепарат діафіза стегна тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксилін-еозином, збільшення × 150.

Рівні гістоморфометричних параметрів кісткової тканини у інтактних тварин та тварин II серії, що отримували преднізолон, представлені в таблиці 3.5.1. Показник кісткового об'єму вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки у тварин II серії мав тенденцію до збільшення у порівнянні з відповідним показником у інтактних тварин і склав ($\bar{X}\pm s_{\bar{x}}$: середня величина та стандартна помилка середньої) 37,654±1,924, у інтактних тварин – 36,934±3,401 ($p>0,05$). Показник площі компактної кісткової тканини в середині діафіза стегнової кістки у тварин II серії склав 1,875±0,161, у інтактних тварин – 2,365±0,146. Між цими показниками відзначена достовірна різниця ($p<0,05$). Питоме число

перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу у тварин II серії склало 208,983±15,883. Даний параметр достовірно не відрізнявся від відповідного у інтактних тварин (p>0,05, за наявної кількості випадків), у яких він склав 188,254±12,756.

Таблиця 3.5.1

Гістоморфометричні показники кісткової тканини у інтактних тварин та тварин II серії, що отримували преднізолон (в комірках зазначено X±sx: середня величина та стандартна помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	P
Кістковий об'єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки (%)	36,934±3,401	37,654±1,924	>0,05
Площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки (мм^2)	2,365±0,146	1,875±0,161	<0,05
Питоме число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу	188,254±12,756	208,983±15,883	>0,05

У тварин II серії, які отримували преднізолон, спостерігали потоншення суглобового хряща у найбільш проксимально розташованих ділянках голівки стегнової кістки (рис. 3.5.7) [203].

Питома кількість хондроцитів на одиницю площі у хрящовій тканині суглобового хряща у тварин зазначеної серії була дещо збільшеною за рахунок переважання дрібних хондроцитів (рис. 3.5.8).

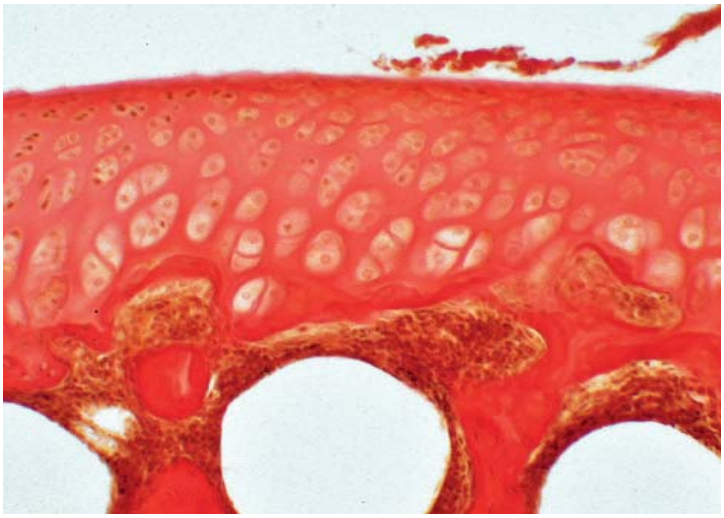

Рис. 3.5.7. Суглобовий хрящ зменшеної товщини, що покриває поверхню головки стегнової кістки. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 150.

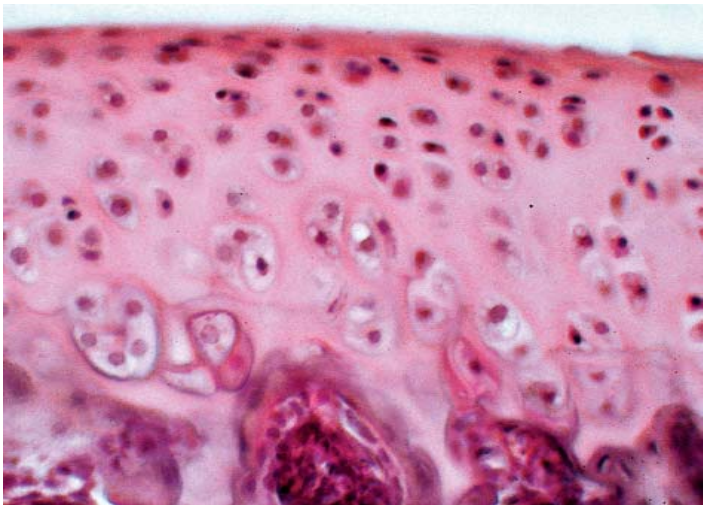

Рис. 3.5.8. Ділянка суглобового хрящаз підвищеною питомою кількістю хондроцитів. Збільшена кількість дрібних хондроцитів у проміжній зоні суглобового хряща. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини із II серії (ГК-індукована остеохондропатія). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 300.

Особливістю суглобового хряща голівки стегнової кістки щурів була наявність ділянок хрящового матриксу, що не містили хондроцитів. Ці ділянки були співвимірними з кластерами хондроцитів або дещо більшого розміру. Дана обставина спонукала до визначення кількості великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу у зрізах суглобового хряща та епіфізарного хряща, що не містили хондроцитів.

Ділянка, де проводили вимірювання гістоморфометричих показників суглобового хряща представлена на рисунку 3.5.9.

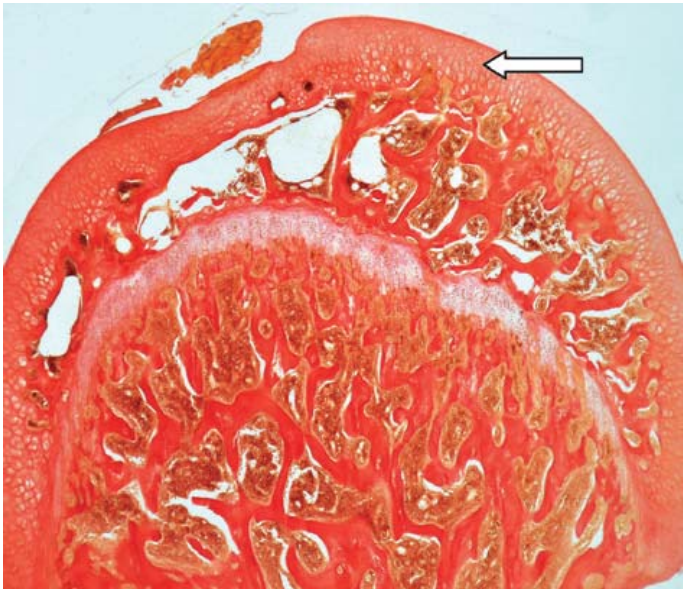

Рис. 3.5.9. Загальний вигляд голівки стегнової кістки щура. Стрілкою позначено ділянку, де проводилися вимірювання гістоморфометричних показників. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки інтактної тварини. Забарвлення гематоксиліном та пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 20.

Гістоморфометричні показники, що були визначені в суглобовому хрящі інтактних тварин, та щурів з II серії, що отримували преднізолон представлені в таблиці 3.5.2.

Товщина суглобового хряща у тварин з ГК-індукованою остеохонодропатією була меншою від середнього параметра у інтактних

тварин (p>0,05, за наявної кількості випадків), і відповідно склала 0,160±0,006 мм та 0,208±0,036 мм.

У тварин II серії мало місце збільшення питомої кількості хондроцитів (p>0,05). Так, середній параметр цього показника в цій серії досліджень склав 2982,362±712,065 /мм^2, в той час як у інтактних тварин він був на рівні 2383,152±398,243 /мм^2.

Щодо кількості великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу, то в II серії тварин середній параметр цього показника дорівнював 11,857±1,326 ділянкам, у інтактних тварин – 12,167±0,679 ділянок.(>0,05, за наявної кількості випадків).

Таблиця 3.5.2

Гістоморфометричні показники суглобового хряща у інтактних тварин та тварин II серії, що отримували преднізолон (в комірках зазначено ~~X~~±~~s~~$_x$ середня величина та помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	P
Товщина (мм)	0,208±0,036	0,160±0,006	>0,05
Питома кількість хондроцитів (на 1 мм^2)	2383,152±398,243	2982,362±712,065	>0,05
Кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу	12,167±0,679	11,857±1,326	>0,05

При вивчені гістоморфометричних показників епіфізарного хряща у щурів, що отримули преднізолон, та у інтактних тварин були відзначені наступні співвідношення (табл. 3.5.3).

Товщина епіфізарного хряща після введення преднізолону не зменшувалась і була практично рівною в зазначених серіях тварин (у тварин II серії – 0,167±0,0104 мм; у інтактних тварин – 0,170±0,013 мм; (p>0,05, за наявного числа випадків).

Таблиця 3.5.3

Гістоморфометричні показники епіфізарного хряща у інтактних тварин та тварин II серії, що отримували преднізолон (в комірках зазначено $\bar{X}\pm s_{\bar{x}}$середня величина та помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	P
Товщина (мм)	0,170±0,013	0,167±0,0104	>0,05
Питома кількість хондроцитів (на 1 мм^2)	4106,582±163,239	4381,921±380,279	>0,05
Кількість ділянок інтертериторіального хрящового матриксу	1,600±0,400	2,333±0,558	>0,05

Після введення преднізолону у тварин II серії в епфізарному хрящі відзначене підвищення питомої кількості хондроцитів, що склала у них 4381,921±380,279 на 1 мм^2. У інтактних тварин цей показник дорівнював 4106,582±163,239 на 1 мм^2($p>0,05$, за наявного числа випадків).

Щодо кількості великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу епіфізарного хряща, то вона була більшою у тварин II серії і склала в середньому 2,333±0,558 ділянки. У інтактних тварин середній параметр цього показника склав 1,600±0,400 ділянки ($p>0,05$, за наявного числа випадків).

За результатами, представленими в даному розділі можна зробити наступні висновки.

- Моделювання глюкокортикоїд-індукованої остеохонодропатії у щурів шляхом перорального уведення преднізолону в дозі 0,5 мг/100 маси на добу протягом 30 днів призводить до зміни середніх параметрів низки біохімічних, остеометричних та гістоморфометричних показників структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин в порівнянні з відповідними показниками у інтактних тварин.

- З-поміж біохімічних показників достовірно нижчими були рівні кількості кальцію, фосфору та вітаміну D_3 ($25(OH)D_3$) в крові експериментальних тварин, що отримували преднізолон. Рівні параметрів кількості лужної фосфатази та її ізоферментів, навпаки, в зазначеній групі тварин підвищувались.
- Також у тварин, що отримували преднізолон, суттєво зменшувалась маса великогомілкової кістки, довжина та товщина стегнової кістки.
- Серед гістоморфометричних показників, що характеризують стан тканин стегнової кістки, визначено зменшення площі компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки у тварин, що отримували преднізолон (достовірно), а також збільшення у них питомого числа перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу (не достовірно за наявного числа випадків).
- У тварин, що отримували преднізолон, відзначено зрушення морфометричних показників, що характеризують структурно-функціональний стан суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки. Найбільш вираженими змінами відзначилися наступні показники: товщина суглобового хряща (зменшення); питома кількость хондроцитів на одиницю площі суглобового та епіфізарного хряща (збільшення); кількість великих ділянок матриксу в такнині епіфізарного хряща (збільшення), товщина епіфізарного хряща (зменшення).
- Всі визначені структурно-функціональні зміни кісткової та хрящової тканин у тварин, що отримували преднізолон, засвідчили про адекватність застосованої експериментальної моделі глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії, а також про можливість її застосування для оцінки ефективності дії профілактичних та/або лікувальних медичних засобів при зазначеному патологічному процесі.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ ВІТАМІНІВ D_3 ТА Е НА МІНЕРАЛЬНИЙ ТА D-ВІТАМІННИЙ ОБМІН НА ФОНІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРЕДНІЗОЛОНУ

4.1. Зміни загального стану, маси тіла та остеометричних показників у експериментальних тварин під дією вітамінів D_3 та Е при тривалому застосуванні преднізолону

Загальний стан щурів, у яких моделювали остеохондропатію на фоні прийому вітаміну D_3 (III серія) та сумісному прийомі вітамінів D_3 та Е (IV серія), через 30 діб експерименту практично не відрізнявся від інтактних тварин. На відміну від тварин, у яких остеохондропатія розвивалась під дією одного преднізолону (II серія), ці тварини залишались рухливими, активно поїдали корма, їх хутряний покрив не відрізнявся від хутряного покриву тварин I серії дослідів [204].

Вихідні середні параметри маси тіла в III та IV серіях тварин до початку експерименту були аналогічними показнику інтактних тварин та тварин II серії і відповідно склали 104,0±1,5 г та 104,1±1,4 г ($p>0,05$). Через 30 діб експерименту маса тіла в серії тварин, що отримувала вітамін D_3 склала 160,0±3,0 г, її рівень був ідентичним до відповідного рівня тварин II серії ($p>0,05$) і достовірно був нижчім за масу тіла інтактних тварин у кінці експерименту ($p\leq0,001$). Маса тіла тварин, що одночасно отримували вітамін D_3 та Е, була дещо вищою (165,0±4,0 г), але, як і у тварин III серії, вона не була достовірно вищою за середній параметр у тварин II серії ($p>0,05$), в той же час була суттєво нижчою за масу тіла інтактних тварин ($p\leq0,001$) (табл. 4.1.1).

Маса великогомілкової кістки у тварин III серії в кінці експерименту склала в середньому 246±1,2 г і достовірно була більшою за середній

параметри цього показника тварин ІІ серії ($p \leq 0,05$), але при цьому все ж таки була меншою ніж маса великогомілкової кістки інтактних тварин.

Таблиця 4.1.1

Маса тіла та остеометричні показники у експериментальних тварин І – ІV серій

Група	Досліджуваний показник				
	Маса тіла до експерименту (г)	Маса тіла після експерименту (г)	Маса великогомілкової кістки (мг)	Довжина стегнової кістки (мм)	Товщина стегнової кістки (мм)
Інтактні тварини (І серія)	105,0±1,0	190,0±4,0	254,6±4,0	31,01±0,05	3,49±0,06
ГК-індукована остеохондропатія (ІІ серія)	105,0±1,7	160,0±3,6*	229,7±1,9*	28,81±0,25*	3,07±0,04*
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3 (ІІІ серія)	104,0±1,5	160,0±3,0*	246±1,2**	29,01±0,03*	3,11±0,06*
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та Е (ІV серія)	104,1 ±1,4	165,0±4,0*	272,8±2,4**	29,08±0,43*	3,12±0,05*

Примітка: * – достовірна різниця в порівнянні з І серію дослідів ($p \leq 0,05$);

** – достовірна різниця в порівнянні з ІІ серією дослідів ($p \leq 0,05$)

Щодо таких визначених остеометричних показників як довжина та товщина стегнової кістки, то вони у тварин, що отримували вітаміни, були дещо вищими за показники ІІ серії тварин, де відтворювали лише модель глюкокортикоїдної остеохондропатії, але різниця не була вірогідною ($p > 0,05$). По відношенню до відповідних середніх параметрів інтактних

тварин довжина і товщина стегнової кістки у тварин III та IV серій залишалися достовірно меншими ($p \leq 0,05$) (табл. 4.1.1).

4.2. Мінеральна щільність кісткової тканини та біохімічні показники при експериментальній остеохондропатії, що розвивалась на фоні прийому вітаміну D_3 та одночасного прийому вітамінів D_3 та Е

У тварин III та IV серій, у яких на фоні прийому преднізолону застосовувались вітамін D_3, або вітамін D_3 сумісно з вітаміном Е, через 30 діб експерименту відзначені більш високі рівні зольності кісткової тканини, ніж у тварин II серії, які отримували лише преднізолон (табл.4.2.2). Так, зольність кісткової тканини у щурів IV серії склала 59,8±0,3 %, і вона була вищою за середній параметр, визначений в III серії – 53,3±0,1 %. При цьому обидва параметри вірогідно відрізнялись від відповідного, що був визначений у II серії дослідних тварин ($p \leq 0,05$), і практично були рівнозначними параметру інтактної групи щурів [204].

Кількість кальцію у золі великогомілкової кістки, що була визначена у тварин IV серії склала 17,1±0,3 мг/100 мг тканини (32,1±0,4 %). У тварин III серії середній параметр цього показника був дещо нижчим і склав 16,7±0,2мг/100 мг тканини (30,6±0,3 %). Обидва ці параметри достовірно не відрізнялись один від одного ($p > 0,05$), але були достовірно нижчими за відповідний параметр інтактних тварин, хоча при цьому суттєво перевищували відповідний параметр тварин II серії ($p \leq 0,05$).

Подібні співвідношення середніх параметрів відзначені і для показника вмісту фосфору у золі великогомілкової кістки. Даний параметр у тварин IV серії був наближеним до параметра інтактних тварин і склав 10,2±0,1 мг/100 мг тканини (18,5±0,2 %), в той же час він перевищував параметр, визначений в III серії тварин, де склав 9,8±0,1 мг/100 мг тканини

(17.2±0,1 %). Обидва ці параметри були достовірно більшими за значення в групі тварин, що отримували лише преднізолон (p≤0,05).

Таблиця 4.2.2

Показники мінеральної щільності кісткової тканини у експериментальних тварин I – IV серій

Група	Досліджуваний показник				
	Зольність кісткової тканини (%)	Вміст кальцію у золі великогомілкової кістки (мг/100 мг тканини)	Вміст кальцію у золі великогомілкової кістки (%)	Вміст фосфору у золі великогомілкової кістки (мг/100 мг тканини)	Вміст фосфору у золі великогомілкової кістки (%)
Інтактні тварини (I серія)	59,5±1,2	19,4±0,3	39,0±0,2	10,8±0,2	18,8±0,3
ГК-індукована остеохондропатія (II серія)	53,3±0,1*	15,7±0,4*	26,0±0,3*	9,2±0,1*	16,3±0,2*
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3 (III серія)	58,3±0,7**	16,7±0,2**	30,6±0,3**	9,8±0,1**	17.2±0,1**
ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та E (IV серія)	59,8±0,3**	17,1±0,3**	32,1±0,4**	10,2±0,1**	18,5±0,2**

Примітка: * – достовірна різниця в порівнянні з I серію дослідів (p≤0,5);

** – достовірна різниця в порівнянні з II серією дослідів (p≤0,5)

Середні параметри біохімічних показників плазми крові у досліджуваних тварин III та IV серій, що відображають стан мінерального та D-вітамінного обміну, та їх співвідношення з відповідними параметрами у тварин I та II серій представлені в таблиці 4.2.3. Загалом, треба відзначити, що у групі щурів, що на фоні формування ГІОХП отримували

одночасно вітаміни D_3 та Е, ці показники виявляли середні параметри, що були ближчими до параметрів інтактних тварин, ніж в групі, де тварини при моделюванні остеохондропатії отримували лише вітамін D_3.

Таблиця 4.2.3

Біохімічні показники, визначені в плазмі крові у експериментальних тварин I – IV серій

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГК-індукована остеохондро-патія (II серія)	ГК-індукована остеохондропа-тія на фоні застосування вітаміну D (III серія)	ГК-індукована остеохондропа-тія на фоні застосування вітамінів D та E (IV серія)
Кальцій (ммоль/л)				
-загальний	2,29±0,03	1,91±0,02*	2,20±0,03**	2,26±0,02**
-білковозв'язаний	0,23±0,01	0,22±0,01	0,20±0,01	0,21±0,01
-ультрафільтрувальний	2,06±0,01	1,69±0,02*	1,98±0,01**	2,05±0,02**
Фосфор (ммоль/л)	2,20±0,03	1,82±0,02*	2,20±0,01**	2,28±0,02**
Лужна фосфатаза (Од/л)				
-загальна	235,0±0,5	347,0±0,5*	273,0±0,2**	260,0±1,0**
-кишковий ензим	52,6±0,9	92,0±0,7*	87,0±0,5**	83,0±0,7**
-кістковий ензим	200,0±3,0	320,0±1,0*	250,0±1,5**	235,0±1,2**
$25(OH)D_3$(нг/мл)	38,1±1,2	7,9±0,2*	24,2±2,0**	50,0±1,2**
$25(OH)D_3$ (нмоль/л$^-$)	(92,3±3,0)	(19,85±0,5)*	(60,6±5,0) **	(126,8±3,5)**

Примітка: * – достовірна різниця в порівнянні з I серію дослідів ($p \leq 0,05$);

** – достовірна різниця в порівнянні з II серією дослідів ($p \leq 0,05$)

Так, рівень загального кальцію у тварин IV серії склав 2,26±0,02 ммоль/л, рівень білковозв'язаного – 0,21±0,01 ммоль/л, а ультрафільтрувального – 2,05±0,02 ммоль/л. В III серії тварин відповідні середні параметри склали 2,20±0,03 ммоль/л, 0,20±0,01 ммоль/л та 1,98±0,01 ммоль/л. Рівень білковозв'язаного кальцію не мав суттєвої

різниці з відповідними середніми параметрами II серії тварин та у інтактних тварин ($p>0,05$). Щодо рівнів загального та ультрафільтрувального кальцію в плазмі крові, то в IV та III серіях вони достовірно відрізнялись від параметра тварин II серії ($p\leq0,05$) і наближались до середніх значень у інтактних тварин.

Середній параметр рівня фосфору в плазмі крові у тварин IV серії склав 2,28±0,02 ммоль/л, у тварин III серії 2,20±0,01 ммоль/л. Між ними визначена достовірна різниця ($p\leq0,05$). Обидва ці параметри були достовірно вищими за рівень кількості фосфору у групі тварин, що отримували тільки преднізолон і максимально наближались до значення, яке було визначене у інтактних щурів.

Як ми вже відзначали раніше, середні рівні лужної фосфатази та її ензимів у тварин, у яких моделювалась ГК-індукована остеохондропатія, значно перевищували такі, що були визначені у інтактних тварин. У тварин IV серії дослідів ці середні параметри відповідно склали: 260,0±1,0 Од/л; 83,0±0,7 Од/л та 235,0±1,2 Од/л. Всі вони достовірно були нижчими за відповідні параметри у тварин II серії ($p\leq0,05$). Відповідні параметри в III серії тварин (273,0±0,2 Од/л; 87,0±0,5 Од/л; 250,0±1,5 Од/л) також були достовірно нижчими за відповідні рівні у тварин II серії ($p\leq0,05$), але при цьому вони все ж перевищували параметри ($p\leq0,05$) серії тварин, що отримували одночасно вітаміни D_3 та Е.

Щодо середнього параметра показника $25(OH)D_3$ в крові досліджуваних щурів, то він виявився достовірно вищим саме в IV серії – 50,0±1,2 нг/л ($p\leq0,05$) порівняно з відповідними параметрами, визначеними в усіх інших серіях тварин. Середній параметр у III серії склав 24,2±2,0 нг/л, він був достовірно нижчим за параметр серії інтактних тварин, але при цьому був достовірно вищим за серії тварин, яким моделювали остеохондропатію без використання вітамінів D_3 та Е.

За результатами, представленими в даному розділі, можна зробити наступні висновки.

- Превентивне введення вітамінів D_3 та Е під час моделювання ГІОХП призводить до більш позитивних наслідків щодо зміни маси тіла та остеометричних показників у експериментальних тварин, ніж застосування лише одного вітаміну D_3. Більш суттєві позитивні зміни зазначених параметрів мали місце у тварин, що отримували під час моделювання ГІОХП вітаміни D_3 та Е одночасно.

- Превентивне введення вітамінів D_3 та Е при моделюванні ГІОХП забезпечує збереження рівнів низки біохімічних показників крові, що відображають стан мінерального та D-вітамінного обмінів. Зольність кісткової тканини, вміст кальцію та фосфору у золі великогомілкової кістки у тварин, що отримували одночасно вітамін D_3 та Е, були максимально наближеними до відповідних показників серії інтактних тварин. У тварин, що отримували з превентивною метою тільки вітамін D_3, відповідні показники були дещо меншими, але все ж таки достовірно відрізнялись від показників тварин II серії, у яких моделювали ГІОХП у «чистому» виді. Аналогічні зміни відбувались і з такими біохімічними показниками крові, як рівень кальцію, фосфору та кількістю $25(OH)D_3$. При цьому, рівень $25(OH)D_3$ в III серії дослідів навіть достовірно перевищив середній параметр інтактної групи тварин. Середні значення лужної фосфатази та її ензимів в крові виявилися оптимальними також саме в IV серії тварин.

- Враховуючи всі зазначені дані про зміни маси тіла експериментальних тварин, маси великогомілкової кістки, показників, що відображають мінеральну щільність кісткової тканини та біохімічних показників, визначених в крові, можна зробити висновок про більш позитивну профілактичну дію сумісного превентивного застосування вітамінів D_3 та Е щодо попередження ГІ-остеохондропатії порівняно з впливом, що спостерігається при використання тільки вітаміну D_3.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ ВІТАМІНІВ D_3 ТА Е НА МОРФОЛОГІЧНУ БУДОВУ ДІАФІЗА СТЕГНОВОЇ КІСТКИ, СУГЛОБОВОГО І ПРОКСИМАЛЬНОГО ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ ГЛЮКОКОРТИКОЇД-ІНДУКОВАНОЇ ОСТЕОХОНДРОПАТІЇ

5.1. Зміни гістоморфологічної будови діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарного хрящів при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії з превентивним застосуванням вітаміну D_3

У тварин III серії, у яких моделювали остехондропатію з одночасним введенням вітаміну D_3, гістоморфологічна будова компактної кісткової тканини діафіза стегнової кістки наближалась до структури компактної кісткової тканини, визначеної у інтактних тварин (рис. 5.1.1) [203].

В даній серії тварин, на відміну від даних, що були отримані при оцінці гістоморфологічної структури кортексу стегнової кістки тварин II серії дослідів (ГК-індукована остеохондропатія) (рис. 3.4.1), визначались помірні прояви дегенеративно-некротичних змін в компактній кістковій тканині. Але при цьому, як і в II серії тварин, мала місце збільшена кількість судинних каналів, особливо з періостального прошарку, серед яких переважали судинні канали неправильної форми, хоча візуально ця кількість в III серії тварин здавалася меншою. При цьому також виявлялись невеликі ділянки з порушенням формування або відсутності шару внутрішніх та зовнішніх генеральних пластин.

Рис. 5.1.1. Структура компактного шару стегнової кістки. Збільшена кількість остеонних каналів, помірні дегенеративно-дистрофічні зміни. Гістопрепарат середньої третини діафіза стегнової кістки тварини з III серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

Щодо гістоморфологічної будови суглобового хряща головки стегнової кістки у щурів з ГК-індукованою остеохондропатією на фоні застосування вітаміну D_3, то вона, як і структура компактної кісткової тканини в цій групі тварин, також наближалась до такої у інтактних тварин (рис. 5.1.2). Основною відмінністю його структури від відповідної структури хряща II серії тварин (рис. 3.4.2) стала візуальна активізація процесів проліферації хондроцитів у поверхневій зоні, а також зменшення кількості ділянок інтертериторіального хрящового матриксу в проміжній та глибокій зонах, що не містять хондроцитів [205].

Рис. 5.1.2. Клітинні елементи та основна речовина центральної частини суглобового хряща голівки стегнової кістки. Активна проліферація хрящових клітин у поверхневій зоні суглобового хряща. Гістопрепарат головки стегнової кістки тварини з III серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3). Забарвлення гематоксилін-пікрофуксином за ван Гізоном, збільшення × 150.

Гістоморфологічна будова епіфізарного хряща проксимального епіфіза стегнової кістки у тварин III серії представлена на рисунку 5.1.3.

На відміну від інтактних тварин, в цій серії тварин відзначалось зменшення товщини епіфізарного хряща. Також візуально відзначене відновлення ендохондріального окостеніння, що проявлялось збільшенням товщини сформованої первинної спонгіози (ця зона була відсутня у тварин II серії дослідів (рис. 3.4.4)), хоча вона у порівнянні з інтактними тваринами було меншою.

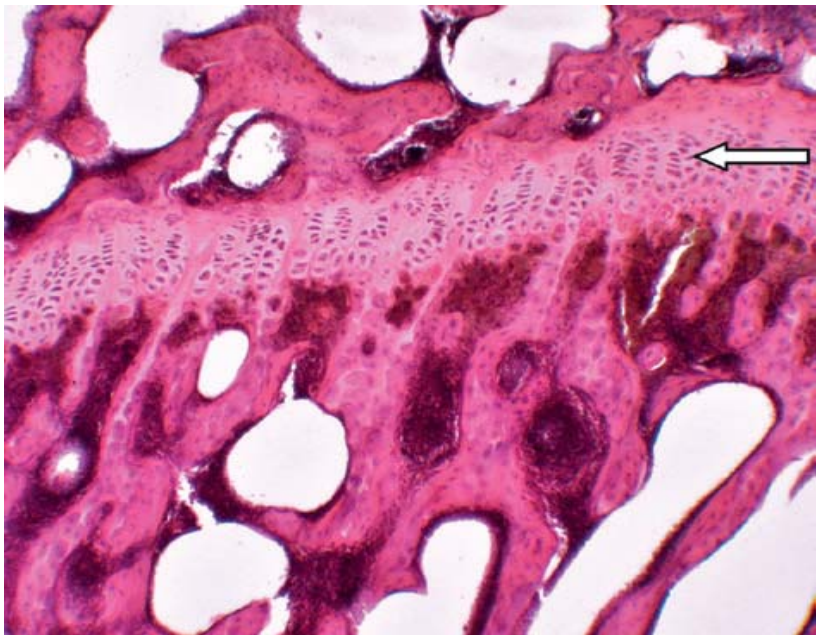

Рис. 5.1.3. Зменшення товщини епіфізарного хряща. Епіфізарний хрящ позначено стрілкою. Ділянки ендохондріального кісткоутворення, клітинної проліферації та формування колонок хрящових клітин. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини з III серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітаміну D_3). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 75.

5.2. Зміни гістоморфологічної будови діафіза стегнової кістки, суглобового і проксимального епіфізарнго хрящів при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії з превентивним одночасним застосуванням вітамінів D_3 та Е

Гістоморфологічна будова діафіза стегнової кістки у тварин, у яких моделювали ГК-індуковану остеохондропатію на фоні одночасного застосування вітамінів D_3 та Е (IV серія), практично відповідала будові

компактної кісткової тканини зазначеної локалізації, що була визначена у інтактних тварин (рис. 5.2.1)

Рис. 5.2.1. Структура компактного шару стегнової кістки. Незначні дегенеративно-дистрофічні зміни. Гістопрепарат середньої третини діафіза стегнової кістки тварини із IV серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та Е). Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

В компактній кістковій тканині на поперечному зрізі середньої третини діафіза стегнової кістки у тварин IV серії визначались характерні два шари генеральних пластинок, з більш товщим періостальним прошарком і без ділянок порушення їх формування. Як і в інтактних тварин, проміжний шар компактної кісткової тканини мав вигляд витончених ділянок циркулярної форми. Візуально кількість судинних каналів у тварин даної групи була практично однаковою до такої, що визначалась в серії інтактних тварин, і більшість із них була правильної форми.

У тварин IV серії гістоморфологічна будова суглобового хряща головки стегнової кістки практично відповідала аналогічній будові суглобового хряща інтактних тварин (рис. 5.2.2).

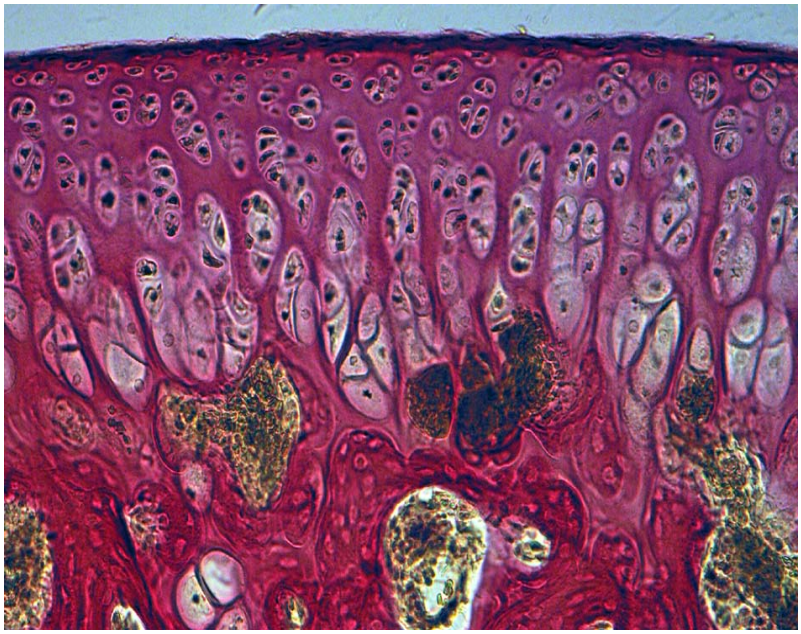

Рис. 5.2.2. Зональна будова клітинних елементів та основної речовина центральної частини суглобового хряща. Гістопрепарат головки стегнової кістки тварини із IV серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та Е) Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 150.

Так, суглобовий хрящ в зазначеній серії не містив ознак порушення його зональності, без чітких меж переходу поверхневої зони суглобового хряща в проміжну та з проміжної у глибоку. В поверхневій та проміжній зоні відзначались дрібні сплющені хондроцити та їх ізогенні групи з чіткими добре зафарбованими ядрами. У глибокій зоні хряща, що межує з підхрящовою кістковою пластинкою, визначались великі хондроцити з ознаками слабкого фарбування.

Гістоморфологічна структура проксимального епіфізарного хряща та метафіза стегнової кістки у тварин IV серії дослідів також була

максимально наближеною до будови відповідних анатомічних ділянок стегнової кістки у серії інтактних тварин (рис. 5.2.3).

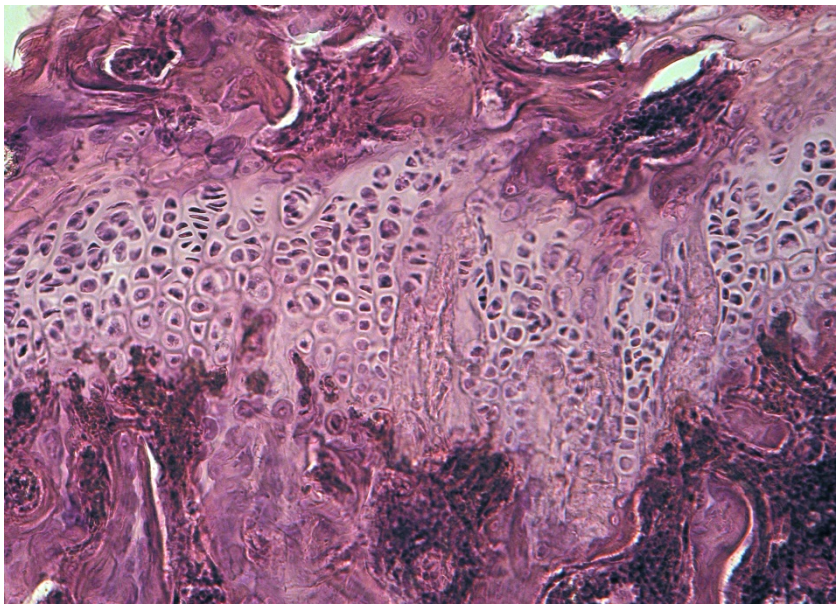

Рис. 5.2.3. Зональна будова проксимального епіфізарного хряща стегнової кістки на ділянці збереженого кісткоутворення. Гістопрепарат проксимального епіметафіза стегнової кістки тварини з IV серії (ГК-індукована остеохондропатія на фоні застосування вітамінів D_3 та Е) Забарвлення гематоксиліном та еозином, збільшення × 80.

Епіфізарний хрящ у зазначеній серії тварин визначався у формі дуги з вигином у проксимальному напрямку. До його метафізарної частини прилягав комплекс первинних кістково-хрящових перекладок, кісткова частина епіфіза – у вигляді кісткових перекладок, оточених по периферії замикальною кістковою пластинкою, у метафізі – кісткові перекладки з повздовжньою спрямованістю. В епіфізарному хрящі переважали клітини гіпертрофічного типу, що свідчило про достатню інтенсивність процесів проліферації клітин.

5.3. Зміни гістоморфометричних показників кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів при моделюванні глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії на фоні превентивного застосування вітаміну D_3 окремо та сумісно вітамінів D_3 та Е

Рівні таких гістоморфометричних показників як кістковий об'єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки, площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки та питоме число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу, що були визначені в серіях тварин з ГК-індукованою остеохондропатією на фоні застосування вітаміну D_3 (III серія) та ГК-індукованою остеохондропатією на фоні застосування вітамінів D_3 та Е (IV серія) та їх порівняння з відповідними рівнями, визначеними у інтактних щурів (I серія) і тварин з ГК-індукованою остеохондропатією (II серія), представлені в таблиці 5.3.1.

Рівень середнього параметра кісткового об'єму вторинної спонгіози метафіза стегнової кістки у тварин IV серії дослідів склав ($\bar{X}\pm s_{\bar{x}}$: середня величина та стандартна помилка середньої) 44,180±1,527 %, у тварин III серії – 40,917±1,636 % ($p>0,05$, за наявної кількості випадків). Середній параметр цього показника у тварин IV серії відрізнявся від параметра II серії (ГІОХП, без застосування вітамінів) з достовірністю помилки $p<0,1$, за наявної кількості випадків.

Середня площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки у тварин IV та III серій була практично однаковою і склала відповідно 2,170±0,192 мм^2 і 2,133±0,154 мм^2 ($p>0,05$). Ці параметри були нижчими за відповідний рівень інтактних тварин (статистично ця різниця була недостовірною ($p>0,05$). У порівнянні з середнім параметром цього показника у тварин II серії (ГІОХП, без застосування вітамінів), параметри тварин III та IV серій виявилися

вищими, проте не достовірно (p>0,05, за наявного числа випадків) (табл. 5.3.1).

Таблиця 5.3.1

Гістоморфометричні показники кісткової тканини у інтактних тварин та тварин II серії, що отримували преднізолон (в комірках зазначено $\overline{X}\pm s_{\overline{x}}$: середня величина та стандартна помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГІОХП (II серія)	ГІОХП з уведенням вітаміну D (III серія)	ГІОХП з уведенням вітамінів D та E (IV серія)
Кістковий об'єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки (%)	36,9±3,4	37,6±1,9	40,9±1,6	44,2±1,5**
Площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки ($мм^2$)	2,37±0,15	1,88±0,16*	2,13±0,15	2,17±0,19
Питоме число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу	188,3±12,8	209,0±15,9	230,4±19,6	226,5±22,2

Примітки:

* – достовірна різниця в порівнянні II та I серіями дослідів (p≤0,05);

** – різниця в порівнянні IV та II серіями дослідів (p≤0,1, за наявного числа випадків).

Найбільшим число перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканинного кортексу виявилось у тварин III групи, у яких їх кількість склала 230,425±19,625 одиниць на кв. мм. У тварин IV серії середній параметр цього показника склав 226,543±22,200 одиниць. Ці параметри достовірно не відрізнялися між собою, а також з відповідними рівнями в I та II серіях експериментальних тварин (p>0,05) (табл. 5.3.1).

Проведений аналіз кореляційних зав'язків між гістоморфометричними показниками, що характеризують стан кісткової тканини у щурів з експериментальною ГК-індукованою остеохондропатією, показав їх неоднорідність і варіабельність як за абсолютним значенням так і за знак ом (табл. 5.3.2).

Таблиця 5.3.2

Значення коефіцієнту кореляції між гістоморфометричними показниками кісткової тканини, визначеними в I – IV серіях експериментальних тварин*

Перший показник	Другий показник	Серія експериментальних тварин			
		I	II	III	IV
Кістковий об'єм вторинної спон-гіози проксималь-ного метафіза стегнової кістки	Площа компакт-ної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки	r=–0,165	r=0,086	r=0,217	r=0,452
Кістковий об'єм вторинної спон-гіози проксималь-ного метафіза стегнової кістки	Питоме число перетинів судин-них каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу	r=0,443	r=–0,370	r=–0,082	r=–0,274
Площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки	Питоме число перетинів судин-них каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу	r=–0,203	r=–0,301	r=0,438	r=0,482

Примітка: r – значення коефіцієнту кореляції Пірсона;

* – всі значення коефіцієнта кореляції невірогідні (p>0,05) при наявному числі пар параметрів.

Так, в серії інтактних тварин найвище значення коефіцієнта кореляції встановлено між показниками «кістковий об'єм вторинної спонгіози метафіза» та «питоме число перетинів судинних каналів»

(залежність позитивна, в діапазоні слабких значень). В серії тварин, яким вводили тільки преднізолон, залежність між цими показниками стає негативною (також в діапазоні слабких значень). В серії тварин, де введення преднізолону проводилось на фоні застосуванні вітаміну D_3, найбільшу силу кореляційного зв'язку продемонстрували такі показники як «площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки» і «питоме число перетинів судинних каналів» (залежність позитивна, в діапазоні слабких значень). У серії щурів, яким вводили преднізолон і вітаміни D_3 та Е, позитивні кореляційні зв'язки в діапазоні слабких значень були відзначені між показниками «кістковий об'єм вторинної спонгіози метафіза» та «площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки», а також «площа компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки» та «питоме число перетинів судинних каналів»

Гістоморфометричні показники суглобового хряща проксимального епіфіза стегнової кістки, визначені в досліджуваних серіях тварин, та їх порівняння представлені в таблиці 5.3.3.

Через 30 діб експерименту в IV серії тварин середня товщина суглобового хряща склала 0,177±0,007 мм, в III серії – 0,172±0,006 мм, в обох серіях ці параметри були меншими за параметр тварин інтактної групи і вищими за показник у тварин II серії, при цьому показник в IV серії відрізнявся достовірно ($p \leq 0,05$).

Параметри питомої кількісті хондроцитів у тварин IV та III серій, що отримували вітаміни, відповідно склали 2592,044±150,851 одиниць на мм^2 та 2603,879±169,890 одиниць на мм^2. Обидва ці параметри були меншими за параметр, визначений в II серії тварин (2982,362±712,065) і наближалися до середнього параметру інтактних тварин (2383,152±398,243), $p > 0,05$, за наявного числа випадків).

Кількість великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу виявилась найбільшою в IV серії тварин і склала 17,614±0,526 одиниць.

Цей параметр суттєво відрізнявся від відповідного в III серії дослідів ($p \leq 0,002$), де він склав 8,071±0,96 одиниць і був більшим за параметри I та II серій дослідів. Середній параметр IV серії тварин також достовірно був вищим за відповідний параметр, визначений у інтактних тварин ($p \leq 0,001$) та у тварин II серії ($p \leq 0,002$).

Таблиця 5.3.3

Гістоморфометричні показники суглобового хряща головки стегнової кістки в I–IV серіях експериментальних тварин

($\bar{X} \pm s_x$: середня величина та стандартна помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГІОХП (II серія)	ГІОХП з уведенням вітаміну D_3 (III серія)	ГІОХП з уведенням вітамінів D_3 та E (IV серія)
Товщина суглобового хряща (мм)	0,208±0,036	0,160±0,006***	0,172±0,006	0,177±0,007
Питома кількість хондроцитів (на 1 мм^2)	2383,2±398,2	2982,4±712,1	2603,9±169,9	2592,0±150,9
Кількість великих ділянок матриксу	12,1±0,7	11,857±1,326 **	8,071±0,960 *	17,614±0,526 *

Примітки:

* – достовірна різниця в порівнянні I – III ($p \leq 0,01$) та I – IV ($p \leq 0,001$) серій дослідів;

** – достовірна різниця в порівнянні II – III ($p \leq 0,05$) та II – IV ($p \leq 0,002$) серій дослідів;

*** – достовірна різниця в порівнянні II – IV ($p \leq 0,05$) серій дослідів.

Гістоморфометричні показники епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки, визначені в досліджуваних серіях тварин та результати їх порівняння представлені в таблиці 5.3.4.

Середня товщина епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки у II серії експериментів, де моделювали ГІОХП, була

зниженою, порівняно з групою інтактних тварин (I серія), у тварин III та IV серій середні параметри цього показника ще більш знижувались і складали відповідно 0,150±0,009 мм та 0,152±0,008 мм. Різниці між середніми параметрами у всіх серіях порівняння виявилися недостовірними.

Таблиця 5.3.4

Гістоморфометричні показники епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки в I–IV серіях експериментальних тварин (~~X±s$_x$~~: середня величина та стандартна помилка середньої)

Досліджуваний показник	Інтактні тварини (I серія)	ГІОХП (II серія)	ГІОХП з уведенням вітаміну D_3 (III серія)	ГІОХП з уведенням вітамінів D_3 та E (IV серія)
Товщина епіфізарного хряща (мм)	0,170±0,0128	0,167±0,0104	0,150±0,0093	0,152±0,0075
Питома кількість хондроцитів (на 1 мм^2)	4106,6±163,2	4381,9±380,3	4272,3±244,7**	3744,4±269,1
Кількість великих ділянок матриксу	1,600±0,400	2,333±0,558*	2,600±0,510**	1,667±0,333

Примітки:

* – достовірна різниця в порівнянні II – IV ($p \leq 0,05$) серій дослідів;

** – достовірна різниця в порівнянні III – IV ($p \leq 0,05$) серій дослідів.

Середній параметр питомої кількості хондроцитів на одиницю площі зрізу через 30 діб експерименту виявився найнижчим у IV серії тварин – 3744,416±269,129 одиниць на мм^2. У III серії тварин параметр склав 4272,245±244,660 одиниць на мм^2 і був дещо вищим за параметр інтактних тварин (4106,582±163,239), достовірно вищим за параметр IV серії ($p \leq 0,05$) і нижчим за параметр щурів II серії (4381,921±380,279).

Параметр показника кількості великих ділянок інтертериторіального хрящового матриксу у тварин IV серії максимально був наближеним до

відповідного показника тварин інтактної групи і склав 1,667±0,333 ділянок. Даний показник в III серії тварин склав 2,600±0,510 ділянки і був вищим за показник, визначений у інтактних тварин (1,600±0,400) та тварин II серії дослідів (2,333±0,558) і достовірно відрізнявся від відповідного показника в IV серії дослідів.

Кореляційні зв'язки між різними гістоморфометричними показниками структурно-функціонального стану суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіа стегнових кісток, що були визначені в досліджуваних серіях експериментальних тварин, представлені в таблиці 5.3.5.

Виявлені кореляційні залежності між гістоморфометричними показниками в суглобовому хрящі були наступними. В серії інтактних тварин сильні негативні залежності виявлені між показниками «товщина суглобового хряща» та «питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі», а також між показниками «товщина суглобового хряща» і «кількість великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі». В II серії тварин з моделлю ГК-індукованої остеохондропатії сильна негативна залежність відзначена між показниками «товщина суглобового хряща» та «питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі», а також негативна залежність в діапазоні середніх, близьких до діапазону сильних значень – між показниками «товщина суглобового хряща» і «кількість великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі». В III та IV серіях тварин, що отримували вітаміни D та E, значущих кореляційних зв'язків між показниками структурно-функціонального стану суглобового хряща стегнової кістки не виявлено, крім негативної залежності середньої сили між показниками «питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі» і «кількість великих ділянок матриксу».

Таблиця 5.3.5

Кореляційні зв'язки між гістоморфометричними показниками структурно-функціонального стану суглобового та епіфізарного хрящів проксимального епіметафіза стегнової кістки*

Перший показник	Другий показник	Серії експериментальних тварин			
		I	II	III	IV
Кореляції між показниками суглобового хряща головки стегнової кістки					
Товщина суглобового хряща	Питома кількість хондроцитів на одиницю площі зрізу	**r=–0,825**	**r=–0,799**	r=–0,231	r=0,211
Товщина суглобового хряща	Кількість великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі	**r=–0,889**	r=–0,691	r=0,225	r=–0,273
Питома кількість хондроцитів на одиницю площі зрізу	Кількість великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі	r=0,525	r=0,115	r=–0,211	r=–0,561
Кореляції між показниками епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки					
Товщина епіфізарного хряща	Питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі	**r=0,932**	r=–0,131	r=0,556	r=0,040
Товщина епіфізарного хряща	Кількість великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі	r=0,471	r=0,270	r=–0,049	r=–0,593
Питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі	Кількість великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі	r=0,439	r=0,500	r=–0,618	**r=–0,702**
Кореляції між показниками суглобового та епіфізарного хрящів					
Товщина суглобового хряща	Товщина епіфізарного хряща	**r=0,917**	r=–0,632	r=–0,494	r=0,361
Питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі	Питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі	**r=–0,739**	r=–0,363	r=0,131	r=0,576
Кількість великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі	Кількість великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі	r=–0,155	r=0,591	r=0,545	r=0,457

Примітки:

r – значення коефіцієнта кореляції Пірсона;

* – всі значення коефіцієнта кореляції – невірогідні при наявному числі пар параметрів;

значення коефіцієнта кореляції, що відповідають сильній залежності, виділено жирним шрифтом.

Щодо кореляційних зав’язків між гістоморфометричними показниками, визначеними в епіфізарному хрящі у тварин I – IV серій, то сильна позитивна залежність була відзначена між показниками «товщина епіфізарного хряща» і «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі» в серії інтактних тварин.

Позитивні залежності слабкої тісноти в цій серії тварин мали місце між парами показників «товщина епіфізарного хряща» – «кількість великих ділянок матриксу», а також між показниками «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі» – «кількість великих ділянок матриксу». У II серії тварин була відзначена лише одна позитивна залежність в діапазоні середніх значень між показниками «питома кількість хондроцитів в епфізарному хрящі» та «кількість великих ділянок матриксу». У III серії тварин, що отримували вітамін D_3, відзначена позитивна кореляція середньої сили у парі показників «товщина епіфізарного хряща» – «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі», а також негативна кореляція середньої сили у парі показників «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі» та «кількість великих ділянок матриксу». В останній, IV серії тварин були відзначені негативний зв'язок середньої сили між показниками «товщина епіфізарного хряща» та «кількість великих ділянок матриксу», а також сильна негативна кореляція у парі показників «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі» – «кількість великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі».

Кореляційна залежність між подібними гістоморфометричними показниками, визначеними для суглобового та епіфізарного хрящів стегнової кістки у інтактних тварин I серії, мала позитивне сильне значення у парі «товщина суглобового хряща» - «товщина епіфізарного хряща» та сильне негативне значення у парі «питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі» – «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі». В II серії тварин (ГІОХП) залежності в діапазоні середніх значень

були визначені для наступних пар показників: негативна між «товщиною суглобового хряща» – «товщина епіфізарного хряща»; позитивна між «кількістю великих ділянок матриксу в суглобовому хрящі» – «кількістю великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі». У тварин III серії (ГІОХП на фоні застосування вітаміну D_3) мала місце позитивна залежність середньої тісноти – між показниками «кількість безклітинних ділянок в суглобовому хрящі» і «кількість безклітинних ділянок в епіфізарному хрящі». У тварин IV серії (ГІОХП на фоні застосування вітамінів D_3 та Е), позитивну кореляцію середньої сили встановлено у парі показників: «питома кількість хондроцитів в суглобовому хрящі» – «питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі».

За результатами, представленими в даному розділі можна зробити наступні висновки:

- Превентивне введення вітаміну D_3 або одночасно вітамінів D_3 та Е, справляють профілактичний ефект щодо розвитку морфологічних змін структурно-функціонального стану компактної кісткової тканини, суглобового хряща головки стегнової кістки та епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки при моделюванні ГІОХП.
- Превентивне введення вітамінів D_3 та Е під час моделювання ГІОХП призводило до покращення, порівняно з параметрами інтактних тварин та/або тварин з ГІОХП середніх значень таких гістоморфометричних показників як «кістковий об’єм трабекул спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки» та «площа компактної кістки кортексу діафіза».
- Превентивне застосування вітамінів D_3 та Е в умовах моделювання ГІОХП попереджало розвиток суттєвих змін або оптимізувало параметри більшості остеометричних і гістоморфометричних показників хрящових анатомічних утворень проксимального кінця стегнової кістки, при цьому найбільш вираженим цей ефект був при одночасному застосуванні вітамінів D_3 та Е, серед показників можна

відзначити такі як «товщина суглобового хряща», «питома кількість хондроцитів суглобового хряща на одиницю площі», «питома кількість хондроцитів епіфізарного хряща на одиницю площі», «кількість великих ділянок матриксу в епіфізарному хрящі».

- Встановлені кореляційні зв’язки між гістоморфометричними показниками стану компактної кісткової тканини стегна, суглобового хряща головки стегнової кістки, проксимального епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки, демонструють характерні залежності в парах окремих показників у тварин різних груп порівняння: інтактних, з модельованою ГІОХП та з ГІОХП, в умовах застосування вітамінів D_3 та Е.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Темпи розповсюдження остеопорозу настільки швидкі, що Всесвітня Організація Охорони Здоров'я признала це захворювання глобальною проблемою сучасності. З урахуванням медичного і соціально-економічного значення проблема остеопорозу поставлена ВООЗ на 4-е місце після захворювань серцево-судинної системи, онкопатології і цукрового діабету. Так звана «німа епідемія XXI сторіччя» йде гучними кроками, залишаючи після себе шлейф проблем, що визначають тривалість і якість життя пацієнтів [11, 206].

Одним із самих значущих факторів ризику розвитку остеопорозу є застосування системних ГК. ГІО являється найбільш тяжкою формою вторинного ОП і характеризується швидкою втратою кісткової маси і підвищенням вірогідності переломів вже в ранні терміни після початку ГК-терапії [14, 207]. До того ж, ГК прямо або опосередковано впливають на хрящі кісток, що було підтверджено при ряді експериментальних і клінічних дослідженнях [14, 208, 209].

У хворих, що приймають ГК, лікування антиостеопоротичними препаратами повинно проводитись з метою як профілактики розвитку порушення структури кісткової та хрящової тканини, так і лікування остеопоротичних змін, що вже розвинулись. Це лікування необхідно розпочинати одночасно з призначенням ГК-терапії, якщо вона має бути тривалою – більше 3-х місяців [13].

Сучасне лікування та попередження ГІО у хворих, що підлягають довготривалій ГК-терапії, включає низку корегувальних та медикаментозних впливів із застосуванням різноманітних лікувальних засобів [210, 211, 212]. В останні роки, серед інших лікарських засобів профілактики та терапії ГІО, важливе місце займають препарати вітамінів D та E [6, 20].

Вітамін D на сьогодні при остеопорозі є препаратом базової терапії. Його лікувальний ефект є помірним, але при цьому він має виражений позитивний вплив на параметри мінеральної щільності кістки та ризик виникнення переломів. Даний засіб, зазвичай, використовується у поєднанні з бісфонатами, він рекомендується для лікування ГІО у хворих з шлунково-кишковими розладами та гепатобіліарними захворюваннями, а також розглядаються як засіб першої лінії при лікуванні ГІО у хворих молодого віку [21, 213].

Вітамін Е позиціонується як універсальний протектор мембран від окисного пошкодження. Він перешкоджає впливу кисню на ненасичені ліпіди мембран, запобігаючи їх деструкції. Його молекула може безпосередньо взаємодіяти з вільними радикалами кисню, ненасиченими жирними кислотами та перекисами. Його стабілізуюча дія щодо мембран зумовлена запобіганням окислення SH-груп мембранних білків [195].

Незважаючи на значну кількість досліджень, присвячених висвітленню особливостей морфогенезу та патогенезу ГІО, робіт, проведених на експериментальному доказовому матеріалі із залученням комплексу біохімічних, остеометричних, гістологічних та гістоморфометричних показників для вивчення запобіжного впливу вітамінів D та Е на структурно-функціональні властивості компактної та губчастої кістки, суглобового та епіфізарного хрящів раніше не проводилося.

Представлена робота у відповідності до мети та завдань була експериментальним дослідженням, до якого були залучені 68 щурів-самців лінійної породи Вістар віком 2 місяці з масою тіла 100±5,0 г. Дослідження на тваринах та їх утримання проводились з урахуванням загальносвітових та вітчизняних норм, що регламентовані відповідними положеннями та законами.

Для вивчення і оцінки впливу вітаміну D_3 окремо, а також при поєднаному його застосуванні з вітаміном Е, на зміни структурно-

функціонального стану кісткової та хрящової тканин при моделюванні ГК-індукованої остеохондропатії експериментальні тварини були розділені на чотири серії, по 17 щурів в кожній, в залежності від застосованого для них засобу. Інтактні тварини (I серія) не отримували будь яких додаткових засобів. В II серії тварин моделювали глюкокортикоїд-індуковану остехондропатію шляхом щоденного, протягом 30 діб, введення розчину преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла. Тваринам III та IV серій на фоні моделювання остеохондропатії аналогічним способом, що і для тварин II серії, проводили додаткове щоденне (протягом 30 діб) введення розчинів вітамінів. Тварини III серії отримували тільки вітамін D_3 (100 МО), а тварини IVсерії – вітаміни D_3 (100 МО) та Е (0,726 МО – 0,6 мг) одночасно.

Першими результатами, що вказували на негативний вплив преднізолону на тварин II серії, стали зменшення їх рухової активності, зниження інтенсивності поїдання корму, втрата блиску хутра в порівнянні з інтактними тваринами. Першими об’єктивними показниками, що відображали такий вплив, стали достовірно менші маса тіла, середня маса великогомілкової кістки, довжина та товщина стегнової кістки після закінчення 30-денного експерименту.

Однією із важливих ознак розвитку остеопорозу є зменшення МЩКТ, рівень якої в нашому дослідженні був оцінений за допомоги визначення зольності кісткової тканини та вмісту в ній кальцію та фосфору. У тварин II серії, що отримували преднізолон, середні рівні всіх цих показників виявились достовірно нижчими за відповідні показники тварин I серії. Додатково у тварин II серії в плазмі крові були визначені суттєво нижчі рівні кальцію, фосфору, достовірно вищі рівні лужної фосфатази та її кишкового та кісткового ензимів, що вказувало на значні зміни у них з боку обміну мінеральних речовин. Негативний вплив преднізолону у тварин II серії також проявився суттєвим зниженням в крові вітаміну D, який в нашому дослідженні визначався за рівнем $25(OH)D_3$. Всі вище вказані зміни параметрів, що відображають стан

мінерального та D-вітамінного обміну, у дослідних тварин ІІ серії супроводжувались змінами гістологічної структури компактної кісткової тканини, суглобового хряща та епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки.

Гістологічні зміни в кістковій тканині ІІ серії тварин в порівнянні з інтактними тваринами підтверджені низкою визначених гістоморфометричних показників. Хоча кістковий об'єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки у тварин ІІ серії був дещо збільшеним ($p>0,05$), було визначене суттєве зменшення з боку такого показника як площа компактної кісткової тканин середини діафіза стегнової кістки (достовірно менша за відповідний показник інтактних тварин). Щодо питомого числа перетинів судинних каналів на одиницю площі тестової ділянки тканини кортексу, то цей показник був більшим за відповідний показник інтактних тварин, але без достовірної різниці. Отже, зміни параметрів гістоморфометричних показників дозволили виявити зменшення маси кісткової тканини діафіза тварин ІІ серії, а збільшення у цих тварини показника кількості судинних каналів в діафізі кістки вказувало на посилення процесів перебудови кісткової тканини з переважанням фази остеорезорбції.

При оцінці визначених кореляційних зав'язків між окремими гістоморфометричними показниками кісткової тканини щурів, були виявлені певні закономірності, серед яких можна виділити наступні. У інтактних щурів збільшення кісткового об'єму вторинної спонгіози метафізу стегнової кістки пов'язане з питомим числом перетинів судинних каналів. У тварин ІІ серії залежність між цими показниками виявилась протилежною – зменшення кісткового об'єму вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки, хоча і в діапазоні слабких значень, корелює зі збільшенням числа перетинів судинних каналів. Для ІІ серії тварин також можна відзначити ще одну виявлену залежність: зменшення площі компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової

кістки супроводжується збільшенням питомого числа судинних каналів на одиницю площі перетину кісткової тканини кортексу. Всі зазначені вище зміни МЩКТ, гістоморфометричних показників об’єктивно підтвердили розвиток у тварин, що 30 діб отримували розчин преднізолону, змін структури кісткової тканини, характерних для остеопорозу.

Гістоморфометричні показники, що були отримані при дослідженні суглобового та епіфізарного хрящів, продемонстрували порушення структури і будови цих структурних елементів у тварин, що отримували преднізолон, в порівнянні з серією інтактних щурів. Так, у тварин ІІ серії було відзначене суттєве зменшення товщини суглобового хряща і питомої кількості хондроцитів по відношенню до відповідних показників інтактної серії тварин ($p \leq 0,05$), при цьому різниці між кількістю ділянок інтертериторіального хрящового матриксу відзначено не було. Щодо епіфізарного хряща, то його товщина була співмірною в обох зазначених серіях тварин, але при цьому у тварин ІІ серії відзначалось суттєве збільшення питомої кількості хондроцитів і кількості ділянок інтертериторіального хрящового матриксу ($p \leq 0,05$).

Вивчені кореляційні залежності між гістоморфометричними показниками суглобового і епіфізарного хрящів у І та ІІ серіях дослідів продемонстрували наступні закономірності. Зменшення товщини суглобового хряща супроводжувалось збільшенням в ньому питомої кількості хондроцитів та кількості безклітинних ділянок хрящового матриксу. Якщо у інтактних тварин число безклітинних ділянок суглобового хряща збільшувалась, то воно супроводжувалось і збільшенням питомої кількості хондроцитів ($r=0,525$), а у тварин ІІ серії такої залежності не відзначено. В епіфізарному хрящі тварин ІІ серії дослідів питома кількість хондроцитів не залежала від товщини хряща, в той час у інтактних тварин ця залежність була вираженою ($r=0,93$). Питома кількість хондроцитів в епіфізарному хрящі у тварин ІІ серії мала середньої сили позитивний зв'язок з кількістю безклітинних ділянок у

хрящі (r=0,500), при цьому товщина епіфізарного хряща не впливала на кількість безклітинних ділянок. Якщо товщина суглобового хряща у інтактних тварин сильно позитивно корелювала з товщиною епіфізарного хряща, то у тварин ІІ серії цей зв'язок навпаки мав негативне значення. Чим більшою була кількість безклітинних ділянок в суглобовому хрящі тварин ІІ серії, тім більшою вона була і в епіфізарному хрящі (r=0,59).

Подібні зміни гістологічної структури кісткової та хрящової тканин були відзначені в низці досліджень, де також моделювали ГК-індукований остеопороз та ГК-індуковану дистрофію хрящової тканини [9, 51, 108, 111, 112, 214].

Отже, порівняння показників структурно-функціонального стану кісткової і хрящової тканин тварин ІІ серії з відповідними показниками інтактних тварин дозволило зробити висновок, що введення преднізолону протягом 30 діб призводило до розвитку низки патологічних змін, сукупність яких можна трактувати як модель глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії. Ця обставина створила можливість об’єктивно оцінити в експерименті превентивний вплив застосування вітамінів D_3 та Е на розвиток структурно-функціональних змін в кістковій і хрящовій тканинах на фоні прийому ГК.

Оцінка загального стану тварин ІІІ та ІV серій вже в певній мірі вказувала на позитивну дію вітамінів D та Е при тривалому прийомі ГК. Загалом він був практично не змінений і тварини зазначених серій дослідів за своєю рухливістю, активністю поїдання кормів, стану хутра не відрізнялись від інтактної групи щурів.

Прийом вітамінів практично не вплинув на такі параметри як довжина стегнової кістки і товщина стегнової кістки. Як і значення цих показників у ІІ серії, в ІІІ та ІV серіях досліджень вони достовірно були нижчими за показники інтактних тварин. Між собою в цих серіях дослідів ці параметри також не відрізнялись, хоча і були дещо вищими за відповідні показники тварин, що отримували тільки преднізолон. Подібні ж

співвідношення відзначені і для визначеної маси тіла тварин III та IV. Хоча середній показник маси тіла тварин IV серії і був більшім за відповідні показники тварни в II та III серії, достовірної різниці при цьому визначено не було. Наші дані щодо зазначених параметрів є подібними до тих, що були отримані при дослідженні Л. І. Апуховської та спів. (2008) [Л. І. Апховська та ін, 2008 (214)], в якому вивчалась ефективність застосування вітаміну D_3 при остеопорозі, який моделювали шляхом обмеження рухливості експериментальних тварин протягом 2,5 місяців. Суттєві відмінності були визначені при вивченні такого показника як маса великогомілкової кістки. Тут позитивний вплив поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е проявив себе в повній мірі. Показник IV серії тварин виявився більшим за відповідні показники, визначені в усіх інших серіях дослідів ($p \leq 0,5$). Даний аспект можна зарахувати як більш виражену позитивну дію при сумісному застосуванні вітамінів D_3 та Е у порівнянні з дією лише одного вітаміну D_3.

Виражений позитивний превентивний ефект поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е, у порівнянні з використанням тільки вітаміну D_3, був виявлений при вивченні показників, що характеризують мінеральну щільність кісткової тканини. Так, зольність кісткової тканини, вміст кальцію та фосфору в золі великогомілкової кістки у тварин III серії були вищими за відповідні показники, визначені у тварин II серії, в той же час, ці параметри у тварин IV серії виявились найвищими і максимально наближеними до відповідних рівнів, визначених у інтактних тварин.

Про більш виражену превентивну дію застосування вітамінів в IV серії тварин засвідчила і низка біохімічних параметрів, що визначались в плазмі крові. Загальні рівні кількості кальцію у тварин III та IV серій виявились більшими за відповідний рівень у тварин з моделлю ГК-індукованої остеохондропатії ($p \leq 0,05$), при цьому у тварин IV серії цей показник мав дещо вищий середній параметр, ніж у тварин, що отримували тільки вітамін D_3. Суттєвих різниць при вивченні кількості

білковопов'язаного кальцію між досліджуваними групами не виявлено. Щодо ультафільтрувального кальцію, то його рівень в IV серії був ідентичний параметру інтактних тварин і суттєво перевищував параметр тварин III серії ($p \leq 0,05$), який, в свою чергу, суттєво різнився від показників тварин II серії дослідів ($p \leq 0,05$). Подібна закономірність відзначена і для показника кількості фосфору в плазмі крові, який у IV серії дослідів перевищив навіть параметр інтактних тварин.

Найнижчі рівні лужної фосфатази та її ензимів були визначені у тварин з ГК-індукованою остеохондропатією. Параметр цього біохімічного показника у тварин III серії мав суттєво нижчі значення по відношенню до параметра у тварин II серії ($p \leq 0,05$), при цьому рівні лужної фосфатази та її ензимів у IV серії дослідів були ще достовірно нижчими ($p \leq 0,05$) і максимально наближались до відповідних параметрів, визначених у інтактних тварин. Отже, за цим параметром, дистрофічні зміни кісткової тканини були значно меншими при поєднаному застосуванні вітамінів D_3 та Е, хоча превентивне застосування тільки вітаміну D_3 мало також, хоча і меншою мірою, позитивний ефект.

Використання ГК призводить до розвитку вираженого D-гіповітамінозу, який проявився суттєвим зниженням вмісту $25(OH)D_3$ в плазмі крові у тварин з ГК-індукованою остеохондропатією у порівнянні з інтактними тваринами. Превентивне застосування вітаміну D_3 в III серії тварин попереджало таке суттєве зниження вмісту цього вітаміну, хоча і не утримувало його на рівні, що відповідав рівню інтактних тварин. Превентивне поєднане використання вітамінів D_3 та Е при розвитку ГК-індукованої остеохондропатії призводило не тільки до збереження вмісту $25(OH)D_3$ у плазмі крові, але і до суттєвого перевищення цього параметра по відношенню до рівня, визначеного у серії інтактних тварин ($p \leq 0,05$).

Всі перераховані зміни вище вказаних показників отримали своє відображення при вивчені гістологічної будови діафіза стегнової кістки,

суглобового та проксимального епіфізарного хрящів у тварин, що отримували різні варіанти превентивного використання вітамінів.

У порівнянні з II серією тварин, морфологічна будова компактної кісткової тканини діафіза стегнової кістки у тварин, що отримували тільки вітамін D_3, була більш наближеною до структури, що була визначена у інтактних тварин. Серед виявлених ознак можна відзначити такі як візуальне зменшення кількості судинних каналів у шарі зовнішніх генеральних пластинок кортексу, хоча більшість з них була неправильної форми, а також зменшення величини і кількості ділянок з порушеним формуванням або відсутністю шарів внутрішніх та зовнішніх генеральних пластинок. Але все ж таки, максимально наближеною будова компактної кісткової тканини по відношенню до нормальної структури виявилась у тварин, що отримували обидва вітаміни одночасно. У цих тварин судинні канали були правильної форми, їх кількість візуально не була збільшеною, не визначались також ділянки з порушенням формування шарів внутрішніх та зовнішніх генеральних пластинок.

Серед гістологічних ознак, виявлених в суглобовому хрящі тварин III серії, в порівнянні з відповідними у тварин II серії, можна відзначити візуальне зменшення кількості безклітинних ділянок хрящового матриксу у проміжній та глибокій зонах. У тварин IV серії будова суглобового хряща виявилась практично аналогічною до нормальної.

В епіфізарному хрящі тварин III серії відзначалось візуальне зменшення товщини по відношенню до відповідної, що мала місце у інтактних тварин. На відміну від тварин II серії, у яких практично була відсутня зона первинної спонгіози, у тварин III серії ця зона була збереженою. Щодо гістоморфометричної будови проксимального епіфізарного хряща та метафіза стегнової кістки у тварин IV серії, то суттєвих візуальних ознак у порівнянні з нормальною будовою цієї анатомічної ділянки у інтактних тварин визначено не було.

Визначені середні параметри гістоморфометричних показників у III та IV серіях експериментів дали можливість об’єктивно оцінити зміни структурно-функціонального стану кісткової тканин у цих досліджуваних тварин і порівняти їх як між собою, так і з відповідними параметрами, що були визначені в I та II серіях дослідів. Так, рівень показника об’єму вторинної спонгіози метафіза стегнової кістки у тварин IV серії був найвищим і достовірно відрізнявся як від показника III серії, так і від відповідних показників, визначених в I та II серіях дослідів. Визначені площі компактної кісткової тканини в III та IV серіях були рівнозначними і дещо нижчими за показник інтактних щурів, при цьому вони були суттєво більшими за показник II серії тварин. Питоме число судинних каналів збільшувалось як в II та і в III та IV серіях тварин (найбільше в III серії) але достовірної різниці між всіма параметрами і з відповідним параметром інтактних тварин не виявлено.

Серед вивчених кореляцій між гістоморфометричними показниками компактної кісткової тканини у тварин III та IV серій можна відзначити наступні. Кістковий об’єм вторинної спонгіози проксимального метафіза стегнової кістки у тварин IV серії виявляє позитивний зв’язок із площею компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки (r=0,45). В інших серіях такого зв’язку не відзначено. Також цікавим виявилось те, що питоме число перетинів судинних каналів не мало вираженої кореляції з визначеним кістковим об’ємом вторинної спонгіози метафіза, хоча для I та II серії тварин такий зв'язок (в діапазоні слабких значень) мав місце. Збільшення площі компактної кісткової тканини в III та IV серіях супроводжувалось збільшенням числа перетинів судиних каналів (відповідно r=0,44 та r=0,48). Отже, висвітлені вище гістоморфометричні параметри демонструють позитивні ефекти превентивного застосування вітамінів при розвитку ГК-індукованої остеохондропатії, при цьому більш значущим цей ефект можна очікувати при поєднаному застосуванні вітамінів D_3 та Е.

Уведення в організм тварин вітамінів в III та IV серіях дослідів призводило до тенденції збереження товщини суглобового хряща, а також до незначного підвищення питомої кількості хондроцитів по відношенню до відповідних показників в серії інтактних тварин. У тварин з моделлю ГК-індукованої хондропатії відзначене суттєве збільшення питомої кількості хондроцитів по відношенню до параметрів в інших серіях дослідів. Щодо кількості великих ділянок хрящового матриксу, то найбільше їх виявилось у тварин IV серії, найменше – III серії. У тварин II серії цей показник відповідав рівню показників інтактних тварин. Отже, товщина суглобового хряща зменшується під впливом дії ГК на хондроцити поверхневої зони, а під поєднаним впливом вітамінів D_3 та Е при цьому виявляє тенденцію до наближення до нормальних значень.

Як і преднізолон, так і застосування вітамінів не призводило до достовірних змін товщини епіфізарного хряща. Під впливом ГК відзначена тенденція до збільшення в цьому хрящі питомої кількості хондроцитів у тварин II серії дослідів, така ж тенденція була відзначена і для тварин III серії. Спільна дія вітамінів D_3 та Е призводили до зменшення цього параметра та наближення його до параметра інтактних тварин. Кількість великих ділянок хрящового матриксу в IV серії тварин дорівнювала значенню цього показника у інтактних тварин, при цьому у тварин III серії дослідів їх кількість виявилась найбільшою і була наближеною до параметра тварин з ГК-індукованою остеохондропатією.

Серед виявлених кореляцій між морфометричними показниками суглобового та епіфізарного хрящів можна відзначити наступні, що на нашу думку, характеризують структурно-функціональний стан цих анатомічних утворень під впливом тих чи інших чинників. Так, якщо зменшення товщини суглобового хряща призводило до збільшення питомої кількості хондроцитів та збільшувало кількість великих безклітинних ділянок матриксу в I та II серіях дослідів, то в III та IV серіях такої сильної залежності не відзначено. Також збільшення питомої

кількості хондроцитів у суглобовому хрящі у тварин I та II серій супроводжувалось збільшенням кількості безклітинних ділянок в суглобовому хрящі, в той же час такої залежності при використанні вітамінів не відзначено. Зв'язок показника товщини епіфізарного хряща та кількості великих ділянок матриксу у тварин, що отримували вітаміни D_3 та Е, виявив негативне значення, такого зв’язку у тварин, що отримували тільки вітамін D_3 виявлено не було. Збільшення питомої кількості хондроцитів в епіфізарному хрящі у тварин III та IV серій дослідів супроводжувався зменшенням кількості безклітинних ділянок матриксу (відповідно r=-0,63 та r=-0,70).

Отже, проведені нами дослідження показали, що превентивне застосування тільки вітаміну D_3, або спільно вітамінів D_3 та Е, загалом справляють позитивний ефект щодо збереження структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин у експериментальних тварин при моделюванні у них ГК-індукованої остеохондропатії. В той же час, цей ефект виявився більш вираженим саме при поєднаній превентивній дії вітамінів D_3 та Е. Отримані результати даного дослідження є підставою для подальших клінічних досліджень, спрямованих на вивчення ефекту поєднаного застосування вітамінів D_3 та Е у пацієнтів, що отримують тривалу глюкокортикоїдну терапію.

ВИСНОВКИ

1. Щоденне введення експериментальним тваринам преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла призводить до розвитку значних змін структурно-функціонального стану як кісткової, так і хрящової тканини. У порівнянні з інтактними тваринами відзначене достовірне зменшення ($p \leq 0,05$) маси тіла (160,0±3,6 г проти 190,0±4,0 г), маси кісткової тканини (229,7±1,9 мг проти 254,6±4,0 мг), довжини (28,81±0,25 мм проти 31,01±0,05 мм) і товщини стегнової кістки (3,07±0,04 мм проти 3,49±0,06 мм), на 6,2 % менша зольність кісткової тканини, на 13 % вміст кальцію і на 2,5 % вміст фосфору у великогомілковій кістці. Також відзначене суттєве зменшення кальцію (1,91±0,02 ммоль/л проти 2,29±0,03 ммоль/л), фосфору (1,82±0,02 ммоль/л проти 2,20±0,03 ммоль/л), 25(OH)D_3 в плазмі крові (7,9±0,2 нг/мл проти 38,1±1,2 нг/мл), підвищення рівня лужної фосфатази та її ензимів в крові (347,0±0,5 Од/л проти 235,0±0,5 Од/л. У таких тварин відзначене зменшення площі компактної кісткової тканини середини діафіза стегнової кістки (1,88±0,16 мм^2 проти 2,37±0,15 мм^2), товщини суглобового хряща (0,160±0,025 мм проти 0,208±0,036 мм). Виявлені структурно-функціональні зміни кісткової та хрящової тканин можна трактувати як розвинену глюкокортикоїд-індуковану остеохондропатію.

2. Превентивна дія одночасного застосування вітамінів D_3 та Е на зміни показників мінерального та D-вітамінного обміну у експериментальних тварин з глюкокортикоїд-індукованою остеохондропатією в порівнянні з дією одного вітаміну D_3 є більш ефективною, що проявилось суттєво більшими ($p \leq 0,05$) масою великогомілкової кістки (272,8±2,4 мг проти 246±1,2 мг), зольністю кісткової тканини (59,8±0,3 % проти 58,3±0,7 %), вмістом кальцію (32,1±0,4 % проти 30,6±0,3 %) і фосфору (18,5±0,2 % проти 17,2±.0,1 %) у золі великогомілкової кістки, суттєво нижчими рівнем лужної фосфатази в плазмі крові (260,0±1,0 Од/л проти 273,0±0,2 Од/л), а також значним збільшенням кількості 25(OH)D_3 (50,0±1,0 нг/мл проти 24,2±2,0 нг/л).

3. Поєднане використання вітамінів D_3 та Е забезпечувало максимальне збереження гістоморфологічної будови стегнової кістки у тварин, у яких моделювали глюкокортикоїд-індуковану остеохондропатію, що проявилось більшим рівнем показника кісткового об'єму вторинної спонгіози метафіза стегнової кістки у порівнянні з тваринами, що отримували тільки вітамін D_3 (44,2±1,5 % проти 40,9±1,7 %) та з другою серією тварин, які отримували преднізолон (44,2±1,5 % проти 37,6±1,9 %).

4. Одночасне превентивне застосування вітамінів D_3 та Е призводить до збереження гістоморфологічної будови хряща по відношенню до тварин другої серії, що проявилось більшою товщиною суглобового хряща (0,177±0,007 мм проти 0,160±0,06 мм). Суттєвої різниці між впливами одночасного застосування вітамінів D_3 та Е і тільки вітаміну D_3 на такі гістоморфометричними параметрами як товщина суглобового хряща, питома кількість хондроцитів та кількість великих ділянок інтертериторільного хрящового матрикса не виявлено ($p>0,05$).

5. Застосування вітамінів D_3 та Е суттєво покращує структуру епіфізарного хряща проксимального відділу стегнової кістки, а саме: зменшення кількості безклітинних ділянок матриксу (1,667±0,333 проти 2,333±0,558). Більш виражений профілактичний вплив спільного використання вітамінів D_3 та Е на зміни гістоморфологічних та гістоморфометричних показників епіфізарного хряща проксимального епіметафіза стегнової кістки на фоні моделювання глюкокортикоїд-індукованої остеохондропатії в порівнянні з дією лише вітаміну D_3 проявився збереженням гістоморфологічної структури цього хряща в порівнянні зі структурою епіфізарного хряща у інтактних тварин, а також суттєво нижчими параметрами питомої кількості хондроцитів (3744,4±269,1 на 1 мм^2 проти 4272,3±244,7 на 1 мм^2) та кількості великих безклітинних ділянок хрящового матрикса (1,667±0,333 проти 2,600±0,510).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Щоденне, протягом 30 днів, пероральне введення розчину преднізолону в дозі 0,5 мг/100 г маси тіла експериментальним тваринам (щурі) призводить до суттєвих змін структурно-функціонального стану компактної кісткової тканини, що загалом відповідають такому патологічному процесу як глюкокортикоїд-індукований остеопороз. З огляду на це, дана експериментальна модель рекомендуємо для використання при проведенні наукових досліджень з вивчення патогенетичних аспектів глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу, а також для вивчення ефективності тих чи інших засобів для його профілактики та лікування.

2. Виходячи з того, що тривале введення глюкокортикоїдів призводить до змін не тільки в компактній кістковій тканині, а і в суглобовому та епіфізарному хрящах, патологічний процес, що розвивається при цьому, можна трактувати як глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія. При проведенні експериментальних досліджень щодо вивчення превентивної або лікувальної дії різноманітних засобів при глюкокортикоїд-індукованому остеопорозі, даний аспект має бути врахованим.

3. Отримані позитивні результати експериментального дослідження щодо превентивної дії одночасного застосування вітамінів D_3 та Е на зміни структурно-функціонального стану компактної кісткової тканини, суглобового та епіфізарного хрящів дають підстави рекомендувати в подальшому проведення клінічного наукового дослідження з метою вивчення профілактичного ефекту поєднаної дії зазначених засобів у пацієнтів, у яких потенційно може розвиватись глюкокортикоїд-індукована остеохондропатія.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Сагаловски С. Остеопороз: клеточно-молекулярные механизмы развития и молекулы-мишени для поиска новых средств лечения заболевания. *Остеопороз и остеопатии*. 2012. № 1. С. 15–22.
2. Шишков В. Н. Остеопороз в практике невролога: фокус на позвоночник. *Фарматека*. 2013. № 9. С. 24–28.
3. Новый подход в лечение пресенильного и сенильного остеопороза / В. Струков и др. *Врач*. 2013. № 10. С. 39–31.
4. Климова Ж. А., Зафт А. А., Зафт В. Б. Современная лабораторная диагностика остеопороза. Международный эндокринологический журнал. 2014. № 7(63). С. 74 - 874–84.
5. Остеопороз вплив віку, статі, ожиріння та цукрового діабету / О. С. Ларін та ін. *Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія*. 2014. № 1(46). С. 3–14.
6. Дедух Н. В., Побел Е. А. Костная ткань в норме и при остеопорозе: препараты кальция и витамина D (обзор литературы*). Ортопедия, травматология*. 2013. № 3. С. 92–98.
7. Пеннер В. А., Нишкумай О. И., Скоробогатова О. В. Боль в спине при остеопорозе: диагностика и лечение. *Український ревматологічний журнал*. 2013. № 3(53). С. 41–44.
8. Эпигенетические аспекты остеопороза / Т. А. Гребенникова и др. Вестник РАМН. 2015. № 70 (5). С. 541–548.
9. Экспериментальное исследование протективного влияния экстракта фитотерапевтической композиции с циклодекстрином на развитие остеопороза / М. В. Гордеев и др. *Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры*. 2017. № 5. С. 18–24.

10. Лесняк О. М., Хосева Е. Н. Современные подходы к диагностике и назначению лечения при постменопаузальном остеопорозе. *Эффективная фармакотерапия*. 2013. № 38. С. 6–12.
11. Пасиешвили Л. М. Остеопороз – безмолвный костный «вор». *Східноєвропейський журнал внутрішньої та сімейної медицини*. 2015. № 1. С. 16–24.
12. Скворцов В. В., Скворцова Е. М., Мухтаров Т. А. Вопросы диагностики и лечения остеопороза: современный взгляд. *Поликлиника*. 2017. № 3. С. 54–56.
13. Тропцова Н. В. Глюкокортикоидный остеопороз: особенности терапии. Современная ревматология. 2013. № 4. С. 33–37.
14. Molecular actions of glucocorticoids in cartilage and bone during health, disease, and steroid therapy / K. Hartmann et al. *Physiol Rev*. 2016. Vol. 96. P. 409–447.
15. Animal models to explore the effects of glucocorticoid on skeletal growth and structure / C. L. Wood et al. *Journal of Endocrinology*. 2018. Vol. 236. P. 69–91.
16. Обадина Е. Л., Симонова О. В., Чичерина Е. Н. Клиническое значение оценки 10-летнего риска переломов в диагностике остеопороза у больных ревматоидным артритом. *Вятский медицинский вестник*. 2015. № 1(45). С. 17–20.
17. Меньшикова И. В. Вторичный остеопороз при ревматических заболеваниях. *Фарматека*. 2014. № 10(2). С. 34–39.
18. Мурадянц А. А., Шостак Н. А., Кондрашов А. А. Остеопороз у больного мужского пола с ревматоидным артритом (клиническое наблюдение). *Клиницист*. 2014. № 1. С. 71–76.
19. Вербовой А. Ф., Пашенцева А. В., Шаронова Л. А. Остеопороз: современное состояние проблемы. *Терапевтический архив*. 2017. № 5. С. 90–97.

20. Поворознюк В. В., Балацкая Н. И., Григорьева Н. В. Коррекция дефицита витамина D высокими дозами холекальциферола. *Біль. Суглоби. Хребет*. 2016. № 3(23). С. 32–41.
21. Miki T., Okamoto K. Glucocorticoid and Bone. Efficacy of active vitamin D on glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clinical Calcium*. 2014. Vol. 24(9). P. 1387–1392.
22. Effect of vitamin E on receptoractivator of nuclear factor kappa Bligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in rats treated with nicotine / Norazlina M.et al. *Med. J. Malaysia*. 2010. № 65 (1). P. 14–17.
23. Гависова А. А., Твердикова М. А., Якушевская О. В. Остеопороз: современный взгляд на проблему. *Русский медицинский журнал*. 2012. № 21. С. 1110.
24. Делягин В. М. Снижение костной плотности в разные возрастные периоды. *Медицинский совет.* 2012. № 2. С. 94–99.
25. Добровольская О. В., Демин Н. В., Торопцова Н. В. Состояние минеральной плотности костной ткани у женщин, перенесших малотравматичные переломы в возрасте 50 лет и старше. *Остеопороз и остеопатии.* 2012. № 2. С. 9–12.
26. European guidance for diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women / J. A. Kanis et al. *Osteoporosis Int.* 2013. Vol. 24(1). P. 23–27.
27. Корекція структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканин в умовах аліментарного d-гіпо- та гіпервітамінозу в експерименті / Г.В. Гайко та ін. *Український морфологічний альманах*. 2010. № 4, т. 8. С. 31–36.
28. Опыт диагностикихирургического лечения остеопороза позвоночника / В. В. Щедренок и др. *Травматология и ортопедия России*. 2013. № 3(69). С. 113–118.

29. Tucker G. M. The importance of calculating absolute rather than relative fracture risk. *The Bone*. 2007. № 41. P. 937–941.
30. Свешников А. А., Хвостова С. А. Остеопороз: новые научные изыскания и способы лечения. *Медицинский журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2016. № 7. С. 54–58.
31. Побел Е. А. Перелом – фактор риска развития и прогрессирования остеопении и остеопороза. *Остеопороз и остеопатии.* 2013. № 3. С. 28–34.
32. Аврунин А. С. Остеопороз и остеомаляция – клинико-диагностические проблемы. *Травматология и ортопедия России.* 2014. № 4(74). С. 67–76.
33. Наумов А. В. Распространенность и течениеостеопороза у пациентов с соматическими заболеваниями. *Міжнародний ендокринологічний журнал.* 2010. № 6.С.107–115.
34. Магнитно-резонансная томография в оценке морфологических и структурных изменений тел позвонков поясничного отдела позвоночника при снижении минеральной плотности костной ткани / С. А. Мягков и др. *Запорожский медицинский журнал.* 2014. № 1(82). С. 40–44.
35. Санеева Г. А., Ягода А. В. Состояние минеральной плотности костной ткани при синдроме гипермобильности суставов. *Архив внутренней медицины.* 2014. № 5(19). С. 62–65.
36. The burden of fractures in the European Union in 2010 / Kanis J.A et al. *Osteoporos. Int.* 2012. Vol. 23, Suppl. 2. P. 57.
37. Поворознюк В. В., Григорьева Н. В. Менопауза и остеопороз. *Репродуктивная Эндокринология.* 2012. № 2(4). С. 41–48.
38. Остеопороз – от редкого симптома эндокринных болезней до безмолвной эпидемии XX-XXI вв. / И. И. Дедов и др. *Проблемы эндокринологии.* 2011. № 57(1). С. 35–45.

39. Остеопороз у мужчин: актуальность проблемы / Ю. В. Полякова и др. *Успехи геронтологии.* 2015. № 1, том 28. С. 77–79.
40. One microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: The manitoba study / D. Hans D et al.*J. Bone Mineral Res.* 2011. № 26 (11). P. 2762–2769.
41. Яблучанский Н. И., Лысенко Н. В. Остеопороз В помощь практическому врачу. Харьков, 2011. 168 с.
42. Оцінка ефективності та безпечності алендронової кислоти (остеомакс) у лікуванні первинного та вторинного остеопорозу / В. В. Поворознюк. *Український ревматологічний журнал.* 2009. № 3. С. 71–70.
43. Баранова И. А., Торопцова Н. В., Лесняк О. М. Основные положения клинических рекомендаций «Диагностика, профилактика лечение глюкокортикоидного остеопороза у мужчин и женщин 18 лет и старше. *Остеопороз и остеопатия.* 2014. № 3. С. 34–37.
44. Тропцова Н. В. Глюкокортикоидный остеопороз: диагностика, профилактика и лечение. *Научно-практическая ревматология.* 2014. № 52(4). С. 423–429.
45. Мордасов Н. А., Иванюта И. В. Сравнительное исследование двух антирезорбтивных препаратов с разными механизмами действия при лечении хронического генерализованного пародонтита на фоне вторичного остеопороза. *Научный альманах.* 2016. № 5-3(19). С. 319–323.
46. Глюкокортикоидиндуцированный остеопороз у неврологических больных: мероприятия по профилактике и лечению / К. В. Антонова и др. *Нервно-мышечные болезни*. 2017. № 2(7). С. 10–20.
47. Regional differences in treatment for osteoporosis. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW) / Díez-Pérez A. et al. *Bone 2011*. Vol. 49. P. 493–498.

48. Головач І. Ю. Глюкокортикоїд-індукований остеопороз: етапи розвитку вчення в Україні та сучасний стан проблеми. *Біль. Суглоби. Хрубет.* 2011. № 3. С. 47–53.
49. Левченко О. О. Алгоритм дослідження стану кісткової тканини у хворих на тяжкі дерматози, що одержують доготривалу системну терапію глюкокортикостероїдними гормонами. *Дерматологія та венерологія.* 2013. № 4(62) . С. 79–82.
50. Сравнительное исследование комплексной терапии хронического генерализованого пародонтита средней степени тяжести на фоне вторичного остеопороза / Н. А. Мордасов и др. *Научный медицинский вестник.* 2016. № 2(4). С. 88–95.
51. Макеев А. А., Салагаева А. Е., Просенко А. Е. Морфофункциональное состояние пластинки роста тела позвонка крыс при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе. *Вестники Новосибирского государственного педагогического университета.* 2015. № 1(23). С. 88–93.
52. Терапевтический подход к лечению хронического генерализованного пародонтита на фоне системного остеопороза / К. Г. Караков и др. *Медицинский алфавит.* 2016. №2. С. 12 – 16.
53. Глюкокортикоїд-індукований остеопороз у хворих на бронхіальну астму та ревматоідний артрит: застосування ібадронової кіслоти під контролем ренгеноденситометрії / М. К. Терновий та ін. *Лучевая діагностика, лучевая терапия.* 2012. № 2. С. 27–33.
54. Баранова И. А. Новые возможности лечения глюкокортикоидного остеопороза. *Современная ревматология.* 2014. № 2. С. 96–99.
55. Kong Y. Y. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp. Gerontol.* 2000. Vol. 8. P. 947–956.
56. High prevalence of asymptomatic vertebral fractures in postp-menopausal women receiving chronic glucocorticoid therapy: a cross-

sectional outpatients study / A. Angeli et al. *Bone*. 2006. Vol. 39(2). P. 253–259.

57. Кутасевич Я. Ф., Олейник И. А, Левченко О. А. Оценка качества жизни пациентов тяжелыми дерматозами с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом, как осложнением длительной терапии системными кортикостероидными гормонами. *Дерматология и венерология*. 2013. № 1(59). С. 54–57.
58. Compston J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2010. Vol. 6(2). P 82–88.
59. Trends in prevention of glucocorticoid-induced osteoporosis / K. G. Saag et al. *J. Rheumatol*. 2006. Vol. 33. P. 1651 – 1657.
60. Raisz L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prspects. *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115(12). P. 3318–3325.
61. Once-weekly oral alendronate 70 mg in patients with glucocorticoid-induced bone loss: a randomized, placebo-controlled clinical trial / S.A. Stoch et al. *J. Rheumatol.* 2009. Vol. 36. P. 1705–1714.
62. Коваленко В. М., Шуба Н. М., Борткевич О. П. Патогенетичні аспекти розвитку остеопорозу у пацієнтів із ревматологічними хворобами як основа концепції лікування. Частина 1. Системний вторинний остеопороз. Роль глюкокортикоїдів. Інші чинники розвитку. *Український медичний часопис.* 2011. № 3(83). С. 43–49.
63. European guidance for diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women / J. A. Kanis et al. *Osteoporosis Int.* 2008. Vol. 19. P. 399–428.
64. Орленко В. Л. Остеопороз и эндокринная я система витамина D: некоторые аспекты патогенеза и диагностики. *Здоров'я України*. 2012. № 20(58). С. 65–67.
65. Cole Z. A., Dennison E. M., Cooper C. Osteoporosis epidemiology update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2008. Vol. 10, № 2. P. 92–96.

66. Compston J. . Osteoporosis: social and economic impact. *Radiol. Clin. North. Am.* 2010. Vol. 48, №3. P. 477–482.
67. Leslie W. D., Tsang J. F., Lix L. M. Simplified system for absolute fracture risk assessment: clinical validation in Canadian women. *J. Bone Miner.Res.* 2009. Vol. 24. P. 353–360.
68. Vertebral fracture status and the World Health Organization risk factors for predicting osteoporotic fracture risk / P. Chen et al. *J. Bone Miner. Res.* 2009. Vol. 24. P.495–502.
69. Дефіцит вітаміну Dy пацієнтів з остопорозом / В. В. Поворознюк та ін. *Проблеми остеології.* 2012. № 1 (15). С. 24–27.
70. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D / Mithal A. et al. *Osteoporosis Int*. 2009. Vol. 20. P. 1807–1820.
71. Мокрышева Н. Г., Рожинская Л. Я. Современный взгляд на эффективность терапии постменопаузального остеопороза. Инновационные препарате таргетной терапии. *Остеопороз и остеопатии.* 2013. № 1. С. 29–33.
72. Рожнова О. М., Фаламеева О. В., Садовой М. А. Патофизиология костной ткани при остеопорозе (обзор литературы). *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2015. № 9. С. 666–669.
73. Факторы, влияющие на ремоделирование костной ткани, у больных лимфомой Ходжкина (обзор литературы) / М. С. Войтко. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2018. № 4(38). С. 65–72.
74. American association of clinic endocrinologists and American college of endocrinology clinical practice guideline for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis / P. M. Camacho et al. *Endocr. Pract.* 2016. Vol. 22(2). P. 1–42.
75. Ficumoto S. Various functions of cytokines in metabolism of bones and cartilage. *Clin Calcium*. 2010. № 20(10). P. 1457–1459.

76. Janja Z., Radko K., Janja M. The relationship berween osteoclastogenic and anti-osteoclastogenic pro-inflammatory cytokines differs in human osteoporotic and osteoarthritic bone tissues. *Journal of Biomedical Science.* 2012. Vol. 19(28) P. 19–28.
77. Мендешева Г. Г. Роль цитокинов в патогенезе остеопороза. *Медицина.* 2013. № 3. С. 17–19
78. Talayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunology*. 2007. Vol. 7. P. 292–304.
79. Osteoimmunology: Interplay between the immune system and bone metabolism / M. C. Walsh et al. *Ann Rev Immunol*. 2006. Vol. 24. P. 33–63.
80. Comprehensive review of the shared roles of inflammatory cytokines in osteoporosis and cardiovasculare diseases as two common old people problem; action toward development of new drags / P. Salari et al. *International Journal of Pharmacology*. 2011. Vol. 7(5). P. 552–567.
81. D'Amelio P., Grimaldi A., Di Bella S. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up regulating T-cell activivty: a kay mechanism in osteoporosis. *Bone*. 2008. Vol. 43. P. 92–100.
82. Accuracy of patient reported height loss and risk factors for height loss among postmenopausal women / K. Briot et al. *CMAJ.* 2010. Vol. 182. P. 558–562.
83. Moayyeri A. The association between physical activity and osteoporotic fractures: a review of the evidence and implications for future research. *Ann. Epidemiol*. 2008. Vol. 18. P. 827–835.
84. Inada M., Miyaura C. Cytokines in bone diseases. Cytokine and postmenopausal osteoporosis. *Clin. Calcium*. 2010. Vol. 20 (10). P. 1467–1472.
85. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis / S. Jabbar et al. *J. Clin Pathol.* 2011. Vol. 64. P. 354–357.

86. Gulko P. S. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, prevention and treatment. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1996. Vol. 14(2). P. 199–206.

87. McKay L. I., Cidlowski J. A. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol. Endocrinol*. 1998. Vol. 12. P. 45–56.

88. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit anti-inflammatory activity in vivo / B. M. Vayssiere et al. *Mol. Endocrinol*. 1997. Vol. 11. P. 1245–1255.

89. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action / F. Buttgereit et al. *Arthritis Rheum*. 2004. Vol. 50. P. 3408 – 3417.

90. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength / C. A. O'Brien et al. *Endocrinology*. 2004. Vol. 145. P. 1835–1841.

91. Prevention of glucocorticoid-induced apoptosis in osteocytes and osteoblasts by calbindin-D28k / Y. Liu at al. *J Bone Miner. Res*. 2004. Vol. 19. P. 479–490.

92. Glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3beta / S. I. Yun et al. *Bone Miner. Metab*. 2009. Vol. 27. P. 140–148.

93. Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss / F. S. Wang et al. *Endocrinology.* 2008. Vol. 149. P. 1793–1801.

94. Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation / J. S. Butler et al. *BMC Musculoskelet Disord*. 2010. Vol. 11. P. 210–219.

95. Regulation of of human bone marrow cell proliferation and differentiation capacity by glucocorticoid receptor and AP-1 crosstalk /

I. Carmamo-Orive et al. *J. Bone Miner. Res*. 2010. Vol. 25. P. 2115–2125.

96. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis / L. C. Hofbauer et al. *Endocrinology*. 1999. Vol. 140. P. 4382–4389.
97. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels / T. Kondo et al. *Cell Biochem.* 2008. Vol. 103(1). P. 335–345.
98. Glucocorticoid induced osteoporosis: pathophysiology and therapy / E. Canalis et al. *Osteoporos*. 2007. Vol. 18. P. 1319–1328.
99. Vertebral fracture assessment (VFA) with a densitometer predicts future fractures in elderly women unselected for osteoporosis / E. V. McCloskey et al. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2008. Vol. 23. P. 1561–1568.
100. Nguyen T. V. Genetics of osteoporosis: From population association to individualized prognosis of fracture. *IBMS Bone.* 2008. Vol. 5. P. 212–221.
101. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update / X. H. Xu et al. *Endocrinol. Rev*. 2010. Vol. 31. P. 447–505.
102. Ежов М. Ю., Берендеев Н. Н., Петров С. В. Математическая модель развития изменений в суставных тканях при различных по интенсивности физических нагрузках. *Фундаментальные исследования.* 2013. № 3-7. С. 550–554.
103. Goldring M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet Dis*. 2012. Vol. 4(4). P. 269–285.
104. Novochadov V. V. Growth factor technologies in cartilage tissue engineering (review). Eur. J. Mol. *Biotech*. 2013. Vol. 1(1). P. 28–37.

105. Бенгус Л. М. Фагоцитоз и хондроптоз в хряще (дискуссии, поиски, гипотезы). *Бюллетень медицинских Интернет-конференций*. 2012. № 4(12). С. 182–187.

106. Новочадов В. В. Неоднородность строения гиалинового хряща коленного сустава у интактных крыс и при экспериментальном остеоартрозе. *Вестник Волгоградского государственного университета. Серия 11, Естественные науки*. 2014. № 4(10). С. 7–16.

107. Articular cartilage: structure and regeneration / J. Becerra et al. *Tissue End. Part B Rev*. 2010. Vol. 16 (6). P. 617–627.

108. Новая фитотерапевтическая композиция для восстановления костной и хрящевой тканей. Экспериментальное исследование / Е. Е. Волков и др. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2015. № 4(59). С. 30–34.

109. Amanda L., Cruver-Yates, Cidlowski J. A. Tissue-specific action of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*. 2013. Vol. 2. P. 202–223.

110. Гетманец А. В. Гистологическое строение проксимального эпифиза хряща большеберцовой кости при экспериментальном артрите коленного сустава. *Український морфологічний альманах*. 2012. № 2(10). С. 29–31.

111. Морфологія суглобового хряща щурів з кориткостероїдною дистрофією при лікуванні комбінацією глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом та диклофенаком натрію / Н. В. Дєдух та ін. *Вісник фармації*. 2011. № 2(66). С. 70–74.

112. Зупанец И. А, Туляков В. А., Шебеко С. К. Влияние комбинации глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом на апоптоз хондроцитов в условиях развития системного стероидного артроза. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012. № 4(75). С. 34–37.

113. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway / D. Chrysis et al. *Endocrinology*. 2005. Vol. 146. P. 1391–1397.
114. Gruver-Yates A. L., Cidlowski J. A. Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword. *Cells*. 2013. Vol. 2. P 202–223.
115. Туляков В. А., Зупанец И. А. Влияние парацетамола на показатели метаболизма соединительной ткани при экспериментальном остеоартрозе. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. № 5 (72). С. 50 – 55.
116. Recognizing osteoporosis and its consequences in Quebec (ROCQ): background, rationale, and methods of an anti-fracture patient health-management programmed / L. Bessette at al. *Contemp. Clin. Trials.* 2008. Vol. 29. P. 194–210.
117. Morin S., Tsang J. F., Leslie W. D. Weight and body mass index predict bone mineral density and fractures in women aged 40 to 59 years. *Osteoporosis Int.* 2009. Vol. 20. P. 363–370.
118. Screening for osteoporosis in men: a systemic review for an Americal College of Physicians guideline / H. Liu et al. *Ann. Intern. Med*. 2008. Vol. 148. P 685–701.
119. Closing the osteoporosis care gap: increased osteoporosis awareness among geriatrics and rehabilitation teams / D. A. Haaland et al. *BMC Geriatr*. 2009. Vol. 28. P. 1–9.
120. Тумашева А. Г. Особенности минерального обмена и метаболизма костной ткани у женщин в постменопаузе. *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2015. № 10. С. 277–278.
121. Клинико-прогностическое значение молекулярно-генетических факторов при постменопаузальном остеопорозе / С. В. Юренева и др. *Остеопороз и остеопатии*. 2015. № 1. С. 3 – 6.

122. Durosier C. H. Defining risk thresholds for a 10-year probability of hip fracture model that combines clinical risk factors and quantitative ultrasound: results using the EPISEM Cohort. *Journal of Clinical Densitometry*. 2008. Vol. 11(3). P. 397 – 403.
123. Using the same bone density reference database for men and women provides a simpler estimation of fracture risk / L. Langsetmo et al. *J. Bone Miner. Res*. 2010. Vol. 25. P. 2108–2114.
124. Поляков Е. Ю. Остеопороз: методические подходы к диагностике. *Лечение и профилактика*. 2012. № 2(3). С. 59–63.
125. International society for Clinical Densitometry 2007. Adult and pediatric official positons / E. M. Lewiecki et al. *Bone.* 2008. Vol. 43(6). P. 1115–1121.
126. Гайдукова И. З., Ребров А. П. Биомаркеры при заболеваниях суставов, состояние проблемы и перспективы применения. *Научно-практическая ревматология*. 2012. № 54(5). С. 73–79.
127. Способ диагностики остеопороза и определения эффективности препарата в лечении заболевания / В. И. Струков и др. *Фармация*. 2013. № 8. С. 1–4.
128. Boonen S. L. Need for additional calcium to reduce the risk of hip fracture with vitamin D supplementation: evidence form a comparative metaanalysis of randomized controlled trials. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007. Vol. 92(4). P. 1415–1423.
129. Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health / A. Cranney et al. *Evidence Report Technology Assessment*. 2007. Vol. 158. P. 1 – 235.
130. Jones G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *The American jurnal of clinical nutrition*. 2008. Vol. 88. P. 582–586.
131. Superiority of alfacalcidol over plain vitamin D in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis / J. D. Ringe et al. *Rheumatol Int.* 2004. Vol 24 (2). P. 63–70.

132. Reid I. R., Bolland M. J., A. Grey Effect of calcium supplementation on hip fractures. *Osteoporos Int.* 2008. Vol. 19. P. 1119–1123.
133. The effect of a 30-month dietary intervention on bone mineral density: the postmenopausal health study / G. Moschonis et al. *British Journal of Nutrition*. 2010. Vol. 104. P. 100–107.
134. Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: randomized controlled trial / M. J. Bolland et al. *BMJ.* 2008. Vol 336. P. 262–266.
135. A comparison of calcium, calcitriol, and alendronate in corticosteroid-treated premenopausal patients with systemic lupus erythematosus / S. S. Yeap et al. *J. Rheumatol*. 2008. Vol. 35(12). P. 2344–2347.
136. Interventions for preventing falls in older people living in the community / L. D. Gillespie et al. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009. Vol. 15(2). P. 345–355.
137. Lips P. Relative value 25(OH)D and 1, 25(OH)2D measurements. *J. Bone Miner. Res*. 2009. Vol. 22. P. 1668 – 1671.
138. Calcium and vitamin D for corticosteroid-induced osteoporosis / J. Homik. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000. Vol. 2. P. 123–133.
139. Effects of exercise programs on quality of life in osteoporosis and osteopenic postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis / W. C. Li et al. *Clin Rehabil*. 2009. Vol. 23. P. 888–896.
140. Korkor A. B., Eastwood D., Bretzmann C. Effects of gender, alcohol, smoking, and dairy consumption on bone mass in Wisconsin adolescents. *WMJ.* 2009. Vol. 108(4). P. 181–188.
141. Sodium and bone health: impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women / B. Teucher, et al. *J. Bone Min. Res*. 2008. Vol. 23(9). P. 1477–1485.
142. Effect of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotin-treated rats / M. Norazlina et al. *Singapore Medical Journal*. 2007. Vol. 48(3). P. 195–199.

143. Xu H., Watkins B. A., Seifert M. F. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. Calcified Tissue International. 1995. Vol. 57(4). P. 293–300.

144. Palm vitamin E prevents osteoporosis in orchidectomized growing male rats / S Ima-Nirwana et al. *Natural Product Scienses*. 2000. Vol. 6(4). P. 155–160.

145. Vitamin E improves bone quality in the aged but not in young adult male mice / B. H. Arjmandi et al. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002. Vol. 13(9). P. 543–549.

146. Смалюх О. З. Остеопороз: що потрібно знати лікарю-практику (огляд літератури). *Буковинський медичний вісник*. 2013. № 2(66). С. 168–171.

147. Шепелькевич А. П., Лобашов В. Л., Васильева Н. А. Опыт применения алендроновой кислоты (Осталон) в комплексном лечении постменопаузального остеопороза. *Ревматология, травматология и ортопедия.* 2014. № 3. С. 4–10.

148. Fracture prediction and calibration of a Canadian FRAX(R) tool: a population-based report from CaMos / L. A. Fraser et al. *Osteoporosis Int*. 2011. Vol. 22. P. 829–237.

149. Glucocorticoid-induced bone loss in mice can be reversed by the actions of parathyroid hormone and risedronate on different pathways for bone formation and mineralization / W Yao et al. *Arthritis Rheum*. 2008. Vol. 58. P. 3485–3497.

150. The comparative efficacy of drug therapies used for the management of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-regression / S. Amin et al. *J. Bone Miner. Res*. 2002. Vol. 17. P. 1512–1526.

151. Efficacy and safety of daily risedronate in the treatment of corticosteroid-induced osteoporosis in men and women: a randomized trial. European Corticosteroid-Induced Osteoporosis Treatment Study / D. M. Reid et al. *J Bone Miner Res.* 2000. Vol. 15(6). P. 1006–1013.

152. Osteoporosis: assessment of fracture risk and the prevention of osteoporotic fractures in individuals at high risk. Systematic reviews of clinical effectiveness prepared for the guideline. National Collaborating Center for Nursing and Supportive Care, 2008. 205 p.
153. Wells G. A. Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausl women. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2008. 208 p.
154. Rahmane P., Moris S. Prevention of osteoporosis-related fractures among postmenopausal women and older men. *CMAJ*. 2009. Vol. 181. P. 815–820.
155. Wells G. A. Risedronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2008, 208 p.
156. Головач І. Ю. Ризендронат у лікуванні остеопорозу: фармакологічний профіль, клінічна ефективність, переносимість і безпека. *Український ревматологічний журнал*. 2010. № 3. С. 58–62.
157. Альфакальцидол (Альфа-$Д_3$-Тева) в профилактике глюкокортикоидиндуцированного остеопороза / Дж. У. Регинстер и др. *Український ревматологічний журнал*. 2010. № 3. С 85–87.
158. Альфакальцидол в лечении остеопороза и профилактика остеопоротических переломов / Н. А. Корж и др. *Ортопедия, травматология и протезирование*. 2011. № 3. С. 117 – 124.
159. Alendronate or alfacalcidol in glucocorticoid-induced osteoporosis / R. N. De Nijs et al. *N. Engl. J. Med*. 2006. Vol. 355(7). P. 675–684.
160. Ibandronate prevents bone loss and reduces vertebral fracture risk in male cardiac transplant patients: a randomized double-blind, placebo-controlled trial / A Fahrleitner-Pammer et al. *J. Bone Miner. Res*. 2009. Vol. 24. P. 133 –1344.

161. Дедух Н. В. Остеопороз: механизм лечебного действия бисфосфонатов и клинические перспективы. *Травма*. 2013. № 2(14). С. 36–40.

162. Rietbrock S., Olson M., Van Staa T. P. The potential effects on fracture outcomes of improvements in persistence and compliance with bisphosphomates. *QJM*. 2009. Vol. 102(1). P. 35–42.

163. Reid I., Blake J. Menopausal and osteoporosis update 2009. *Journal of Obstetrics and Gynecology Canada*. 2009. Vol. 31. P. 1–52.

164. Effects of raloxifene on fracture risk in postmenopausal women: The raloxifene use for the heart trial / K. E. Ensrud et al. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2008. Vol 23(1). P. 112–120.

165. Effects of teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: thirty-six-month results of a randomized, double-blind, controlled trial / K. G. Saag et al. *Arthritis Rheum*. 2009. Vol. 60. P. 3346–3355.

166. Reduction in fracture rate and back pain and increased quality of life in postmenopausal women treated with teriparatide: 18-month data from the European Forsteo Observational Study (EFOS) / B. L. Langdahl et al. *Calcif. Tissue Int*. 2009. Vol. 85. P. 484–493.

167. Intermittent parathyroid hormone administration counteracts the adverse effect of glucocorticoids on osteoblast and osteocyte viability, bone formation, and strength in mice / R. S. Weinstein et al. *Endocrinology*. 2010. Vol. 151. P. 2641–2649.

168. American College of Rheumatology 2010 recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis / J. M. Grossman et al. *Arthritis Care Res*. 2010. Vol. 62. P. 1515–1526.

169. Lau A. N. Role of teriparatide in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Ther. Clin. Risk. Manag. 2010. Vol. 6. P. 497–503.

170. Teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: an analysis by gender and menopausal status / B. L. Langdahl et al. *Osteoporosis Int*. 2009. Vol. 20(12). P. 2095–2104.
171. DuqueG., Troen B. R. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. J Am Geriatr. 2008. Vol. 56(5). P. 935–941.
172. Incidence of osteoporosis of the jaw in women with postmenopausal osteoporosis in the health outcomes and reduced incidence with zoledronic acid once yearly pivotal fracture trial / J. T. Grbic et al. *Journal of the American Dental Association*. 2008. Vol. 139. P. 32–40.
173. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research / E. Shane et al. *J. Bone Miner. Res*. 2010. Vol. 25. P. 2267–2294.
174. Sustained antiresorptive effect after a single treatment with human recombinant osteoprotrgerin (OPG): a pharmacodynamics and pharmacokinetic analysis in rats / C. Capparelli et al. *J. Bone Min. Res*. 2003. Vol. 18. P. 852–858.
175. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal woman / P. J. Bekker et al. *J. Bone. Min. Res*. 2004. Vol. 19. P. 1059–1066.
176. Краткое изложение клинических рекомендаций по диагностике и лечению остеопороза российской ассоциации эндокринологов / Г. А. Мельниченко и др. *Остеопороз и остеопатии*. 2016. № 3. С. 28–36.
177. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density / M. R. McClung et al. N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 354. P. 821–831.
178. Geusens P. Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis – focus on denodumab. Clin. Int. Aging. 2009. Vol. 4. P. 241–250.

179. Leslie W. D., Lix L. M., Johansson H. Independent clinical validation of a Canadian FRAX tool: fracture prediction and model calibration. *J. Bone Miner. Res*. 2010. Vol. 25. P. 2350 – 2358.

180. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis / S. R. Cummings et al. *N. Engl. J. Med*. 2009. Vol. 361. P. 756–765.

181. Constructions of a FRAX(R) model for the assessment of fracture probability in Canada and implications for treatment / W. D. Leslie et al. *Osteoporosis Int*. 2011. Vol. 22. P. 817 – 827.

182. Roman-Gonzales A., Ackerman K. E. Pharmacotherapy of bone loss in post-menopausal women: focus on Denosumab. *Clin. Med*. 2009. Vol. 1. P. 1131–1143.

183. Leslie W. D., Tsang J. F., Lix L. M. Validation of ten-year fracture risk prediction: a clinical cohort study from the Manitoba Bone Density Program. *Bone*. 2008. Vol. 43. P. 667–671.

184. Hans W. D., Tsang J. F., Lix L. M. Validation of ten-year fracture risk prediction: a clinical cohort study from the Manitoba Bone Density Program. *Bone*. 2008. Vol. 43. P. 667–671.

185. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on bone mineral turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, Phase 3 trial / J. B. Brown et al. *J. Bone Min. Res*. 2009. Vol. 24. P. 153–161.

186. Assessment of fracture risk / J. A. Kanis et al. *European Journal of Radiology*. 2009. Vol 71. P. 392–397.

187. Trends in hip fractura rates in Canada / W. D. Leslie et al. *JAMA*. 2009. Vol. 302. P. 883 – 889.

188. Effects of osteoporosis treatment on mortality: a meta-analysis / M. J. Bolland et al. *J. Clin. Endicrinol. Metab*. 2010. Vol. 95. P. 1174–1181.

189. Steyerberg E. Clinical prediction models: A practical approach to development, validation, and updating: New York: Springer, 2008. – 497 p.

190. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И. П. и др.; под ред. И. П. Западнюка. Київ: Вища школа, 1983. 381 с.

191. Шалимов А. А., Радзиховский А. П., Кейсевич Л. В. Руководство по экспериментальной хирургии. Москва: Медицина, 1989. 270 с.

192. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel. Київ: Морион, 2000. 320 с.

193. Dyce B. J., Besman S. P. Atrapidmonensimatie assay for 2,3 DPG in multiple specimen of blood. *Arch. Environ. Health*. 1973. Vol 27(2). P.112–115.

194. Щелочная фосфотаза: современное состояние вопроса / Б. Плеханов и др. *Лаб. Дело*. 2008. № 11.С. 4–7.

195. Роль вітаміну Е в регуляції гідроксилювання хлоркальціоферолу за D – гіповітамінозу та D – гіпервітамінозу / Л. І. Апуховська та ін. *Український біохімічний журнал*. 2009. № 5 (81). С. 50–57.

196. Uptake and 25–hydroxylation of vitamin D_3 isolated rat liver cells / S. Dueland et al. *J. Biol. Chem*. 1981. V. 256(20). P. 10430–10434.

197. Брицке Э. М. Атомно-абсорбционный спектральный анализ. Москва: Химия, 1982. 244 с.

198. Новиков Ю. В., Аксюк А. М., Леточников А. М. Применение спектрографии для определения минерального состава костной ткани при гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 1969. № 6. С.72–76.

199. Меркулов Г. А. Курс патогистологической техники. Москва: Медгиз, 1986. 342 с.

200. Автандилов Г. Г. Медицинская мофометрия. Москва: Медицина, 1990. 383 с.
201. Морфологічні зміни суглобового і проксимального епіфізарного хрящів та діафіза стегнової кістки щурів при короткотривалому введенні преднізолону / А. В. Калашніков та ін. *Вісник морфології.* 2015. № 2(21). С. 303–307.
202. Вплив преднізолону на мінеральний та D-вітамінний обмін при його короткотривалому введенні / А. В. Калашніков та ін.*BiomedicalandBiosocialAntropology*. 2015. № 25. С. 16– 19.
203. Григоровський В. В., Калашніков А. В., Кузів Є. Л. Показники структурно-функціонального стану губчастої та компактної кістки та їхня кореляція за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу в умовах застосування вітамінів D та E. *Вісник ортопедії, травматології та протезування*. 2018. № 1. С. 15–26.
204. Калашніков А. В., Апуховська Л. І., Кузів Є. Л. Вплив вітаміну D3 на мінеральний та D-вітамінний обмін при поєднаному введенні з перднізолоном. *Вісник Вінницького національного медичного університету.* 2017. № 2(21). С. 370–374.
205. Гістопатологія, морфометричні показники кісток, суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті / В. В. Григоровський та ін. *Патологія*. 2018. № 2(43). С. 128–135.
206. Шуба Н. М. Остеопороз – актуальна проблема XXI століття: сучасне уявлення про патогенез і терапію. *Український ревматологічний журнал*. 2008. № 2(32). С. 5–14.
207. Whittier X., Saag K. G. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheum. Dis Clin North Am.* 2016. Vol. 42(1). P. 177–89.
208. Батура І. О. Вплив екзогенного гідрокортизону на ріст, будову та регенерацію стегнової кістки щурів різного віку : дис. … к. біол. н.

: 03.00.11 / Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка АМН України. К. 2008. 20 с.

209. Short-term glucocorticoid treatment of piglets causes changes in growth plate morphology and angiogenesis / J. J. Smink et al. *OsteoArthritis and Cartilage.* 2003. Vol. 11(12). P. 864–871.
210. Adler R. A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: management update. *Curr Ostoporos Rep.* 2010. Vol. 8(1). P. 10–4.
211. Guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis / R. M. R. Pereira et al. *Rev Bras Reumatol.* 2012. Vol. 52(4). P 569–593.
212. 2017 American College of Rheumatology guideline for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis / L. Buckley et al. *Arthritis Rheumatol.* 2017. Vol. 69(8). P. 1521–1537.
213. DeLuca H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004. Vol.80. P. 1689 – 1696.
214. Ефективність комплексних препаратів вітаміну D_3при остеопорозі / Л. І. Апуховська та ін. *Біотехнологія.* 2008. № 2(1). С. 59–68.

ДОДАТОК
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Калашніков А. В., Бруско А. Т., Кузів Є. Л., Вільцанюк О. О., Апуховська Л. І. Морфологічні зміни суглобового і проксимального епіфізарного хрящів та діафіза стегнової кістки щурів при короткотриваломоу введенні преднізолону. Вісник морфології. 2015; 2(21): С. 303-307.

Особистий внесок дисертанта полягає у виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

2. Калашніков А. В., Апуховська Л. І., Кузів Є. Л., Вільцанюк О. О. Вплив преднізолону на мінеральний та D-вітамінний обмін при його короткотривалому введенні. Biomedical and Biosocial Antropology. 2015; 25: 16-19.

Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

3. Калашніков А. В., Апуховська Л. І., Кузів Є. Л. Вплив вітаміну D3 на мінеральний та D-вітамінний обмін при поєднаному введенні з перднізолоном. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2017; 2(21): 370-374. (Журнал включений до міжнародної інформаційної науковометричної бази Google Scholar).

Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

4. Калашніков А. В., Бруско А. Т., Кузів Є. Л. Морфологічна та морфометрична характеристика змін структурно-функціонального стану кісткової та хрящової тканини при поєднаному введенні вітаміну D3 з преднізолоном. Вісник морфології. 2017; 2(23): 207-211.

Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

5. Калашніков А. В., Кузів Є. Л. Остеопороз та глюкокортикоїд-індукований остеопороз – медико-соціальна проблема. Biomedical and BiosocialAntropology. 2017; 28: 193-197.

Особистий внесок дисертанта полягає у зборі літературних джерел, оформленні і підготовці статті до друку.

6. Григоровський В. В., Калашніков А. В., Кузів Є. Л., Апуховська Л. І. Гістопатологія, морфометричні показники кісток, суглобового та епіфізарного хрящів при глюкокортикоїд-індукованій остеохондропатії в експерименті. Патологія. 2018; 2(43): 128-135. (Журнал включений до міжнародних інформаційних науковометричних баз Google Scholar, World Cat, Cite Factor, Science Index, OAJI, SCIARY).

Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

7. Григоровський В. В., Калашніков А. В., Кузів Є. Л. Показники структурно-функціонального стану губчастої та компактної кістки та їхня кореляція за експериментального глюкокортикоїд-індукованого остеопорозу в умовах застосування вітамінів Dта Е. Вісник ортопедії, травматології та протезування. 2018; 1: 15-26. (Журнал включений до міжнародної інформаційної науковометричної бази РИНЦ).

Особистий внесок дисертанта полягає в організації і виконанні експериментального дослідження, аналізі результатів, формуванні висновків, оформленні і підготовці статті до друку.

8. Кузів Є. Л. Остеопороз та глюкокортикоїдіндукований остеопороз – медико-соціальна проблема. Збірник наукових праць Української військово-медичної академії. Випуск 48. Київ, 2017. с. 202-210.