

DOI: 10.26693/jmbs06.05.116

УДК 616.71-001.5-006-092.9-085.277.3

Рябенко Т. В., Кореньков О. В., Ковалюк Т. М.

## МОРФОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ РЕПАРАТИВНОЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ ВПЛИВУ ПРОТИПУХЛИННОЇ ХІМІОТЕРАПІЇ

Сумський державний університет, Медичний Інститут, Україна

*Метою* даної роботи стало дослідження морфологічних особливостей репаративного остеогенезу за умов впливу протипухлинної хіміотерапії.

*Матеріали та методи.* Дослідження проведено на 96 білих лабораторних щурах-самцях 7-місячного віку вагою  $230 \pm 10$  гр. Усім тваринам наносився дірчастий дефект діаметром 2 мм шароподібною фрезою до кістковомозкового каналу у середній третині діафіза стегнової кістки. Тварини були поділені на контрольну ( $n=24$ , без дії хіміопрепаратів) та три експериментальні групи (I, II, III,  $n=72$ ), яким після нанесення травми та через кожну 21-у добу дослідження вводили внутрішньоочеревинно протипухлинні хіміопрепарати: I-й ( $n=24$ ) – доксорубіцин ( $60 \text{ мг/м}^2$ ), II-й ( $n=24$ ) – 5-фторурацил ( $600 \text{ мг/м}^2$ ), III-й ( $n=24$ ) – метотрексат ( $40 \text{ мг/м}^2$ ). На 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після травми тварин виводили з експерименту з наступним вилученням травмованих довгих трубчастих кісток.

Проводили вивчення гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином з наступною їх морфометрією, растрову електронну мікроскопію з методом рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії та імуногістохімічне дослідження.

*Результати.* Протипухлинні хіміопрепарати викликають сповільнене формування кісткової мозолі, що проявляється збільшенням площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканини в регенераті поряд з повільним формуванням пластинчастої кісткової тканини. Хіміотерапія призводить до порушень фосфорно-кальцієвого обміну як в самому регенераті, так і в материнській кістці у вигляді зниження інтенсивності мінералізації новоутвореного кісткового матриксу та сповільнення ремоделюючої активності самої материнської кістки. Лікування хіміопрепаратами супроводжується зростанням рівня експресії маркера резорбції кісткової тканини катепсину K та зниженням експресії маркера кісткоутворення остеопонтину, що свідчить про затримку формування регенерату в ділянці травми та зниження темпів репаративної регенерації.

*Висновок.* Найбільш виражена затримка процесів ремоделювання кісткового регенерату встановлена при застосуванні доксорубіцину та метотрексату, в той час як 5-фторурацил виявив менший інгібуючий вплив на зазначені процеси.

**Ключові слова:** кістковий регенерат, протипухлинні хіміопрепарати, морфометрія, скануюча мікроскопія, спектральний аналіз, імуногістохімія.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дана робота є фрагментом НДР кафедри морфології Медичного Інституту Сумського Державного університету «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму», № державної реєстрації 0118U006611.

**Вступ.** Проблема репаративного остеогенезу у онкологічних пацієнтів має важливе значення і є маловивченою в наш час. Відомо, що розвиток раку в організмі призводить до порушень кісткового метаболізму, що проявляється остеопорозом, метастатичним ураженням кісток та виникненням патологічних переломів.

Процеси ремоделювання кісткової тканини зумовлені балансом між активністю остеокластів та остеобластів, що лежить в основі процесів нормального кісткового гомеостазу, таких як резорбція кістки та її утворення [1].

Пухлинні клітини порушують кістковий метаболізм, що призводить до вивільнення з мінералізованої кістки наступних факторів росту: трансформуючого фактору росту  $\beta$  (TGF $\beta$ ), активіну, фактору росту фібробластів (FGF), тромбоцито-похідного фактору росту (PDGF) та інсуліноподібного фактору росту (IGF). Внаслідок їх дії відмічається посилення росту пухлинних клітин та подальше руйнування кісткової тканини. Ракові клітини стимулюють остеокластогенез такими секретуючими факторами, як PTHrP. Остеокласти експресують RANK, який зв'язується з RANKL, що продукується остеобластами. Це призводить до диференціації остеокластів та посилення процесів резорбції кісткової тканини. Остеобласти також виробляють рецептор - приманку для RANKL - OPG, який інгібує утворення та активність остеокластів, зв'язуючись з RANKL [2]. Цей циклічний зв'язок збільшує метастатичні ураження в кістці і в кінцевому підсумку призводить до численних супутніх захворювань, включаючи перелом кістки. [3]

Метастази в кістки часто зустрічаються у пацієнтів із прогресуючими злоякісними пухлинами, особливо у хворих на рак молочної, передміхурової, щитоподібної залоз, легенів, нирок та сечового

міхура [4,5]. Кістка є особливо сприятливим ґрунтом для метастазування ракових клітин завдяки тому, що вона є багатим джерелом факторів росту, факторів неоваскуляризації, цитокінів та хемокінів, які сприяють колонізації, росту та стійкому виживанню ракових клітин [6]. Повідомлялося, що у 9–29% пацієнтів, які страждають від кісткових метастазів, розвиваються патологічні переломи. Загалом, патологічні переломи найчастіше виникають у довгих кістках скелету та в хребті [7].

Переломи кісток спричиняють зниження якості життя та впливають на прогноз онкологічного захворювання через погіршення загального стану хворого та відтермінування або припинення лікування первинного захворювання [8].

Ще до початку лікування раку онкологічні хворі мають підвищений ризик прискореної втрати кісткової тканини, про що свідчить зниження мінеральної щільності кісткової тканини у хворих на рак, незалежно від його типу. Втрата кісткової маси у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями відображає як наслідки самого раку, так і скелетну відповідь на терапію, яка в даний час використовується для його лікування, включаючи широкий спектр таких хіміотерапевтичних засобів, як глюкокортикоїди, інгібітори ароматази (ШІ) та стероїдні антиандрогени [9].

Протипухлинна хіміотерапія є одним із основних методів лікування раку. Оскільки вона призначається курсами, на тривалий проміжок часу, то загоєння переломів кісток у онкологічних хворих часто протікає на фоні застосування протипухлинних хіміопрепаратів [10].

**Мета дослідження.** Вивчення морфологічних особливостей репаративного остеогенезу за умов впливу протипухлинної хіміотерапії

**Матеріал та методи дослідження.** Дослідження проведено на 96 білих лабораторних щурах-самцях 7-місячного віку вагою  $230 \pm 10$  гр. Упродовж всього терміну експерименту щури знаходились в умовах віварію Медичного інституту Сумського державного університету на стандартному раціоні та питному режимі з вільним доступом до їжі та води. Тварин утримували при стандартному світловому режимі (12 годин – день, 12 годин – ніч). Експеримент проведено відповідно до вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінки, 2000).

Усім тваринам в умовах стерильної операційної під кетаміновим наркозом (50мг/кг) наносився

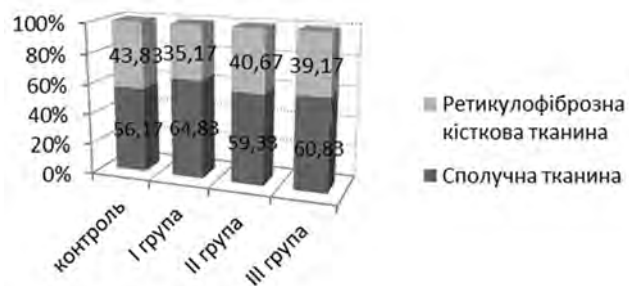
дірчастий дефект діаметром 2 мм шароподібною фрезою стоматологічного бору до кістково-мозкового каналу під охолодженням в ділянці середньої третини діяфіза стегнової кістки. Тварини були поділені на контрольну (n=24, без дії хіміопрепаратів) і три експериментальні групи (I, II, III, n=72), яким після нанесення травми та через кожну 21-у добу дослідження вводили внутрішньоочеревинно протипухлинні хіміопрепарати, що найчастіше застосовують у протоколах протипухлинної хіміотерапії: I-й групі (n=24) – доксорубіцин (60мг/м<sup>2</sup>), II-й (n=24) – 5-фторурацил (600мг/м<sup>2</sup>), III-й (n=24) – метотрексат (40мг/м<sup>2</sup>).

На 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після травми тварин контрольної та експериментальних груп виводили з експерименту шляхом декапітації під кетаміновим наркозом (100мг/кг) з наступним вилученням травмованих довгих трубчастих кісток.

Проводили дослідження гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином із наступною їх морфометрією, растрову електронну мікроскопію, визначення рівня макроелементів (кальцію, фосфору) методом рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії та маркерів кісткового метаболізму за допомогою імуногістохімічного дослідження.

Статистичний аналіз отриманих цифрових показників проводили за допомогою статистичної комп'ютерної програми МХ Ехсел ХР з використанням t-тесту Ст'юдента. Відмінності вважали значущими за  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** При проведенні гістологічного дослідження у тварин експериментальних груп на 15-ту добу експерименту в ділянці дефекту, у порівнянні з контролем, відмічається збільшення площі сполучної та зменшення ретикулофіброзної тканин. Так, площа останньої у I групі на 15,42% нижче показників контролю ( $p=0,006$ ), у II-на 5,63% ( $p=0,33$ ), у III-на 8,29% ( $p=0,04$ ) (рис. 1). Ретикулофіброзна тканина представлена дрібнопетлистими кістковими трабекулами. Новоутворені трабекули забарвлені нерівномірно та менш інтенсивно, порівняно з материнською кісткою, що вказує на початок осифікації.



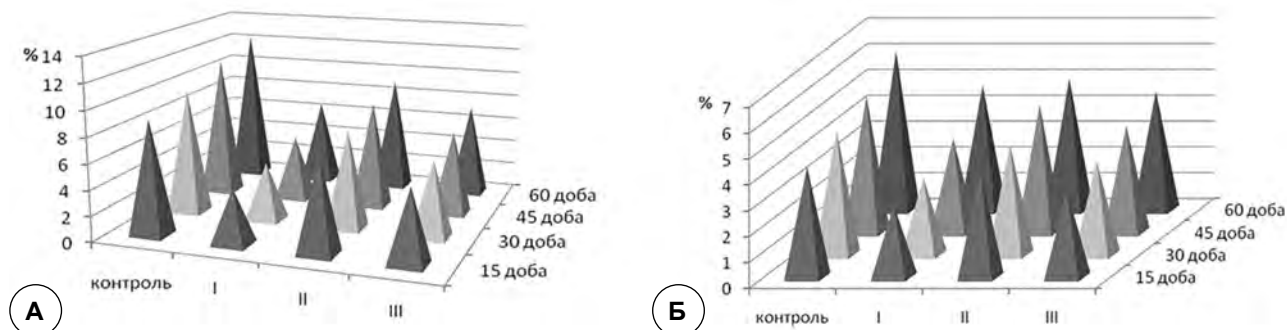
**Рис. 1** – Розподіл тканини у кістковому регенераті на 15-ту добу експерименту у контрольній та I, II III експериментальних групах

Міжтрабекулярний простір заповнений сполучною тканиною та кістковим мозком. У материнській кістці поряд зі збереженими клітинами розташовуються поодинокі порожні остеоцитарні лакуни. Краї материнської кістки мають ознаки резорбції. Межа між краями дефекту та регенератом чітко візуалізована.

На сканограмах в ділянці дефекту візуалізуються витончені новоутворені кісткові трабекули з гомогенними масами поміж них. Відмічається зростання площі міжбалочних просторів та відсутність тісних контактів між регенератом та материнською кісткою.

При проведенні зондового мікроаналізу встановлено, що в ділянці новоутвореного регенерату рівень Ca та P був нижчий за показники контролю у I групі на 52,17% ( $p < 0,005$ ) та 34,88% ( $p < 0,005$ )

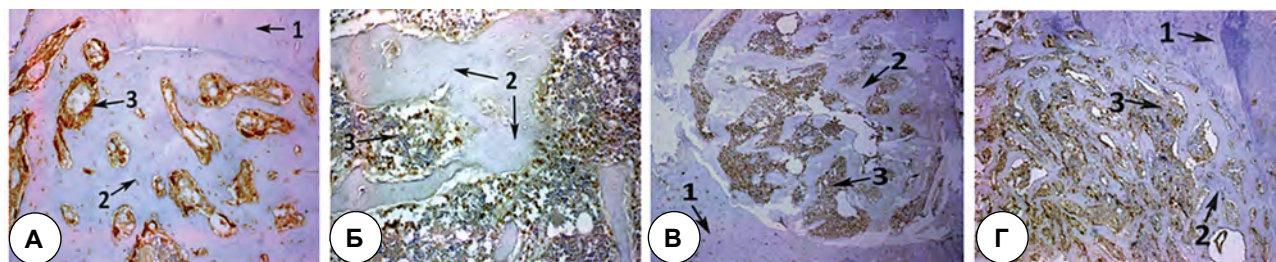
відповідно, у II групі – на 17,24% ( $p < 0,005$ ) та 3,48% ( $p = 0,15$ ), у III групі – на 36,04% ( $p < 0,005$ ) та 21,16% ( $p < 0,005$ ) (рис. 2). На поверхні материнської кістки відмічається зниження вмісту Ca та P у порівнянні з контролем у I групі на 14,79% ( $p < 0,005$ ) та 24,52% ( $p < 0,005$ ) відповідно, у II групі – на 18,52% ( $p < 0,005$ ) та 22,60% ( $p < 0,005$ ), у III групі – на 22,24% ( $p < 0,005$ ) та 13,64% ( $p < 0,005$ ). На межі регенерату та материнської кістки рівень даних макроелементів також є нижчим за показники контролю, що пов'язано з активацією процесів реорганізації в ділянці новоутвореного кісткового регенерату та використанням ендogenous Ca для його осифікації. Таким чином, отримані дані мікроаналізу в усіх експериментальних групах свідчать про зниження інтенсивності мінералізації як в регенераті, так і в материнській кістці у відповідь на травму.



**Рис. 2** – Динаміка змін показників рівня кальцію (А) та фосфору (Б) у кістковому регенераті у контрольній та експериментальних групах (I, II, III) протягом експерименту

Дослідження маркера кісткової резорбції катепсину К в ділянці регенерату у тварин контрольної групи свідчить про помірну проліферативну активність клітин (+++) імунопозитивних остеоцластів в межах  $31,00 \pm 1,26\%$ , що виражена в міжтрабекулярному просторі та ретикулофіброзній стромі. Інтенсивність забарвлення цитоплазми висока (+++). Клітини в ділянці материнської кістки експресують катепсин К лише в поодиноких клітинах (5%), що вказує на низьку проліферативну активність у цій ділянці. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин є помірною (++) (рис. 3).

У тварин експериментальних груп на 15-ту добу експерименту експресія катепсину К виражена наступним чином: у I групі маркер виявлявся у  $33,17 \pm 1,94\%$  клітин, у II-  $32,67 \pm 1,63\%$  клітин, у III-  $33,83 \pm 1,47\%$  клітин, що на 7,00% ( $p = 0,04$ ), 5,38% ( $p = 0,07$ ) та 9,13% ( $p = 0,005$ ) вище, ніж у контролі. Інтенсивність забарвлення цитоплазми висока (+++). Це свідчить про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату при дії протипухлинних хіміопрепаратів (рис. 3). При цьому, відмічається слабо виражена активність



**Рис. 3.** Експресія катепсину К у кістковому регенераті на 15-ту добу експерименту: А – у контролі, Б – при дії доксорубіцину; В – 5-фторурацилу, Г – метотрексату

**Примітки:** 1 – материнська кістка, 2 – кісткові балки, 3 – сполучна тканина.

маркера кісткоутворення остеопонтину у тварин експериментальних груп в ділянці регенерату у порівнянні з контролем (18,17±1,47%) і вона становить у I групі 14,17±1,17%, у II групі-15,83±1,17%, у III-14,83±1,17% (рис. 4), що на 22,01% (p=0,0003), 12,87% (p=0,01) та 18,38% (p=0,001) нижче показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин є низькою.

На 30-ту добу експерименту у регенераті тварин експериментальних груп, у порівнянні з контролем, відмічається збільшення площі сполучної та зменшення площі новоутвореної ретикулофіброзної тканини. Так, у I групі ретикулофіброзна тканина займає у дефекті 19,50±3,99%, у II групі-20,17±3,19%, у III-25,67±4,13% (рис. 4), що на 32,36% (p=0,002), на 30,04% (p=0,75) та на 10,96%, (p=0,21) нижче показників контролю. Вона представлена дрібнопетлистою сіткою витончених, хаотично розташованих трабекул. У міжтрабекулярних просторах збережені ділянки сполучної тканини, кровоносні судини та кістковий мозок. Навколо кровоносних судин, переважно на периферії регенерату, місцями спостерігається формування структур, подібних до остенів. Це свідчить про початок перебудови ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту, але темпи ремоделювання в регенераті сповільнені. Так, відмічається зменшення частки пластинчастої тканини у I групі 49,66% (p=0,0004), у II групі-26,25% (p=0,01), у III-38,30% (p=0,003) у порівнянні з контролем (рис. 4). Збері-

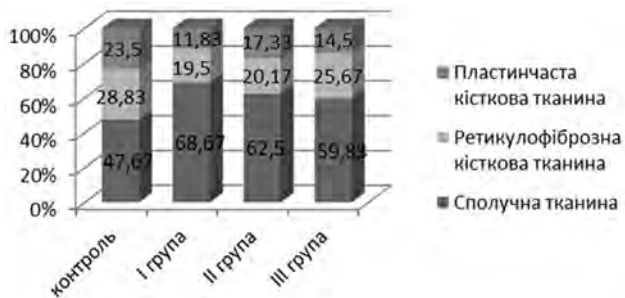


Рис. 4 – Розподіл тканини у кістковому регенераті на 30-ту добу експерименту у контрольній та I, II III експериментальних групах

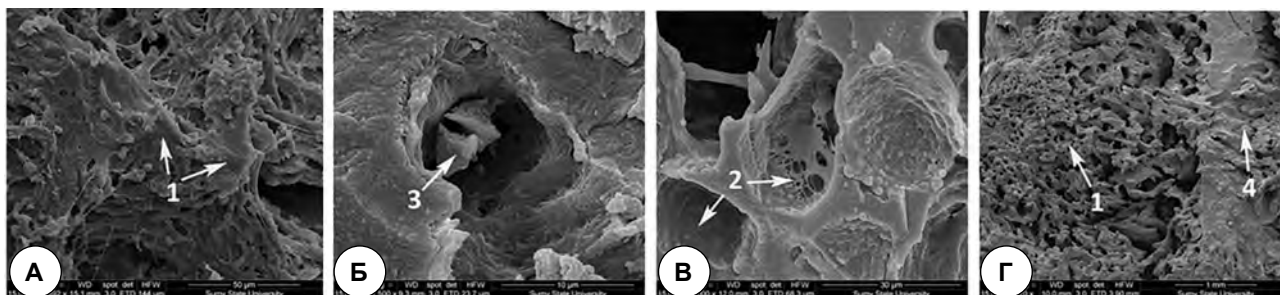


Рис. 5 – Сканограми кісткового регенерату на 30-ту добу експерименту у контрольній (А) та експериментальних (В-I група, С-II група, Д-III група) групах тварин

**Примітки:** 1-кісткові балки ретикулофіброзної кісткової тканини, 2-кісткова лакуна, 3-остеобласт у кістковій лакуні, 4-материнська кістка.

гається вільний простір між регенератом та материнською кісткою на відміну від контрольної групи, де відмічається формування ліній склеювання між зазначеними структурами травмованої кістки.

На електронограмах на 30-ту добу експерименту наявні зміни, що відповідають описаній гістологічній картині (рис. 5). У контрольній групі тварин більша частина ділянки дефекту заповнена сформованими кістковими балками. У центрі новоутвореного регенерату залишається сполучна тканина, в якій відмічається початок впорядкування колагенових волокон з послідуною їх трансформацією в остеїдні балки. У експериментальних груп тварин процеси ремоделювання кісткового регенерату сповільнені, що проявляється утворенням дрібнопетлястих кісткових трабекул, розташованих хаотично. У товщі новоутворених кісткових лакун розташовані поодинокі остеогенні клітини. По краях дефекту відмічається поява пластинчастої кісткової тканини, площа якої є значно меншою показників контрольної групи.

Зондовий мікроаналіз поверхні регенерату показав поступове зростання рівня Са та Р, але вони є меншими, ніж у контрольній групі. Так, показники Са та Р у I групі були нижчими на 53,90% (p<0,005) та 37,91% (p<0,005) відповідно за дані контролю, у II – на 21,78% (p<0,005) та 10,62% (p<0,005), у III – на 39,31% (p<0,005) та 23,96% (p<0,005). Зберігається тенденція до подальшого зниження рівня Са в материнській кістці у порівнянні з попереднім терміном експерименту: I група – на 3,06% (p<0,005), II – на 3,86% (p<0,005), III – на 3,87% (p<0,005), а також Р: I група – на 4,26% (p<0,005), II – на 5,05% (p<0,005), III – на 3,73% (p<0,005). Це свідчить про зниження ремоделюючої активності материнської кістки як компенсаторної реакції у відповідь на травму при дії протипухлинних хіміопрепаратів.

На 30-ту добу експерименту у контрольній групі тварин в ділянці регенерату експресія катепсину К виявлена у 28,50±1,87% остеогенних клітин, що на 8,06% (p=0,02) менше, ніж у попередній термін

експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми помірна (++)). Отримані дані вказують на зниження інтенсивності процесів резорбції в кістковому регенераті. Підвищена експресія катепсину К виражена переважно на периферії регенерату та в ділянках материнської кістки, що прилягають до нього. Однак, при дії протипухлинних хіміопрепаратів в регенераті відмічається, навпаки, зростання рівня експресії катепсину К. Так, на 30-ту добу експерименту експресія катепсину К у I групі становила  $31,17 \pm 1,47\%$ , у II -  $30,67 \pm 1,37\%$ , у III -  $31,67 \pm 1,75\%$ , що на  $9,37\%$  ( $p=0,02$ ),  $7,61\%$  ( $p=0,04$ ) та  $11,12\%$  ( $p=0,01$ ) вище показників контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишається високою (+++).

На 30-ту добу дослідження у контрольній групі відмічається збільшення експресії остеопонтину в межах  $20,83 \pm 1,17\%$  у порівнянні з попереднім терміном експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми низька (+). За нашими даними, це свідчить про початок мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в ділянці дефекту. Проте, в усіх експериментальних групах лише окремі кісткові клітини, розташовані переважно на периферії регенерату, виявляють імунореактивність. При цьому рівень експресії остеопонтину в ділянці регенерату становить у I групі  $17,33 \pm 1,21\%$ , у II групі -  $18,50 \pm 1,05\%$ , у III -  $17,50 \pm 1,05\%$ , що на  $16,80\%$  ( $p < 0,005$ ),  $11,19\%$  ( $p < 0,005$ ) та  $15,98\%$  ( $p < 0,005$ ) нижче показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми є низькою. Отримані рівні експресії катепсину К та остеопонтину вказують на активацію процесів резорбції та зниження кісткоутворення в регенераті, що призводить до порушення процесів ремоделювання та низької мінералізації новоутвореного органічного матриксу.

На 45-ту добу експерименту у тварин контрольної групи в ділянці регенерату відзначається подальше збільшення площі кісткової тканини в межах  $67,00 \pm 4,50\%$ . Новоутворена кісткова тканина представлена переважно пластинчастим типом ( $48,50 \pm 3,39\%$ ). Проте, у тварин експериментальних груп відмічається затримка формування регенерату, що проявляється порушенням тканинних співвідношень у зоні дефекту. Так, у I групі площа новоутвореної кісткової тканини становить  $47,50 \pm 3,63\%$ , у II групі -  $61,50 \pm 4,56\%$ , у III -  $45,33 \pm 4,01\%$ , що на  $29,10\%$  ( $p=0,05$ ),  $8,21\%$  ( $p=0,64$ ) та  $32,34\%$  ( $p=0,03$ ) нижче показників контролю (рис. 6). При цьому регенерат представлений переважно

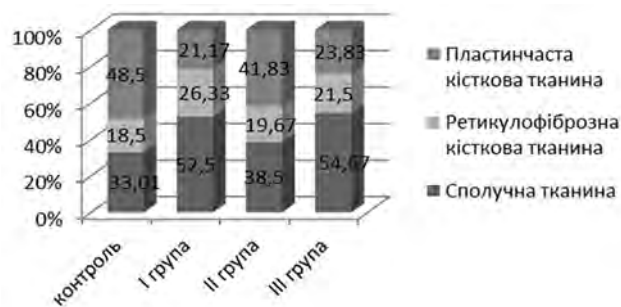


Рис. 6 – Розподіл тканини у кістковому регенераті на 45-ту добу експерименту у контрольній та I, II III експериментальних групах

дрібнопетлистими трабекулами з неоднорідно забарвленим матриксом. Більшість трабекул тонкі, зі щільними та тріщинами, розташовані в хаотичному порядку, без відповідності лініям навантаження. Відмічається затримка формування пластинчастої тканини, яка розташована переважно на периферії регенерату і представлена остеонами різного ступеня зрілості. На межі регенерату та материнської кістки місцями відмічається поява ліній з'єднань між ними, але їх формування є менш вираженим, ніж у контрольній групі (рис. 7).

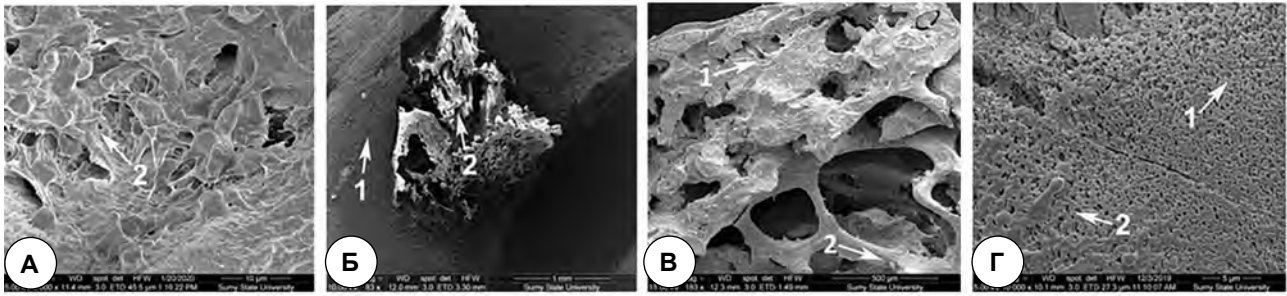
На 45-ту добу експерименту у тварин контрольної групи на сканограмах подальше ремоделювання кісткового матриксу супроводжується активними процесами мінералізації новоутвореного органічного матриксу, про що свідчить зростання рівнів Ca та P ( $11,2 \pm 0,21\%$  та  $5,3 \pm 0,18\%$ ) в ділянці дефекту на  $13,47\%$  ( $p < 0,005$ ) та  $10,42\%$  ( $p < 0,005$ ) більше, ніж у попередній термін експерименту. Відсутній вільний простір між материнською кісткою та регенератом за рахунок утворення між ними ліній склеювання.

Аналіз сканограм експериментальних груп тварин після триразового введення відповідних протипухлинних хіміопрепаратів (після нанесення травми, на 21-у та 42-у добу експерименту) показав затримку формування пластинчастої кісткової тканини у регенераті та низьку інтенсивність мінералізацію органічного матриксу (рис. 8). Про це свідчить зниження рівня Ca та P в ділянці дефекту у порівнянні з контролем: I група – на  $54,02\%$  ( $p < 0,005$ ) та  $31,13\%$  ( $p < 0,005$ ), II – на  $24,11\%$



Рис. 7 – Кістковий регенерат на 45-ту добу експерименту при дії: А-доксорубіцину, Б-5-фторурацилу, В-метотрексату. Зб. x100

Примітки: 1 – материнська кістка, 2 – кісткові балки, 3 – сполучна тканина.



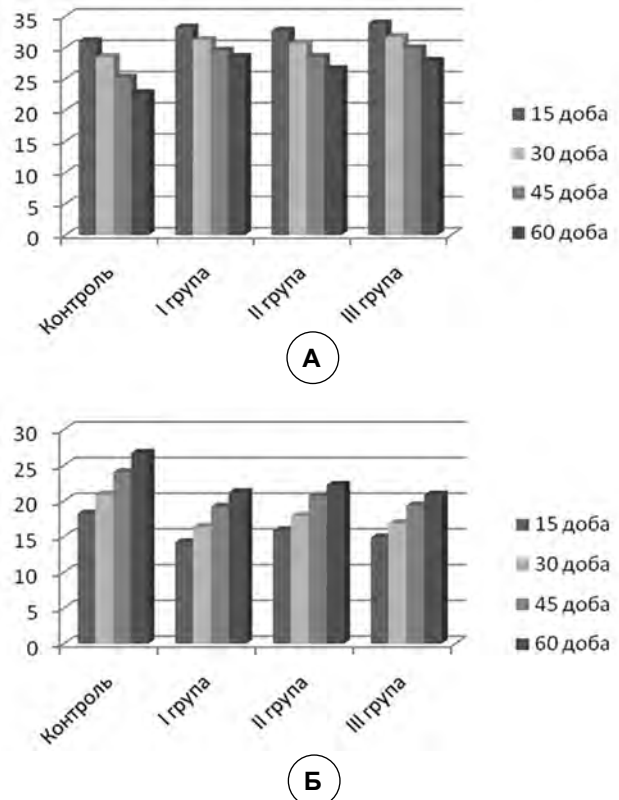
**Рис. 8** – Сканограми кісткового регенерату на 45-ту добу експерименту у контрольній (А) та I (Б), II (В), III (Г) експериментальних групах

**Примітки:** 1 - материнська кістка, 2 - кістковий регенерат.

( $p < 0,005$ ) та 6,60% ( $p < 0,005$ ), III – на 40,63% ( $p < 0,005$ ) та 21,87% ( $p < 0,005$ ). Незначне зниження рівня даних макроелементів відзначається в прилягаючих до кісткового дефекту ділянках та в материнській кістці, як у порівнянні з попереднім терміном, так і з контролем.

На 45-ту добу експерименту у контрольній групі встановлено подальше зниження експресії катепсину К. Він виявляється у 25,17±1,47% імунопозитивних клітин, що на 18,81% ( $p < 0,005$ ) менше, ніж на початку дослідження. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінюється як низька (+). При цьому показник експресії остеопонтину виявляється у 24,00±1,41% клітин, що на 13,21% ( $p = 0,002$ ) більше за попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми помірна. Отримані дані зниження активності експресії катепсину К та, навпаки, зростання експресії остеопонтину вказують на переваження процесів формування кісткової тканини в ділянці дефекту над процесами резорбції та зростання інтенсивності процесів мінералізації в регенераті.

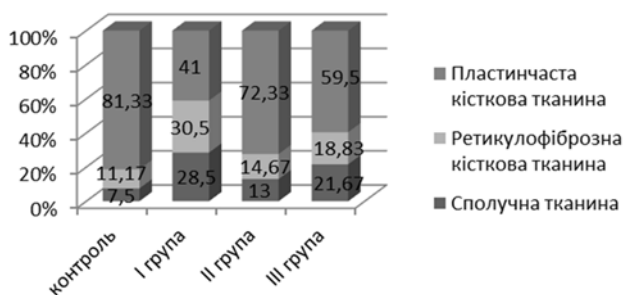
У тварин експериментальних груп на 45-ту добу експерименту маркер катепсину К виявляється в I групі у 29,50±1,87% клітин, у II групі-у 28,50±1,05%, у III-29,83±1,47%, що на 17,20% ( $p = 0,0012$ ), 13,23% ( $p = 0,0011$ ) та 18,50% ( $p = 0,0002$ ) вище показників контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів помірна (++) . При цьому, відзначається незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який у I групі виявляється у 19,17±1,47% клітин, у II групі- 21,67±1,21%, у III-19,33±1,63%, що на 14,81% ( $p = 0,003$ ), 13,74% ( $p = 0,002$ ) та 12,93% ( $p = 0,019$ ) більше, ніж на 30-ту добу після перелому та на 20,13% ( $p = 0,0001$ ), 13,87% ( $p = 0,0001$ ) та 19,46% ( $p = 0,0003$ ) менше, ніж у контрольній групі (рис. 9). Імунопозитивні клітини зосереджені переважно по краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми їх залишається низькою. Таким чином, у тварин експериментальних груп відзначається затримка формування кісткової мозолі та зниження її мінералізації.



**Рис. 9** - Динаміка змін рівня експресії катепсину К (А) та остеопонтину (Б) у контрольній та експериментальних (I, II, III) групах тварин протягом експерименту

60-та доба експерименту у тварин контрольної групи характеризується формуванням повноцінного кісткового регенерату, представленим кістковою тканиною площею 92,5±4,53%. Вона на 81,33±4,17% складається з пластинчастої кісткової тканини з остеонами різного ступеня зрілості та 11,17±4,17% ретикулофіброзної кісткової тканини. У експериментальних груп тварин в ділянці дефекту відзначається збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканин поряд з повільним формуванням пластинчастої кісткової тканини, розташованої переважно на периферії дефекту. Так, у I групі новоутворена кісткова тканина займає 71,50±4,52% площі регенерату, у

II групі -  $87,00 \pm 4,89\%$ , у III -  $78,33 \pm 3,54\%$ , що на  $22,70\%$  ( $p=0,34$ ),  $5,94\%$  ( $p=0,84$ ) та на  $15,31\%$  ( $p=0,57$ ) менше показників контрольної групи. При цьому, пластинчаста тканина становить у I групі  $41,00 \pm 3,46\%$  площі дефекту, у II групі -  $72,33 \pm 4,63\%$ , у III -  $59,50 \pm 3,27\%$ , що на  $49,59\%$  ( $p<0,0001$ ),  $11,07\%$  ( $p=0,008$ ) та  $26,84\%$  ( $p<0,0001$ ) нижче показників контролю. Між регенератом та материнською кісткою місцями помітний вільний простір з невеликою кількістю ділянок з'єднань між ними (рис. 10).



**Рис. 10** – Розподіл тканини у кістковому регенераті на 60-ту добу експерименту у контрольній та I, II, III експериментальних групах

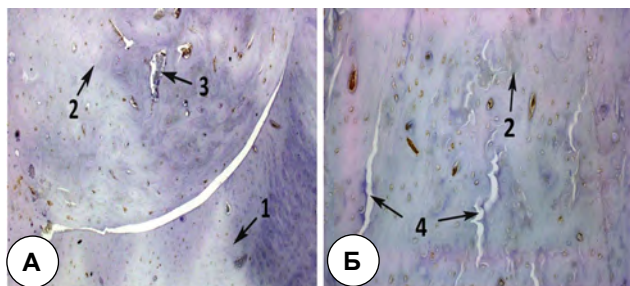
Отримані результати експерименту співпадають з висновками робіт Quach J.M. et al. (2015), які дослідили, що протипухлинна хіміотерапія призводить до втрати кісткової маси, зумовленої нездатністю остеобластів утворювати достатню кількість кісткової тканини, щоб компенсувати посилену остеокластичну резорбцію кістки [11]. Зокрема, Rana T. et al. (2013) в експерименті на мишах встановили, що лікування доксорубіцином збільшує циркулюючі рівні трансформуючого фактору росту бета (TGF $\beta$ ), який сприяє остеолітичному пошкодженню кісток [12]. Також Pountos I. et al. (2017) дослідили, що метотрексат у високих дозах, які призначають для лікування онкологічних захворювань, сповільнює загоєння перелому кісток шляхом пригнічення проліферації фібробластів та індукції їх апоптозу. Він також знижує вироблення колагену і одночасно збільшує рівні матричних металопротеїназ, що беруть участь у розщепленні позаклітинного матриксу. Проте, застосування низьких доз метотрексату при лікуванні ревматологічних та шкірних захворювань не має інгібуючого впливу на процеси репаративної регенерації [13].

На електронограмах на 60-ту добу експерименту у контрольній групі кістковий дефект представлений пластинчастою кістковою тканиною, яка щільно з'єднана з материнською кісткою. Рівень Ca та P в новоутвореному регенераті складає  $12,37 \pm 0,21\%$  та  $6,15 \pm 0,19\%$ , що на  $10,45\%$  ( $p<0,005$ ) та на  $16,04\%$  ( $p<0,005$ ) більше за попередній термін експерименту та на  $37,59\%$  ( $p<0,005$ ) та  $43,02\%$  ( $p<0,005$ ) більше, ніж на 15-ту добу дослідження. Це говорить про інтенсивну мінералізацію в кістковій мозолі. Відмічається подальше зростання рівня Ca в материнській кістці на  $3,73\%$  ( $p<0,005$ ) та на її межі з регенератом на  $2,89\%$  ( $p<0,005$ ), а також, в меншій мірі, P - відповідно на  $1,59\%$  ( $p=0,09$ ) та  $1,99\%$  ( $p=0,14$ ), що свідчить про виражену ремодельюючу активність в ділянках материнської кістки, що прилягають до дефекту.

Растрова електронна мікроскопія зразків експериментальних груп показала уповільнене формування пластинчастої тканини в регенераті, наявність ділянок витончених новоутворених кісткових балок, розривів між ними, зростання площі міжбалочних просторів та відсутність тісних контактів між регенератом та материнською кісткою. Це вказує на затримку утворення кісткової мозолі в ділянці дефекту при дії хіміопрепаратів. Спостерігається зростання вмісту мінеральних речовин на 60 добу з моменту травми, проте показники їх є нижчими, ніж у контролі. Так, у ділянці дефекту відмічається зниження Ca та P у I групі на  $45,68\%$  ( $p<0,005$ ) та  $21,46\%$  ( $p<0,005$ ) у порівнянні з контролем, у II – на  $26,03\%$  ( $p<0,005$ ) та  $17,07\%$  ( $p<0,005$ ), у III – на  $40,66\%$  ( $p<0,005$ ) та  $25,20\%$  ( $p<0,005$ ). У материнській кістці та ділянках, прилягаючих до регенерату, на відміну від попередніх термінів, відмічається поступове зростання рівня даних макроелементів у межах  $1-2\%$  ( $p<0,005$ ), але їх рівень є нижчим, ніж в контролі. Так, показники Ca та P в материнській кістці є нижчими за показники контролю на у I групі на  $15,60\%$  ( $p<0,005$ ) та  $18,58\%$  ( $p<0,005$ ), у II – на  $20,45\%$  ( $p<0,005$ ) та  $17,33\%$  ( $p<0,005$ ), у III – на  $22,24\%$  ( $p<0,005$ ) та  $14,59\%$  ( $p<0,005$ ). Отримані результати співпадають з даними досліджень Robin F. et al. (2021), в яких зазначено, що хіміотерапія метотрексатом негативно впливає на кістковий метаболізм, призводить до зменшення кількості остеобластів, остеоцитів та хондроцитів у ростовій пластинці та збільшення кількості та активності остеобластів, що супроводжується зниженням мінеральної щільності кісткової тканини [14].

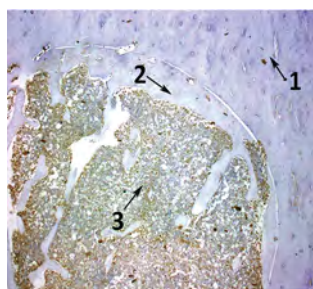
На 60-ту добу експерименту у тварин контрольної групи експресія катепсину К спостерігається у  $22,67 \pm 1,63\%$  клітин кісткового регенерату, що на  $9,93\%$  менше ( $p=0,02$ ), ніж у попередній термін експерименту та на  $26,84\%$  менше ( $p<0,005$ ), ніж на 15 добу після перелому. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінюється як низька (+). Це свідчить про активацію процесів проліферації в новоутвореному регенераті (рис. 11). Поряд з цим, відмічається подальше зростання експресії остеопонтину у регенераті на рівні  $26,67 \pm 1,21\%$  клітин, що на  $11,12\%$  ( $p=0,006$ ) більше за попередній термін експерименту та на  $46,78\%$  ( $p<0,005$ ) більше, ніж на початку експерименту. Отримані дані є підтвердженням подальшої активної мінералізації органічного матриксу у кістковій мозолі (рис. 12).

Отримані результати експерименту співпадають з висновками робіт Quach J.M. et al. (2015), які дослідили, що протипухлинна хіміотерапія призводить до втрати кісткової маси, зумовленої нездатністю остеобластів утворювати достатню кількість кісткової тканини, щоб компенсувати посилену остеокластичну резорбцію кістки [11]. Зокрема, Rana T. et al. (2013) в експерименті на мишах встановили, що лікування доксорубіцином збільшує циркулюючі рівні трансформуючого фактору росту бета (TGF $\beta$ ), який сприяє остеолітичному пошкодженню кісток [12]. Також Pountos I. et al. (2017) дослідили, що метотрексат у високих дозах, які призначають для лікування онкологічних захворювань, сповільнює загоєння перелому кісток шляхом пригнічення проліферації фібробластів та індукції їх апоптозу. Він також знижує вироблення колагену і одночасно збільшує рівні матричних металопротеїназ, що беруть участь у розщепленні позаклітинного матриксу. Проте, застосування низьких доз метотрексату при лікуванні ревматологічних та шкірних захворювань не має інгібуючого впливу на процеси репаративної регенерації [13].



**Рис. 11** – Експресія катепсину К у кістковому регенераті на 60-ту добу експерименту при застосуванні: А-5-фторурацилу (II група), Б-метотрексату (III група). Зб. x100

**Примітки:** 1 – материнська кістка, 2 – кістковий регенерат, 3 – сполучна тканина, 4 – мікротріщини



**Рис. 12** – Експресія остеопонтину в кістковому регенераті на 60-ту добу експерименту при застосуванні доксорубіцину (I група). Зб. x100

**Примітки:** 1 – материнська кістка, 2 – кістковий регенерат, 3 – сполучна тканина

У тварин експериментальних груп на 60-ту добу експерименту експресія катепсину К у I групі становить  $28,50 \pm 1,87\%$  імунопозитивних клітин, у II групі  $26,67 \pm 1,63\%$ , у III  $27,83 \pm 1,17\%$ . Інтенсивність забарвлення цитоплазми помірна (++) . Відмічається зниження активності цього маркера у порівнянні з попереднім терміном дослідження в усіх експериментальних групах, але його рівень експресії є вищим, ніж у контролі на  $25,72\%$  ( $p < 0,005$ ),  $17,64\%$  ( $p < 0,005$ ) та  $22,76\%$  ( $p < 0,005$ ) відповідно, що говорить про посилену резорбцію кісткової тканини в ділянці регенерату при дії хіміопрепаратів. Це відповідає даним Raghunathan R. et al. (2012), який дослідив, що лікування 5-фторурацилом спричиняє експресію цитокіну фактору некрозу пухлин-альфа (TNF $\alpha$ ), який активує рецептор маркера остеокластів ядерний фактор NF- $\kappa$ B і стимулює тим самим остеокластогенез, що призводить до посиленої втрати кісткової тканини при проведенні хіміотерапії [15].

Поряд із цим, встановлено зростання рівня експресії остеопонтину. Так, експресія остео-

понтину у I групі становить  $21,17 \pm 1,47\%$ , у II групі  $22,17 \pm 1,47\%$ , у III  $20,83 \pm 1,17\%$ . Проте це відповідно на  $20,62\%$  ( $p < 0,005$ ),  $18,87\%$  ( $p < 0,005$ ) та  $21,89\%$  ( $p < 0,005$ ) нижче даних контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунореактивних клітин визначається як помірна. Отримані дані співпадають з результатами досліджень Fan C., Georgiou K.R. (2017), в яких встановлено, що хіміотерапія доксорубіцином спричиняє зменшення утворення кісткової маси внаслідок пригнічення проліферації, диференціювання та мінералізації остеобластів і стимулює опосередковану остеокластами резорбцію кісткової тканини [16].

**Висновки.** Застосування протипухлинних хіміопрепаратів викликає затримку формування кісткової мозолі, що проявляється у вигляді зниження темпів диференціювання тканин в ділянці дефекту. Про це свідчить збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканини в регенераті поряд із повільним формуванням пластинчастої кісткової тканини. Зміни в мікроархітектурі у ділянці дефекту характеризуються хаотичним розташуванням витончених новоутворених кісткових трабекул, наявністю тріщин та розривів між ними, а також вільного простору між материнською кісткою та регенератом, низькими темпами утворення ліній склеювання між ними.

Проведення протипухлинної хіміотерапії призводить до порушень фосфорно-кальцієвого обміну як у самому регенераті, так і в материнській кістці. Це проявляється зниженням інтенсивності мінералізації новоутвореного кісткового матриксу та сповільнення ремодельючої активності материнської кістки.

Протипухлинні хіміопрепарати викликають зростання рівня експресії маркера резорбції кісткової тканини катепсину К та зниження експресії маркера кісткоутворення остеопонтину, що спричиняє затримку формування регенерату в ділянці травми та знижує темпи репаративної регенерації.

Найбільш виражена затримка процесів ремодельювання кісткового регенерату відзначена у випадках застосування доксорубіцину та метотрексату, в той час як 5-фторурацил виявив менший інгібуючий вплив на зазначені процеси.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальшому планується вивчити залежність змін тривісних властивостей кісток від порушень мінерального обміну при застосуванні різних груп протипухлинних хіміопрепаратів.

## References

- Whitburn J, Edwards CM. Metabolism in the Tumour-Bone Microenvironment. *Curr Osteoporos Rep*. 2021; 2021: 1-6. PMID: 34319488. doi: 10.1007/s11914-021-00695-7



2. Tsuzuki S, Park SH, Eber MR, Peters CM, Shiozawa Y. Skeletal complications in cancer patients with bone metastases. *Int J Urol*. 2016; 23(10): 825-832. PMID: 27488133. PMCID: PMC5718365. doi: 10.1111/iju.13170
3. Fornetti J, Welm AL, Stewart SA. Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *J Bone Miner Res*. 2018; 33(12): 2099-2113. PMID: 30476357. doi:10.1002/jbmr.3618
4. Willeumier JJ, van der Linden YM, van de Sande MAJ, Dijkstra PDS. Treatment of pathological fractures of the long bones. *EFORT Open Rev*. 2016; 1(5): 136-145. PMID: 28461940. PMCID: PMC5367617. doi: 10.1302/2058-5241.1.000008
5. Kimura T. Multidisciplinary Approach for Bone Metastasis: A Review. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(6): 156. PMID: 29795015. PMCID: PMC6025143. doi: 10.3390/cancers10060156
6. Shupp AB, Kolb AD, Mukhopadhyay D, Bussard KM. Cancer metastases to bone: concepts, mechanisms, and interactions with bone osteoblasts. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(6): 182. PMID: 29867053. PMCID: PMC6025347. doi: 10.3390/cancers10060182
7. Rachner TD, Hofbauer LC, Göbel A. Bone Metabolism. In: *Cancer. Central Nervous System Metastases*. Springer, Cham; 2020. p. 503-511. doi: 10.1007/978-3-030-42958-4\_36
8. Saad F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer*. 2007; 110(8): 1860-1867. doi: 10.1002/cncr.22991
9. Bedatsova L, Drake MT. The skeletal impact of cancer therapies. *Br J Clin Pharmacol*. 2019; 85(6): 1161-1168. PMID: 30723928. PMCID: PMC6533456. doi: 10.1111/bcp.13866
10. Rosen H.N. Drugs that affect bone metabolism. 2016. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/drugs-that-affect-bone-metabolism>
11. Quach JM, Askmyr M, Jovic T, Baker EK, Walsh NC, Harrison SJ, et al. Myelosuppressive therapies significantly increase pro-inflammatory cytokines and directly cause bone loss. *J Bone Miner Res*. 2015; 30(5): 886-897. PMID: 25418357. doi: 10.1002/jbmr.2415
12. Rana T, Chakrabarti A, Freeman M, Biswas S. Doxorubicin-Mediated Bone Loss in Breast Cancer Bone Metastases Is Driven by an Interplay between Oxidative Stress and Induction of TGF $\beta$ . *PLoS ONE*. 2013; 8(10): 78043. PMID: 24205081. PMCID: PMC3813496. doi: 10.1371/journal.pone.0078043
13. Pountos I, Giannoudis PV. Effect of methotrexate on bone and wound healing. *Expert Opin Drug Saf*. 2017; 16(5): 535-545. PMID: 28332422. doi: 10.1080/14740338.2017.1310839
14. Robin F, Cadiou S, Albert JD, Bart G, Coiffier G, Guggenbuhl P. Methotrexate osteopathy: five cases and systematic literature review. *Osteoporos Int*. 2021; 32: 225-232. PMID: 33128074. doi: 10.1007/s00198-020-05664-x
15. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012; 302(11): 1440-9. PMID: 22436700. doi: 10.1152/ajpendo.00587.2011
16. Fan C, Georgiou KR, Morris HA, McKinnon RA, Keefe DMK, Howe PR, et al. Combination breast cancer chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide damages bone and bone marrow in a female rat model. *Breast Cancer Res Treat*. 2017; 165: 41-51. PMID: 28550626. doi: 10.1007/s10549-017-4308-3

УДК 616.71-001.5-006-092.9-085.277.3

### МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

**Рябенко Т. В., Кореньков А. В., Ковалюк Т. М.**

**Резюме.** Цель - изучение морфологических особенностей репаративного остеогенеза под влиянием противоопухолевой химиотерапии.

**Материал и методы.** Исследование выполнено на 96 белых лабораторных крысах-самцах в возрасте 7 месяцев массой 230±10 г. Всем животным наносился дырчатый дефект шаровидной фрезой диаметром 2 мм до костномозгового канала в средней трети диафиза бедренной кости. Животные были разделены на контрольную (n = 24, без химиотерапии) и три экспериментальные группы (I, II, III, n=72), которым после травмы и каждые 21-й день эксперимента вводили внутривентриально соответствующие химиопрепараты: I-й группе (n=24) - доксорубин (60 мг/м<sup>2</sup>), II-й (n=24) - 5-фторурацил (600 мг / м<sup>2</sup>), III-й (n=24) - метотрексат (40 мг/м<sup>2</sup>). На 15-е, 30-е, 45-е, 60-е сутки после травмы животных выводили из эксперимента с последующим извлечением травмированных длинных трубчатых костей.

Проведено изучение гистологических препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином, их морфометрия, сканирующая электронная микроскопия с методом рентгеновской энергодисперсионной спектроскопии, иммуногистохимические исследования.

**Результаты.** Противоопухолевые химиопрепараты вызывают замедленное образование костной мозоли, что проявляется увеличением площади соединительной и ретикулофиброзной костной ткани

в регенерате, а также замедленным образованием пластинчатой костной ткани. Химиотерапия приводит к нарушению фосфорно-кальциевого обмена как в регенерате, так и в материнской кости в виде снижения интенсивности минерализации новообразованного костного матрикса и замедления remodelирующей активности материнской кости. Противоопухолевые химиопрепараты вызывают увеличение экспрессии маркера резорбции костной ткани катепсина К и снижение экспрессии маркера костеобразования остеопонтина, что свидетельствует о задержке формирования регенерата в области повреждения кости и снижении активности процессов репаративной регенерации.

**Выводы.** Наиболее выраженное снижение интенсивности процессов remodelирования костного регенерата было установлено при применении доxorубина и метотрексата, тогда как 5-фторурацил оказывал менее угнетающее действие на заживление перелома.

**Ключевые слова:** костный регенерат, противоопухолевые химиопрепараты, морфометрия, сканирующая микроскопия, спектральный анализ, иммуногистохимия.

UDC 616.71-001.5-006-092.9-085.277.3

### **Morphological Aspects of Reparative Bone Tissue Regeneration under the Influence of Antitumor Chemotherapy**

**Riabenko T. V., Korenkov O. V., Kovaliuk T. M.**

**Abstract.** The occurrence of fractures in the development of cancer in the body is due to changes in bone metabolism in the form of osteoporosis and metastatic bone damage. Their appearance leads to the postponement or cessation of treatment of cancer, which affects the life expectancy of such patients and the chances of recovery. Antitumor chemotherapy, as one of the main methods of cancer treatment, is prescribed for long-term courses and affects the healing of fractures. However, according to the literature, the effect of antitumor chemotherapeutics on reparative regeneration is poorly understood today.

*The purpose of the work* is to study the morphological features of reparative osteogenesis under the influence of antitumor chemotherapy.

*Materials and methods.* The study was performed on 96 white laboratory male rats 7 months of age weighing  $230 \pm 10$  g. All animals had a perforated defect with a diameter of 2 mm spherical cutter to the bone marrow canal in the middle third of the femoral shaft. Animals were divided into control ( $n = 24$ , without chemotherapy) and three experimental groups (I, II, III,  $n = 72$ ), which after injury and every 21 days of the study were administered intraperitoneal anticancer chemotherapeutics: I ( $n = 24$ ) – doxorubicin ( $60 \text{ mg} / \text{m}^2$ ), II ( $n = 24$ ) – 5-fluorouracil ( $600 \text{ mg} / \text{m}^2$ ), III ( $n = 24$ ) – methotrexate ( $40 \text{ mg} / \text{m}^2$ ). On the 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 45<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> days after injury, the animals were removed from the experiment, followed by removal of the injured long tubular bones.

Histological preparations stained with hematoxylin-eosin, followed by their morphometry, scanning electron microscopy with the method of X-ray energy dispersion spectroscopy, immunohistochemical examination were performed.

*Results and discussion.* Antitumor chemotherapeutics causes delayed callus formation, which is manifested by an increase in the area of connective and reticulofibrous bone tissue in the regenerate, along with the slow formation of lamellar bone tissue. Chemotherapy leads to disorders of phosphorus-calcium metabolism both in the regenerate and in the maternal bone in the form of reducing the intensity of mineralization of the newly formed bone matrix and slowing down the remodeling activity of the maternal bone. Chemotherapy is accompanied by an increase in the expression of the bone resorption marker cathepsin K and a decrease in the expression of the osteopontin bone marker, which indicates a delay in the formation of regenerate in the area of injury and a decrease in the rate of reparative regeneration.

*Conclusion.* The most pronounced delay in the processes of remodeling of bone regenerate was found with the use of doxorubicin and methotrexate, while 5-fluorouracil showed less inhibitory effect on these processes.

**Keywords:** bone regenerate, antitumor chemotherapeutics, morphometry, scanning microscopy, spectral analysis, immunohistochemistry.

#### **ORCID and contributionship:**

Tetiana V. Riabenko :0000-0003-2740-389X <sup>A,B,D,E</sup>

Oleksii V. Korenkov : 0000-0002-1314-5642 <sup>C</sup>

Tetiana M. Kovaliuk : 0000-0002-7072-128X <sup>F</sup>

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,

C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,

E – Critical review, F – Final approval of the article

**CORRESPONDING AUTHOR**

**TetianaV. Riabenko**

Sumy State University, Medical Institute,

Human Anatomy Department

31, Sanatorna St., Sumy 40018, Ukraine

tel: +380669362214, e-mail: t.riabenko@med.sumdu.edu.ua

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 11.08.2021 р.

*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*