

Zmiany w kości długiej w nowym eksperymentalnym modelu *osteomyelitis aseptica chronica* u szczurów

Changes in the long bone in the new experimental model of osteomyelitis aseptica chronica in rats

Ilona Kaczmarczyk-Sedlak

Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Farmaceutyczny, Śląska Akademia Medyczna w Sosnowcu, kierownik Katedry i Zakładu prof. dr hab. med. Waldemar Janiec

Słowa kluczowe: *osteomyelitis*, szczur, zapalenie kości, zapalenie szpiku kostnego.

Key words: osteomyelitis, rat, bone inflammation, marrow cavity inflammation.

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu nowego modelu przewlekłego jałowego stanu zapalnego kości i jamy szpikowej (*osteomyelitis aseptica chronica*) na zmiany morfometryczne w kościach oraz na parametry hematologiczne szpiku kostnego u szczurów.

Badania przeprowadzono na szczurach – samcach szczepu Wistar, które podzielono na 4 grupy. W dwóch grupach u szczurów wywołano *osteomyelitis* w kości udowej prawej (3 lub 6 tyg.), odpowiednie dwie grupy były grupami kontrolnymi.

W nowym eksperymentalnym modelu *osteomyelitis* u szczurów wywołano w wyniku wprowadzenia do jamy szpikowej kości udowej implantu jałowej nitki bawełnianej na 3 lub 6 tyg. Wykonano pomiary makrometryczne wyizolowanych kości udowych i kości piszczelowej (masy, długości, średnicy trzonu i nasady) oraz pomiary histometryczne wyizolowanych kości udowych (powierzchni przekroju poprzecznego trzonu i jamy szpikowej, przyrostu na grubość, grubości osteoidu, grubości beleczek kostnych nasady, szerokości chrząstki nasadowej). Wykonano również badania hematologiczne szpiku kostnego i krwi obwodowej.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zastosowanie implantu jałowej nitki bawełnianej do jamy szpikowej kości długiej u szczurów na 6 tyg. powoduje wystąpienie *osteomyelitis aseptica chronica*. Charakteryzuje się ona zmniejszeniem zawartości komórek układu erytroblastycznego oraz zwiększeniem zawartości komórek układu mieloblastycznego, układu limfoblastycznego i układu siateczkowo-śródbłonkowego w szpiku kostnym kości zawierającej implant. Stwierdzono także zwiększenie

Summary

The aim of the present study was to investigate the new model of *osteomyelitis aseptica chronica* on the morphometry of the bone and haematological parameters in rats.

The experiment was carried out on male Wistar rats divided into 2 groups in which osteomyelitis was induced (3 or 6 weeks) and 2 respective control groups. The *osteomyelitis* was induced using the implant of an aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity of the femur of rats. After 3 or 6 weeks of the experiment, the animals were killed. The macrometric parameters (mass, length, diameter of the diaphysis and epiphysis) and histomorphometric parameters of the femur (transverse cross-sectional area of the diaphysis and of the marrow cavity, transverse growth, width of the osteoid, width of the trabeculae in the epiphysis, and width of the epiphyseal cartilage) were studied. Haematological investigation of the blood and marrow was also carried out.

The applied experimental model may be used to induce *osteomyelitis aseptica chronica* (6 weeks). A decrease in the number of erythroblastic system cells and increases in the number of myeloblastic, lymphoblastic and reticular-endothelial system cells of the bone marrow of the bone containing the implant were observed. Also, an increase in the transverse cross-sectional area of the diaphysis and a decrease in the transverse cross-sectional area of the marrow cavity, increases in the endosteal and periosteal transverse growth, an increase in bone mass and deformation of the bone containing the implant were observed.

Adres do korespondencji:

dr n. farm. Ilona Kaczmarczyk-Sedlak, Katedra i Zakład Farmakologii, Wydział Farmaceutyczny, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, tel./faks +48 32 292 36 93, e-mail: farmak@slam.katowice.pl

Praca wpłynęła: 15.03.2006 r.

powierzchni przekroju poprzecznego trzonu i zmniejszenie powierzchni przekroju poprzecznego jamy szpikowej, zwiększenie przyrostu zewnętrznego i wewnętrznego na grubość, zwiększenie masy oraz deformację kształtu kości zawierającej implant.

Wstęp i cel pracy

Podstawowa eksperymentalna metoda wywołania stanu zapalnego kości i szpiku kostnego (*osteomyelitis*) polega na wprowadzeniu bakterii do organizmu zwierzęcia, najczęściej bezpośrednio do jamy szpikowej kości [1–6]. Jednak metoda ta nie może być wykorzystana w celu oceny zmian w tkance kostnej i szpiku kostnym w wypadkach jałowego *osteomyelitis*, które u ludzi występuje jako powikłanie powtarzających się urazów kości, szkodliwego wpływu promieni jonizujących albo zatrucia fosforem.

Od niedawna próbuje się również wykorzystać do badań myszy CMO (*chronic multifocal osteomyelitis*) z uwarunkowanym genetycznie przewlekłym nawracającym wieloogniskowym zapaleniem kości i szpiku kostnego [7]. Zmiany w tkance kostnej u myszy CMO wymagają obecnie dalszych badań, ponieważ nie udowodniono jednoznacznie, czy odpowiadają one *osteomyelitis* obserwowanemu u ludzi.

Dotychczas znane metody badania *osteomyelitis* u zwierząt mają ww. ograniczenia metodyczne, dlatego autorka niniejszej pracy założyła opracowanie nowego modelu eksperymentalnego. W tym celu wykorzystano metodę wywołania stanu zapalnego, opisaną przez Meiera i wsp., w modyfikacji własnej. Metoda opracowana przez Meiera i wsp. polegała na wprowadzeniu do tkanki podskórnej implantu jałowej peletki bawełnianej w celu wywołania stanu zapalnego w tej tkance [8]. Modyfikacja własna autorki to zastosowanie jałowej peletki bawełnianej nie w tkance podskórnej, lecz w jamie szpikowej kości długiej, w celu doprowadzenia do stanu zapalnego kości i jamy szpikowej [9]. Mimo że w wyniku implantacji peletki uzyskano *osteomyelitis*, autorka stwierdziła, że ujemną stroną tej metody jest fakt zatkania jamy szpikowej przez peletkę. Z tego powodu w dalszych etapach badań autorka udoskonaliła metodę i zamiast peletki w jamie szpikowej kości udowej zastosowała implant jałowej nitki bawełnianej. Nitka była przeciągnięta przez całą długość kości, a drożność jamy szpikowej została zachowana. Dzięki zastosowaniu u szczurów przez tydzień nitki jako implantu uzyskano zmiany w tkance kostnej oraz zmiany hematologiczne szpiku kostnego, które świadczyły o toczącym się ostrym stanie zapalnym kości i szpiku kostnego (*osteomyelitis aseptica acuta*) [10]. Autorka założyła więc, że model eksperymentalny z zastosowaniem nitki może

być pomocny w ocenie patofizjologii *osteomyelitis* oraz może przyczynić się do opracowania właściwej farmakoterapii tego procesu chorobowego.

Opierając się na wynikach uzyskanych w ww. modelu *osteomyelitis aseptica acuta*, w niniejszej pracy zastosowano implant jałowej nitki bawełnianej w jamie szpikowej kości udowej przez okres dłuższy, a więc przez 3 i 6 tyg., w celu wywołania **przewlekłego** jałowego zapalenia kości i jamy szpikowej – *osteomyelitis aseptica chronica*.

Materiał i metody

Badania zostały wykonane na szczurach za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Katowicach (nr zezwolenia 8/03), zgodnie z obowiązującymi standardami bioetycznymi.

Badania przeprowadzono na szczurach samcach szczepu Wistar (260–270 g), które podzielono na 4 grupy:

- I Grupa K-3 (n=6) – szczury kontrolne w eksperymencie 3-tygodniowym, u których wykonano zabieg pozorny.
- II Grupa K-6 (n=6) – szczury kontrolne w eksperymencie 6-tygodniowym, u których wykonano zabieg pozorny.
- III Grupa B-3 (n=6-8) – szczury, u których dokonano implantacji jałowej nitki bawełnianej do jamy szpikowej kości udowej prawej na 3 tyg.
- IV Grupa B-6 (n=6-8) – szczury, u których dokonano implantacji jałowej nitki bawełnianej do jamy szpikowej kości udowej prawej na 6 tyg.

Wykonanie zabiegu implantacji jałowej nitki bawełnianej do jamy szpikowej kości udowej u szczurów

W celu wywołania jałowego stanu zapalnego jamy szpikowej zastosowano metodę opisaną przez Meiera i wsp. [8], w modyfikacji własnej [10]. Meier i wsp. stosowali implant jałowej peletki bawełnianej w celu wywołania jałowego stanu zapalnego w tkance podskórnej, natomiast modyfikacja własna polegała na zastosowaniu jałowej nitki bawełnianej w jamie szpikowej kości długiej. U szczurów grup B-3 i B-6, uśpionych metoheksytalem (100 mg/kg m.c. *i.p.*) w celu implantacji jałowej nitki bawełnianej, odślaniano trzon kości udowej prawej i na powierzchni bocznej przylegającej do mięśnia prostownika wywiercano 2 otwory o średnicy 1,4 mm (pierwszy w okolicy nasady bliższej, pomiędzy kręta-

rzem mniejszym a krętarzem trzecim; drugi otwór w okolicy nasady dalszej). Nitka o długości 2 cm była przeciągnięta pomiędzy otworami w jamie szpikowej kości udowej. Następnie otwory w trzonie kości udowej zostały wypełnione cementem fosforanowym, a mięśnie i skóra zwierzęcia zostały zszyte.

Aby zachować podobne warunki narkozy i inwazji do jamy szpikowej, u zwierząt z grup kontrolnych K-3 i K-6 przeprowadzono pozorny zabieg, polegający na odstąpieniu trzonu kości udowej prawej, wywierceniu otworów (bez wprowadzania nitki), a następnie wypełnieniu otworów cementem fosforanowym i zszyciu mięśni i skóry.

Po 3 (grupa K-3 i B-3) lub 6 tyg. (grupa K-6 lub B-6) od wykonania zabiegu operacyjnego zwierzęta wykorzystano do:

- 1) badania przyrostu masy ciała oraz masy śledziony i grasicy,
- 2) badań hematologicznych krwi obwodowej i szpiku kostnego,
- 3) badań morfometrycznych kości.

Badania hematologiczne krwi obwodowej

Bezpośrednio przed wykonaniem zabiegu operacyjnego na kości oraz 3 lub 6 tyg. po zabiegu operacyjnym na kości udowej prawej we wszystkich grupach pobierano krew z ogona zwierząt i wykonano następujące oznaczenia hematologiczne: liczby krwinek czerwonych, liczby krwinek białych, wskaźnika hematokrytu, ilości hemoglobiny oraz wyznaczono procentową zawartość krwinek białych w rozmazie krwi obwodowej. Rozmaz krwi obwodowej był barwiony metodą May, Grünwalda i Giemsa (MGG).

Badania hematologiczne szpiku kostnego

Po 3 lub 6 tyg. od wykonania zabiegu operacyjnego na kości udowej prawej, po uprzednim uśpieniu zwierząt, odstawiano trzon kości udowej prawej i trzon kości udowej lewej, a następnie wykonano w nich otwór wg metody opisanej powyżej (u szczurów grup B-3 i B-6 dodatkowo wyciągnięto nitkę). Po sporządzeniu rozmazu szpiku kostnego wyznaczono jego procentowy wzór leukocytar-ny. Rozmaz szpiku kostnego był barwiony metodą MGG.

Badania morfometryczne kości

Po uśmierceniu zwierząt w grupie K-3 i K-6 izolowano kości udowe prawe (pozornie operowane) i lewe (nieoperowane), a w grupach B-3 i B-6 kości udowe prawe (które przed zabiciem zwierząt zawierały implant) oraz kości udowe lewe (nieoperowane). We wszystkich grupach zwierząt wypreparowano również kości piszczelowe prawe. Pomiaru makrometryczne kości obejmowały oznaczenia: masy kości udowych i kości piszczelowej, długo-

ści kości udowych i kości piszczelowej, średnicy trzonu kości udowych i kości piszczelowej (mierzonej w płaszczyźnie czołowej i w płaszczyźnie strzałkowej w połowie długości kości), średnicy nasady dalszej kości udowych (mierzonej w płaszczyźnie czołowej i w płaszczyźnie strzałkowej), średnicy nasady bliższej kości piszczelowej (mierzonej w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej).

Kości udowe zostały wykorzystane również do sporządzenia preparatów histologicznych. Uzyskane skrawki preparatów histologicznych, po oszlifowaniu i utrwaleniu w 99,8% alkoholu etylowym, barwiono metodą Tripp i MacKaya [11], stosując zmodyfikowane czasy barwienia.

Preparaty przekroju poprzecznego (prostopadłe do osi długiej kości) uzyskano z 3 miejsc kości udowej: od strony nasady bliższej, w połowie długości kości i od strony nasady dalszej [10]. Pomiaru histometryczne przekroju poprzecznego kości udowych obejmowały oznaczenia: pola całkowitej powierzchni trzonu oraz powierzchni jamy szpikowej kości, grubości osteoidu zewnętrznego (od strony *periosteum*) i wewnętrznego (od strony *endosteum*) kości oraz przyrostu zewnętrznego (od strony *periosteum*) i wewnętrznego (od strony *endosteum*) na grubość kości z wykorzystaniem metody tetracyklinowej [12]. W tym celu 24 godz. przed rozpoczęciem eksperymentu i 24 godz. przed zakończeniem badań podawano chlorowodurek tetracykliny w dawce 20 mg/kg m.c. *i.p.* Tetracyklina jest markerem w badaniach histomorfometrycznych przyrostu kości.

W preparacie przekroju podłużnego nasady dalszej kości udowych oznaczano szerokość beleczek kostnych oraz szerokość chrząstki nasadowej.

Analiza histomorfometryczna preparatów histologicznych została przeprowadzona z wykorzystaniem mikroskopu sprzężonego z kamerą i komputerem, przy użyciu oprogramowania Lucia G, służącego do cyfrowych pomiarów histologicznych.

Statystyczne opracowanie uzyskanych wyników

Analizy statystycznej dokonano za pomocą testu t-Studenta. Wyniki przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej \pm średni błąd średniej arytmetycznej. W opracowaniu statystycznym wyników badań hematologicznych szpiku kostnego oraz badań histomorfometrycznych kości porównywano:

- 1) wyniki z kości udowych prawych (pozornie operowanych) grupy K-3 lub K-6 z wynikami z kości udowych lewych (nieoperowanych) tej samej grupy,
- 2) wyniki z kości udowych prawych (na których wykonano zabieg implantacji nitki) grupy B-3 lub B-6 z wynikami z kości udowych prawych (pozornie operowanych) odpowiedniej grupy kontrolnej K-3 lub K-6,

Tabela I. Parametry hematologiczne krwi obwodowej u szczurów z grup kontrolnych (K-3 i K-6) oraz szczurów, u których dokonano zabiegu implantacji jadowej nitki do jamy szpikowej kości udowej prawej na 3 tyg. (grupa B-3) lub 6 tyg. (grupa B-6)
Table I. Haematological parameters of peripheral blood in control rats (groups K-3 and K-6) and rats which had aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity of the right femur for 3 weeks (group B-3) or 6 weeks (group B-6)

Oznaczono	Przed eksperymentem						Czas trwania eksperymentu								
	grupa K-3			grupa B-3			grupa K-6			grupa B-6			6 tyg.		
	grupa K-3	grupa B-3	grupa K-6	grupa B-3	grupa K-6	grupa B-6	grupa K-3	grupa B-3	grupa K-6	grupa B-6	grupa K-3	grupa B-3	grupa K-6	grupa B-6	
liczba erytrocytów (tys./mm ³)	9989,00±440,10	9954,00±252,32	10230,00±249,59	9992,00±148,59	10180,00±324,63	8404,00±289,63	10459,00±272,80	6882,00**±163,20							
liczba leukocytów (tys./mm ³)	15,87±1,36	15,63±1,06	15,50±1,12	15,48±1,80	15,57±1,26	15,95±1,76	15,76±1,29	16,80±0,95							
hemoglobina (g/dl)	12,60±1,51	12,59±0,94	12,50±1,30	12,62±0,72	12,57±0,58	7,72*±0,42	12,60±0,51	5,32**±0,71							
hematokryt (%)	49,00±1,57	49,00±2,30	48,54±2,37	48,54±2,35	49,00±2,60	45,50±0,56	49,34±2,60	43,40*±0,71							

*p<0,05; **p<0,005 – różnice statystycznie istotne w odniesieniu do wyniku uzyskanego w danej grupie przed eksperymentem

3) wyniki z kości udowych lewych (nieoperowanych) grupy B-3 lub B-6 z wynikami z kości udowych lewych (nieoperowanych) odpowiedniej grupy kontrolnej K-3 lub K-6.

Wyniki

Oznaczenia masy ciała zwierząt oraz masy narządów

U zwierząt z grupy kontrolnej K-3 po 3 tyg. trwania eksperymentu przyrost masy ciała wynosił 69,20±2,82 g, a w grupie kontrolnej K-6 po 6 tyg. eksperymentu przyrost masy ciała wynosił 126,33±3,30 g. W grupie szczurów, u których wykonano zabieg implantacji nitki bawełnianej do kości na 3 tyg. (grupa B-3), przyrost masy ciała był mniejszy niż w grupie K-3 o 7,87%, a u szczurów, u których implant znajdował się w kości przez 6 tyg. (grupa B-6), przyrost masy ciała był statystycznie istotnie mniejszy (p < 0,005) o 35,68% niż w grupie kontrolnej K-6.

U szczurów z grupy K-3 masa śledziony i masa grasicy wynosiły odpowiednio 0,63±0,04 g i 0,26±0,02 g, a w grupie K-6 odpowiednio 0,71±0,02 g i 0,27±0,02 g. W grupie szczurów B-3 masa badanych narządów była taka jak w grupie K-3, natomiast u zwierząt z grupy B-6 masa śledziony była statystycznie istotnie większa (p < 0,005) o 15,58% w porównaniu ze szczurami z grupy K-6, a masa grasicy była podobna do wyniku uzyskanego w grupie K-6.

Oznaczenia hematologiczne krwi obwodowej

Wyniki oznaczeń hematologicznych krwi obwodowej: liczby erytrocytów, leukocytów, hemoglobiny i wskaźnika hematokrytu w grupach szczurów kontrolnych K-3 i K-6 oraz u szczurów z grup z implantem w kości B-3 i B-6 przedstawiono w tab. I.

Po 3 tyg. od zabiegu implantacji w grupie B-3 liczba erytrocytów zmniejszyła się o 15,87%, stężenie hemoglobiny było statystycznie istotnie mniejsze (p < 0,05) o 38,68%, a hematokryt był mniejszy o 7,14% w porównaniu z wynikami uzyskanymi w tej grupie szczurów przed eksperymentem. W grupie B-6 liczba erytrocytów była statystycznie istotnie mniejsza (p < 0,005) o 31,13%, stężenie hemoglobiny było statystycznie istotnie mniejsze (p < 0,005) o 57,85%, a hematokryt był statystycznie istotnie mniejszy (p < 0,05) o 10,59% w porównaniu z wynikami uzyskanymi w tej grupie szczurów przed eksperymentem.

Procentowa zawartość krwinek białych w rozmazie krwi obwodowej w grupie K-3 przed eksperymentem wynosiła: 5,16±0,46 granulocytów obojętnochłonnych pałeczkowatych, 1,99±0,24 granulocytów kwasochłonnych pałeczkowatych, 0,05±0,05 granulocytów zasadochłonnych pałeczkowatych, 29,22±1,33 granulocytów obojętnochłonnych, 2,33±0,23 granulocytów kwasochłonnych, 0,88±0,14 granulocytów zasadochłonnych, 60,49±0,54 limfocytów, 0,66±0,12 monocytów

Tabela II. Procentowa zawartość komórek szpiku kostnego u szczurów z grup kontrolnych (grupa K-3 i K-6) w kości udowej prawej (pozornie operowanej) oraz u szczurów, u których dokonano zabiegu implantacji jadalowej nitki do jamy szpikowej kości udowej prawej na 3 tyg. (grupa B-3) lub 6 tyg. (grupa B-6)

Table II. Percentage of bone marrow cells in the marrow of the right femur in control rats (groups K-3 and K-6) and rats which had aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity of the right femur for 3 weeks (group B-3) or 6 weeks (group B-6)

Badane parametry	grupa K-3	grupa B-3	grupa K-6	grupa B-6
układ erytroblastyczny				
proerytroblasty	4,80±0,26	1,32±0,44	4,78±0,16	0,00±0,00*
erytroblasty zasadochłonne	8,22±1,04	3,00±0,04*	8,48±0,66	2,00±0,02*
erytroblasty polichromatofilne	16,09±1,19	2,57±0,16**	16,86±1,22	4,10±0,27**
erytroblasty ortochromatyczne	6,80±0,98	2,30±0,06*	7,03±0,42	1,30±0,10*
układ mieloblastyczny				
komórki podziałowe	1,11±0,20	0,00±0,00	1,37±0,08	0,20±0,02
mieloblasty	1,52±0,41	0,60±0,30	1,84±0,54	1,00±0,10
promielocyty	1,93±0,26	1,66±0,18	1,80±0,44	1,50±0,36
mielocyty obojętnochłonne	1,10±0,10	1,25±0,44	1,28±0,30	1,00±0,15
mielocyty kwasochłonne	0,70±0,05	0,62±0,20	0,85±0,06	0,60±0,03
mielocyty zasadochłonne	0,38±0,01	0,37±0,16	0,39±0,03	0,20±0,01
metamielocyty obojętnochłonne	3,84±0,44	3,67±0,61	5,82±1,04	3,30±0,11
metamielocyty kwasochłonne	1,30±0,33	1,00±0,20	1,57±0,20	1,00±0,06
metamielocyty zasadochłonne	0,25±0,25	0,25±0,02	0,32±0,03	0,10±0,02
granulocyty pałeczkowate obojętnochłonne	12,60±1,20	13,00±2,20	11,00±3,14	10,12±1,80
granulocyty pałeczkowate kwasochłonne	1,30±0,28	2,25±0,62	1,60±0,40	0,40±0,40
granulocyty pałeczkowate zasadochłonne	0,55±0,05	0,50±0,05	0,33±0,07	0,50±0,06
granulocyty obojętnochłonne	19,50±2,20	26,30±3,92*	18,18±1,98	25,20±1,60*
granulocyty kwasochłonne	0,77±0,10	1,00±0,02	0,65±0,05	0,70±0,05
granulocyty zasadochłonne	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,08	0,00±0,00
układ limfoblastyczny				
limfoblasty	3,35±0,81	9,00±0,30*	3,18±0,50	7,10±0,24*
limfocyty	5,42±0,90	18,02±0,98**	6,30±0,72	10,00±0,58*
układ płytkowy				
megakariocyty	1,50±0,36	1,50±0,21	1,42±0,08	1,00±0,10
układ siateczkowo-śródbłonkowy				
monocyty	1,00±0,02	4,50±0,02	1,00±0,03	10,33±0,82**
komórki siateczki	0,00±0,00	1,00±0,06	0,25±0,05	0,00±0,00
plazmocyty	3,26±0,12	3,34±0,05	3,43±0,07	11,00±0,35*
komórki tuczne	1,00±0,04	1,00±0,01	0,26±0,04	8,24±0,06**
inne				
komórki niezidentyfikowane i jądra komórkowe	2,00±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,15±0,05

* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$ – różnice statystycznie istotne w odniesieniu do kości udowej prawej (pozornie operowanej) w odpowiedniej grupie kontrolnej K-3 lub K-6

Tabela III. Parametry makrometryczne kości szczurów z grup kontrolnych (grupa K-3 i K-6) oraz szczurów, u których dokonano zabiegu implantacji jałowej nitki do jamy szpikowej kości udowej prawej na 3 tyg. (grupa B-3) lub 6 tyg. (grupa B-6)

Table III. *Macrometric parameters of right femur in control rats (groups K-3 and K-6) and rats which had aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity for 3 weeks (group B-3) or 6 weeks (group B-6)*

Badane parametry	Grupa K-3	Grupa B-3	Grupa K-6	Grupa B-6
masa kości udowej [g]	0,980±0,015	0,977±0,010	1,024±0,012	1,148±0,011*
długość kości udowej [mm]	34,23±0,37	34,33±0,30	35,48±0,29	35,52±0,18
średnica trzonu kości udowej [mm]	R ₁ 4,32±0,04	r ₁ 4,33±0,02	r ₁ 4,45±0,02	r ₁ 4,78±0,01*
	R ₂ 3,64±0,05	r ₂ 3,65±0,08	r ₂ 3,68±0,01	r ₂ 3,68±0,03
średnica nasady dalszej kości udowej [mm]	R ₁ 7,73±0,05	r ₁ 7,75±0,04	r ₁ 7,81±0,02	r ₁ 8,27±0,01*
	R ₂ 7,03±0,03	r ₂ 7,05±0,05	r ₂ 7,18±0,02	r ₂ 8,00±0,03**

r₁ – płaszczyzna czołowa, r₂ – płaszczyzna strzałkowa

*p<0,05; **p<0,005 – różnice statystycznie istotne w odniesieniu do kości udowej prawej (pożornie operowanej) w odpowiedniej grupie kontrolnej K-3 lub K-6

tów i nie różniła się od wyniku uzyskanego w tej grupie po 3 tyg. eksperymentu. U szczurów z grup K-6, B-3 i B-6 procentowa zawartość krwinek białych w rozmazie krwi obwodowej zarówno przed eksperymentem, jak i po nim była taka jak w grupie K-3.

Oznaczenia hematologiczne szpiku kostnego

Wyniki oznaczeń hematologicznych szpiku kostnego są przedstawione w tab. II.

Układ erytroblastyczny, oznaczony na podstawie preparatów uzyskanych z kości pozornie operowanej grupy K-3 i K-6, stanowił odpowiednio 35,91% i 37,15% komórek szpiku kostnego. Zawartość komórek układu erytroblastycznego szpiku kostnego kości zawierającej implant w grupie B-3 uległa statystycznie istotnemu zmniejszeniu o 74,40%, a w grupie B-6 o 80,08% w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną.

W układzie mieloblastycznym, oznaczonym na podstawie preparatów uzyskanych z kości zawierającej implant grupy B-3, nastąpiło statystycznie istotne (p < 0,05) zwiększenie zawartości granulocytów obojętnochłonnych o 34,87% w porównaniu z wynikami uzyskanymi z kości udowej w grupie K-3. W odniesieniu do wyników uzyskanych u szczurów z grupy K-6 w badanej grupie B-6 zawartość granulocytów obojętnochłonnych zwiększyła się statystycznie istotnie (p < 0,05) o 38,61%.

Układ limfoblastyczny, oznaczony na podstawie preparatów uzyskanych z kości udowej szczurów z grupy K-3 lub K-6, stanowił odpowiednio 8,77% i 9,48% komórek szpiku kostnego. Zawartość układu limfoblastycznego szpiku kostnego kości zawierającej implant u szczurów z grupy B-3 i B-6 była statystycznie istotnie większa odpowiednio o 210,15% i 80,38% w odniesieniu do grup

kontrolnych (zwiększyła się zarówno liczba limfoblastów, jak i limfocytów).

Zawartość układu siateczkowo-śródbłonkowego w szpiku kości pozornie operowanej u szczurów z grupy K-3 wynosiła 5,26%. Podobny wynik uzyskano w kości udowej w grupie K-6 oraz w kości zawierającej implant w grupie B-3. W grupie B-6 zawartość monocytów, plazmocytów i komórek tłuszcznych w szpiku kości z implantem była statystycznie istotnie większa w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów z grupy kontrolnej K-6.

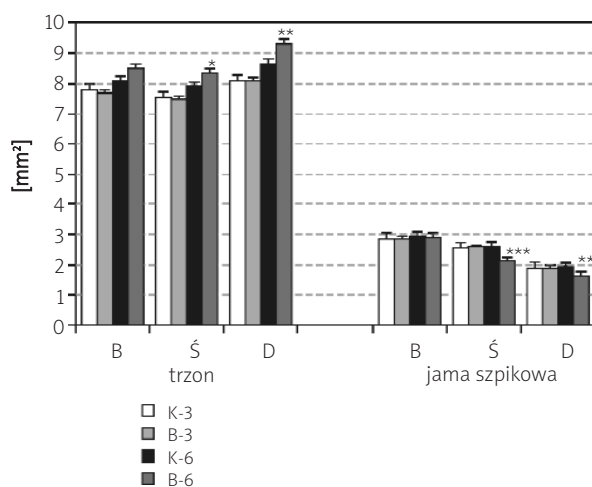
Komórki obserwowane w rozmazie szpiku kostnego kości zawierającej implant (grupa B-3 i B-6) nie wykazywały różnic w wielkości, kształcie i zabarwieniu w porównaniu z komórkami widocznymi w preparatach uzyskanych od szczurów odpowiedniej grupy kontrolnej (K-3 lub K-6).

Oznaczenia makrometryczne kości

Wyniki oznaczeń makrometrycznych (masy, długości, średnicy trzonu i średnicy nasady) wyizolowanych kości udowych szczurów z grupy K-3, B-3, K-6 i B-6 przedstawiono w tab. III.

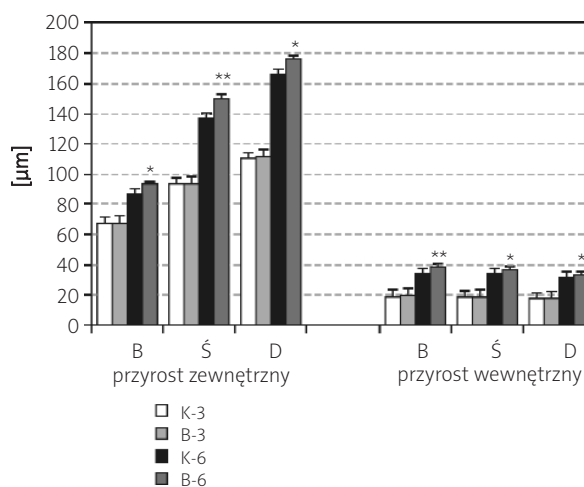
U zwierząt z grupy B-3 badane parametry makrometryczne były podobne do wyników uzyskanych w grupie szczurów K-3.

Zabieg implantacji w grupie B-6 spowodował w badanej kości statystycznie istotne zwiększenie masy (p < 0,05) o 12,11%, statystycznie istotne zwiększenie średnicy trzonu w płaszczyźnie czołowej (p < 0,05) o 7,42% oraz statystycznie istotne zwiększenie średnicy nasady dalszej mierzonej w płaszczyźnie czołowej (p < 0,05) o 5,89% i w płaszczyźnie strzałkowej (p < 0,005) o 11,42% w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie K-6. Parametry



Ryc. 1. Powierzchnia przekroju poprzecznego trzonu i jamy szpikowej kości udowej mierzonej od strony nasady bliższej (B), w połowie długości kości (Ś) i od strony nasady dalszej (D) w grupach zwierząt kontrolnych (grupa K-3 i K-6) i u szczurów z wszczepionym implantem (grupa B-3 i B-6).

Fig. 1. Transverse cross-sectional area of the diaphysis and marrow cavity of the femur, measured from the proximal epiphysis side (B), in the half-length (Ś) and from the distal epiphysis side (D), in control rats (groups K-3 and K-6) and rats which had aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity for 3 weeks (group B-3) or 6 weeks (group B-6).



Ryc. 2. Przyrost kości udowej na grubość od strony nasady bliższej (B), w połowie długości kości (Ś) i od strony nasady dalszej (D) w grupach zwierząt kontrolnych (grupa K-3 i K-6) i u szczurów z wszczepionym implantem (grupa B-3 i B-6).

Fig. 2. Transverse growth of the femur, measured from the proximal epiphysis side (B), in the half-length (Ś) and from the distal epiphysis side (D), in control rats (groups K-3 and K-6) and rats which had aseptic cotton fibre inserted into the marrow cavity for 3 weeks (group B-3) or 6 weeks (group B-6).

makrometryczne kości piszczelowej prawej w grupie zwierząt B-6 były takie jak u szczurów z grupy K-6.

Oznaczenia histomorfometryczne kości

U zwierząt z grupy B-3 całkowita powierzchnia przekroju poprzecznego trzonu kości z implantem oraz powierzchnia przekroju poprzecznego jamy szpikowej tej kości mierzone od strony nasady bliższej, w połowie kości oraz mierzone od strony nasady dalszej były podobne do wyników uzyskanych u szczurów z grupy K-3 (ryc. 1).

U zwierząt z grupy B-6 całkowita powierzchnia przekroju poprzecznego trzonu kości z implantem mierzona od strony nasady bliższej, w połowie kości oraz mierzona od strony nasady dalszej była większa odpowiednio o 5,07%, 5,99% ($p < 0,05$) i 7,38% ($p < 0,005$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów z grupy K-6. Powierzchnia przekroju poprzecznego jamy szpikowej kości zawierającej implant w grupie B-6 była mniejsza od strony nasady bliższej o 2,02%, mierzona w połowie kości o 17,83% ($p < 0,001$) i mierzona od strony nasady dalszej o 13,98% ($p < 0,005$) w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie K-6 (ryc. 1).

U szczurów z grupy B-3 przyrost zewnętrzny i przyrost wewnętrzny na grubość kości z implantem był taki, jak w grupie zwierząt kontrolnych K-3 (ryc. 2).

U szczurów z grupy B-6 zewnętrzny przyrost kości z implantem na grubość uległ statystycznie istotnemu zwiększeniu o 8,06% (od strony nasady bliższej; $p < 0,05$), o 10,89% (w połowie długości kości; $p < 0,005$) i o 6,85% (od strony nasady dalszej; $p < 0,05$) w porównaniu z grupą K-6. Wewnętrzny przyrost tej kości na grubość był statystycznie istotnie większy w porównaniu ze zwierzętami z grupy K-6 o 15,18% od strony nasady bliższej ($p < 0,005$), o 8,12% w połowie kości ($p < 0,05$) i o 6,26% od strony nasady dalszej ($p < 0,05$) (ryc. 2).

Szerokość warstwy osteoidu zewnętrznego w kości pozornie operowanej w grupie K-3 mierzona od strony nasady bliższej wynosiła $10,263 \pm 1,378 \mu\text{m}$, mierzona w połowie długości kości $11,758 \pm 1,235 \mu\text{m}$ i mierzona od strony nasady dalszej $9,973 \pm 2,288 \mu\text{m}$, natomiast szerokość warstwy osteoidu wewnętrznego tej kości wynosiła odpowiednio: $8,708 \pm 0,869 \mu\text{m}$, $8,025 \pm 1,025 \mu\text{m}$ i $8,568 \pm 1,548 \mu\text{m}$. U szczurów z grupy B-3 szerokość warstwy osteoidu zewnętrznego i szerokość warstwy oste-

oidu wewnętrznego była podobna do odpowiednich wyników uzyskanych w grupie zwierząt kontrolnych K-3.

W grupie K-6 szerokość warstwy osteoidu zewnętrznego mierzona od strony nasady bliższej wynosiła $10,212 \pm 2,003 \mu\text{m}$, mierzona w połowie długości kości $11,501 \pm 1,535 \mu\text{m}$ i mierzona od strony nasady dalszej $9,901 \pm 1,294 \mu\text{m}$, natomiast szerokość warstwy osteoidu wewnętrznego wynosiła odpowiednio: $8,687 \pm 1,669 \mu\text{m}$, $8,000 \pm 1,875 \mu\text{m}$ i $8,475 \pm 1,628 \mu\text{m}$. U szczurów z grupy B-6 szerokość warstwy osteoidu zewnętrznego i szerokość warstwy osteoidu wewnętrznego w kości z implantem były podobne do odpowiednich wyników uzyskanych w grupie zwierząt kontrolnych K-6.

U szczurów z grupy K-3 i K-6 grubość beleczek kostnych nasady dalszej kości pozornie operowanej wynosiła odpowiednio: $77,170 \pm 3,430 \mu\text{m}$ i $88,921 \pm 2,866 \mu\text{m}$. U zwierząt z grupy B-3 i B-6 grubość beleczek kostnych nasady dalszej kości z implantem była podobna do wyników uzyskanych w odpowiedniej grupie kontrolnej K-3 lub K-6.

Szerokość chrząstki nasadowej nasady dalszej kości pozornie operowanej u zwierząt z grupy kontrolnej K-3 wynosiła $114,21 \pm 13,90 \mu\text{m}$, a u szczurów z grupy kontrolnej K-6 $79,44 \pm 10,80 \mu\text{m}$. Podobny wynik uzyskano w grupach szczurów z implantem (B-3 lub B-6).

Dyskusja

W opisywanym nowym modelu *osteomyelitis aseptica chronica* implant jałowej nitki bawełnianej był wprowadzony do jamy szpikowej kości udowej prawej u szczurów z badanych grup na 3 lub 6 tyg. U zwierząt z grup kontrolnych zarówno w eksperymencie 3-, jak i 6-tygodniowym wykonano w kości udowej prawej zabieg pozorny (bez zakładania implantu) w celu oceny wpływu inwazji do kości, wynikającej z wykonanego samego zabiegu operacyjnego. Dlatego u szczurów kontrolnych porównywano oznaczenia hematologiczne szpiku kostnego i oznaczenia morfometryczne kości udowej prawej, pozornie operowanej z wynikami uzyskanymi z kości udowej lewej (nieoperowanej) u tych samych zwierząt. Wyniki pomiarów w tych dwóch kościach udowych zwierząt z grup kontrolnych nie wykazywały różnic pomiędzy sobą. Wyniki te pozwalają na wykluczenie wpływu wykonania samego zabiegu operacyjnego na badane parametry hematologiczne i morfometryczne kości udowych zawierających implant u szczurów z badanych grup.

U zwierząt, u których wykonano zabieg operacyjny implantacji jałowej nitki do jamy szpikowej kości udowej na 3 lub 6 tyg., oraz w grupach szczurów kontrolnych pozornie operowanych nie obserwowano unieruchomienia kończyn ani żadnych odczynów miejscowych

lub ogólnych, świadczących o szerzeniu się stanu zapalnego z kości na tkanki sąsiednie.

Aby się upewnić, czy obecność implantu jałowej nitki w jamie szpikowej kości udowej wywołuje stan zapalny, przeprowadzono oznaczenia parametrów hematologicznych szpiku kostnego i krwi obwodowej. W tym celu wykonano oznaczenia zawartości komórek układu erytroidnego, układu mieloblastycznego, układu limfoblastycznego, układu płytkowego, układu siateczkowo-śródbłonkowego szpiku kostnego. Oznaczenia składu odsetkowego komórek szpiku kostnego kości udowej prawej, w której dokonano implantacji na 3 tyg., wykazały zmniejszenie liczby komórek układu erytroidnego, z jednoczesnym zwiększeniem liczby komórek układu mieloblastycznego (granulocytów obojętnochłonnych) i zwiększeniem liczby komórek układu limfoblastycznego (limfoblastów i limfocytów), bez wpływu na układ płytkowy i układ siateczkowo-śródbłonkowy. U zwierząt z implantem w kości przez 6 tyg. dodatkowo zwiększyła się liczba komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego szpiku kostnego, tj. monocytów, plazmocytów i komórek tucznych.

Te zmiany w składzie odsetkowym komórek szpiku kostnego świadczą o toczącym się stanie zapalnym w jamie szpikowej kości udowej prawej, wywołanym implantem jałowej nitki bawełnianej. Zwłaszcza zwiększenie się liczby komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego w kości zawierającej implant przez 6 tyg. jak i sam czas eksperymentu mogą świadczyć o występowaniu **przewlekłego** stanu zapalnego. Granulocyty, limfocyty, monocyty, plazmocyty i komórki tuczne należą do komórek biorących udział w procesie zapalnym. Granulocyty wykazują działanie przede wszystkim w ostrej fazie procesu zapalnego, a limfocyty i monocyty występują w zapaleniu ostrym, ale w późniejszym jego okresie, oraz w zapaleniach przewlekłych. Plazmocyty i komórki tuczne są charakterystyczne głównie dla zapalenia przewlekłego. W badaniach scyntygraficznych zmienionej zapalnie kości królika również wykazano zwiększenie się liczby granulocytów (zwłaszcza w ostrym stanie zapalnym) oraz limfocytów (w stanie przewlekłym) [13].

Zmiany składu odsetkowego komórek szpiku kostnego kości udowej prawej z implantem znalazły odpowiedź w badaniach hematologicznych krwi obwodowej. Zmniejszeniu uległa liczba erytrocytów, odsetek hematokrytu oraz stężenie hemoglobiny, jako wynik zmniejszenia liczby komórek układu erytroidnego szpiku kostnego kości zawierającej implant przez 3 lub 6 tyg. Nie stwierdzono u tych zwierząt wzrostu liczby leukocytów we krwi obwodowej, co świadczy o braku szerzenia się procesu zapalnego poza jamę szpikową i kość.

U szczurów z wszczepionym implantem obserwowano zmniejszenie masy ciała, zwłaszcza w eksperymen-

cie 6-tygodniowym. U tych zwierząt nastąpiło również zwiększenie masy śledziony, co może być konsekwencją stanu zapalnego jamy szpikowej, ponieważ zasadniczą funkcją śledziony jest wytwarzanie, magazynowanie i rozkładanie elementów morfotycznych krwi, w czym współpracuje ona ze szpikiem kostnym.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania morfometryczne kości obejmowały pomiary makrometryczne i histomorfometryczne kości. Zastosowanie implantu jałowej nitki bawełnianej do jamy szpikowej kości udowej na 6 tyg. wywoływało u szczurów (oprócz wcześniej opisanych zmian hematologicznych krwi obwodowej i szpiku kostnego) również zmiany w tkance kostnej. U zwierząt, które miały wszczepiony implant przez 3 tyg., nie stwierdzono zmian w badanych parametrach kości w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną.

U szczurów, u których wywołano *osteomyelitis aseptica chronica* w wyniku implantacji na 6 tyg. jałowej nitki do jamy szpikowej kości udowej prawej, stwierdzono zwiększenie masy tej kości. Zastosowanie implantu powodowało również deformację tej kości przez zwiększenie średnicy trzonu w płaszczyźnie czołowej oraz zwiększenie średnicy nasady dalszej, zarówno w płaszczyźnie czołowej, jak i strzałkowej. W prowadzonych badaniach po wprowadzeniu implantu na 6 tyg. obserwowano zwiększenie całkowitej powierzchni przekroju poprzecznego trzonu tej kości – z jednoczesnym zmniejszeniem powierzchni przekroju poprzecznego jamy szpikowej. Zaobserwowane zmiany mogą świadczyć o nasileniu procesów kościotworzenia i osłabieniu resorpcji tkanki kostnej. Należałoby się wówczas również spodziewać wpływu stanu zapalnego wywołanego implantem na oznaczenia przyrostu kości na grubość. I tak stwierdzone w niniejszej pracy zwiększenie przyrostu zewnętrznego oraz przyrostu wewnętrznego na grubość po 6 tyg. eksperymentu świadczy o zaburzonych procesach przebudowy w kości udowej pod wpływem implantu. Ponieważ grubość osteoidu – zarówno zewnętrznego, jak i wewnętrznego – kości z implantem nie uległa zmianie, sugeruje to, że opisane powyżej zmniejszenie przyrostu tej kości na grubość może być wynikiem zahamowania osteoklastycznej resorpcji tkanki kostnej. Pomiędzy osteoklastami a komórkami układu monocytowo-makrofagowego istnieje bliskie pokrewieństwo i komórki te mają wspólne pochodzenie ze zrębu szpiku. W zależności od sprzyjających warunków i obecności stymulatorów CFU-GM (*granulocyte, macrophage-colony forming unit*) może się różnicować w szpiku w osteoklasty lub w komórki układu monocytowo-makrofagowego [14–17]. Dlatego obserwowane w prowadzonych badaniach zwiększenie liczby monocytów w szpiku kostnym kości zawierającej implant może być związane ze

zmniejszeniem liczby osteoklastów, a więc z obserwowanym zahamowaniem procesów resorpcji.

W celu zbadania czy przewlekły jałowy stan zapalny jamy szpikowej kości udowej z implantem oddziałuje, oprócz trzonu tej kości, na jej część nasadową i przynasadową, przeprowadzono oznaczenia grubości beleczek kostnych i szerokości chrząstki nasadowej nasady dalszej tej kości. Pomiary wykazały, że u szczurów z implantem grubość beleczek kostnych i szerokość chrząstki nasadowej była podobna do wyników uzyskanych w odpowiedniej grupie kontrolnej, pomimo opisanego wcześniej zwiększenia średnicy nasady tej kości (w eksperymencie 6-tygodniowym).

Podobne zmiany w tkance kostnej zaobserwowano we wcześniejszych próbach z zastosowaniem implantu jałowej peletki bawełnianej przez 6 tyg. Zmiany te, choć słabsze, występowały również wtedy, gdy implant peletki znajdował się w kości przez 3 tyg. (w odróżnieniu od wyniku uzyskanego w niniejszej pracy) [9].

Uzyskane po 6 tyg. eksperymentu zmiany w tkance kostnej w wyniku wywołania *osteomyelitis aseptica chronica* odpowiadają tym, jakie są obserwowane u pacjentów, chociaż istnieją rozbieżne doniesienia naukowe dotyczące wpływu tej jednostki chorobowej na procesy przebudowy tkanki kostnej. *Osteomyelitis* u ludzi może przebiegać zarówno z nadmiernym kościotworzeniem, jak i z nasiloną resorpcją kości [18–20]. Na podstawie badań scyntygraficznych kości zmienionej zapalnie stwierdzono nasilenie się ogólnej przebudowy tkanki kostnej [21]. *Osteomyelitis* u ludzi może charakteryzować się deformacją kończyny zajętej procesem chorobowym [22, 23], a warstwa korowa kości długiej może być zbyt cienka lub pogrubiała [20, 23, 24].

Nasilenie się procesu przebudowy kości stwierdza się również u zwierząt z eksperymentalnym zapaleniem kości długiej i szpiku [25], co może doprowadzić do zakłócenia architektury tkanki kostnej zajętej procesem chorobowym [2].

We wcześniejszych badaniach z wykorzystaniem modelu *osteomyelitis aseptica acuta* u szczurów, u których implant jałowej nitki bawełnianej był pozostawiony na tydzień, kierunek zmian w tkance kostnej był odwrotny do obserwowanego w niniejszej pracy. W modelu *osteomyelitis aseptica acuta* nastąpiły: deformacja kształtu kości, zmniejszenie jej masy, zmniejszenie powierzchni przekroju poprzecznego trzonu kości i zwiększenie powierzchni jamy szpikowej oraz zmniejszenie przyrostu kości na grubość [10]. A zatem po tygodniu obecności implantu w jamie szpikowej wystąpiła *osteomyelitis aseptica acuta* z utratą tkanki kostnej. W opisywanej w niniejszej pracy *osteomyelitis aseptica chronica* zmiany w tkance kostnej po 6 tyg. eksperymentu miały natomiast charakter przerostowy. Dlatego można przypuszczać, że

obserwowany brak zmian w badanych parametrach makrometrycznych i histometrycznych kości, w przypadku gdy implant był założony na 3 tyg., nie jest wynikiem braku oddziaływania stanu zapalnego na tkankę kostną, ale występujące wówczas zmiany mogą mieć charakter kompensacyjny, przeciwstawiający się destrukcji kostnej – tak więc kość osiągnęła takie parametry, jak u szczurów kontrolnych. Ponieważ w opisywanym modelu *osteomyelitis aseptica chronica* stan zapalny w kości utrzymywał się przez następne 3 tyg. (razem 6 tyg.), zmiany rozrostowe tkanki kostnej postępowały dalej.

W opisywanym modelu *osteomyelitis aseptica chronica* u szczurów stan zapalny kości udowej prawej z implantem nie wpłynął na pozostałe kości długie (kość udową lewą bez implantu oraz na kość piszczelową prawą przylegającą do kości udowej z implantem).

Na podstawie opisywanych wyników można stwierdzić, że zastosowanie implantu jałowej nitki bawelnianej do kości udowej szczurów na 6 tyg. wywołuje *osteomyelitis aseptica chronica*, co pozwala na wykorzystanie go jako modelu eksperymentalnego, dzięki któremu będzie można poszerzyć możliwości badawcze nad patofizjologią i farmakoterapią tej jednostki chorobowej. Czas eksperymentu nie może być jednak krótszy niż 6 tyg., ponieważ można nie uzyskać zmian w tkance kostnej (3 tyg.) lub mogą one być charakterystyczne dla *osteomyelitis aseptica acuta* (tydzień).

Opisana w pracy eksperymentalna metoda wywołania *osteomyelitis aseptica chronica* oraz opublikowany wcześniej model *osteomyelitis aseptica acuta* u szczurów [10] stanowi alternatywę dla innych modeli eksperymentalnych stanu zapalnego kości i jamy szpikowej [2, 5–7].

Badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji nr 2P05D02129.

Piśmiennictwo

1. Gracia E, Lacleriga A, Monzon M, et al. Application of a rat osteomyelitis model to compare in vivo and in vitro the antibiotic efficacy against bacteria with high capacity to form biofilms. *J Surg Res* 1998; 79: 146-53.
2. Hienz SA, Sakamoto H, Flock JI, et al. Development and characterization of a new model of hematogenous osteomyelitis in the rat. *J Infect Dis* 1995; 171: 1230-6.
3. Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Luscher C, et al. Local expression of tumor necrosis factor alpha in an experimental model of acute osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1997; 65: 3438-43.
4. Littlewood-Evans AJ, Hattenberger MR, Zak O, et al. Effect of combination therapy of rifampicin and azithromycin on TNF levels during a rat model of chronic osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 493-8.
5. Nelson DR, Buxton TB, Luu QN, et al. Animal models of osteomyelitis. Knowledge, hypothesis, and speculations. *Infect Dis Clin North Am* 1990; 4: 377-84.
6. Yoshii T, Magara S, Miyai D, et al. Local levels of interleukin-1 beta, -4, -6 and tumor necrosis factor alpha in an experimental model of murine osteomyelitis due to staphylococcus aureus. *Cytokine* 2002; 19: 59-65.
7. Hentunen TA, Choi SJ, Boyce BF, et al. A murine model of inflammatory bone disease. *Bone* 2000; 26: 183-8.
8. Rump S, Kleinrok Z. Farmakometria – doświadczalne metody badania leków. PZWL, Warszawa 1982; 325.
9. Kaczmarczyk-Sedlak I, Janiec W. Wpływ jałowego stanu zapalnego jamy szpikowej na kości długie u szczurów. *Post Osteoartrol* 2003; 14: 77-85.
10. Kaczmarczyk-Sedlak I. Charakterystyka nowego eksperymentalnego modelu osteomyelitis aseptica acuta u szczurów. *Post Osteoartrol* 2005; 16: 17-25.
11. Tripp EJ, MacKay EH. Silver staining of bone prior to decalcification for quantitative determination osteoid in sections. *Stain Technol* 1972; 47: 129-33.
12. Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Bone localization of tetracyclines. *J Natl Cancer Inst* 1957; 19: 87-93.
13. Kaps HP, Georgi P. Die Leukozytenszintigraphie mit 111-Indium bei akuter und chronischer Osteomyelitis im Tiermodell-Ein experimentelle Studie [Indium-111 scintigraphy in acute and chronic osteomyelitis in animal model]. *Nuklearmedizin* 1986; 25: 61-70.
14. Fuller R, Chambers TJ. Parathyroid hormone induces bone resorption in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Exp Pathol* 1998; 79: 223-33.
15. Quinn JM, Neale S, Fujikawa Y. Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages and bone marrow cells. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 527-31.
16. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17: 308-32.
17. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13: 66-80.
18. Eswar N. Garre's osteomyelitis: a case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2001; 19: 157-9.
19. Swei Y, Taguchi A, Tanimoto K. Diagnostic points and possible origin of osteomyelitis in synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis and osteitis (SAPHO) syndrome: a radiographic study of 77 mandibular osteomyelitis cases. *Rheumatology* 2003; 42: 1398-403.
20. Świątkowski J, Półtorak D, Błasińska-Przerwa K i wsp. Zmiany zapalne kości – temat zawsze aktualny. *Ortop Traumatol Rehab* 2002; 4: 716-21.
21. Schauwecker DS. The scintigraphic diagnosis of osteomyelitis. *Am J Roentgenol* 1992; 158: 9-18.
22. Orzechowski W, Morasiewicz L, Kucharski R i wsp. Odległe wyniki wydłużenia i korekcji osi według metody Ilizarowa w pozapalnych skręceniach i zniekształceniach kości ramiennej. *Ortop Traumatol Rehab* 2002; 4: 316-23.
23. Segev E, Hayek S, Lokiec F, et al. Primary chronic sclerosing (Garre's) osteomyelitis in children. *J Pediatr Orthop B* 2001; 10: 360-4.
24. Olszewska-Konarska M, Bielawski J. Krwiopochodne zapalenie kości w przebiegu łuszczycy. *Chir Narz Ruchu* 2002; 67: 69-72.
25. Philipov JP, Pascalev MD, Aminkov BY, et al. Changes in serum carboxyterminal telopeptide of type I collagen in an experimental model of canine osteomyelitis. *Calcif Tissue Int* 1995; 57: 152-4.