

Цей винахід має відношення до способів підвищення ударної в'язкості та/або твердості кісток та/або зменшення ймовірності та/або тяжкості перелому кісток шляхом введення паратиреоїдного гормону. Зокрема, цей винахід має відношення до способу підвищення ударної в'язкості або твердості кісток на місці потенційної або фактичної травми, наприклад, тазостегнового суглоба або хребетного стовпа, особи, яка знаходиться у стані ризику виникнення або страшає на остеопороз. Зокрема, цей винахід має відношення до способу зменшення кількості випадків переломів хребців, зменшення кількості випадків множинних переломів хребців, зменшення тяжкості переломів хребців та/або зменшення кількості випадків невертебральних переломів.

Засоби, які існують, наприклад, естроген, біфосфонат, фторид або кальцитонін, можуть запобігати рарефікації кісток та викликати 3-5% підвищення маси кісткової тканини шляхом поновного заповнення простору ремоделювання, однак це не забезпечує суттєвого стимулювання остеогенезу. Ретенція кісткової тканини шляхом інгібування її метаболізму може не забезпечити достатнього захисту від ризику виникнення перелому у пацієнтів, які вже мають значний рівень розрідження кісток. Анаболічні агенти, які підвищують міцність кісток шляхом стимулювання остеогенезу, можуть за переважним варіантом забезпечити кращий захист проти перелому у пацієнтів з розвинутим остеопорозом.

Паратиреоїдний гормон (PTH) представляє собою секретований 84-амінокислотний продукт парацитоподібної залози ссавців, який контролює рівні кальцію у сироватці завдяки своїй дії на різноманітні тканини, у тому числі кісткову. Гадають, що N-кінцевий 34-амінокислотний PTH (PTH(1-34)) людини та великої рогаї худоби є біологічно еквівалентним повномірному гормону. Інші амінокислотні фрагменти PTH (у тому числі, наприклад, 1-31 та 1-38) або PTHrP (PTH-споріднений пептид/білок), або аналоги будь-якого з них, або обох, які активують PTH/PTHrP рецептор (PTH1 рецептор), демонструють подібний же біологічний вплив на кісткову масу, хоча масштаби згаданого впливу можуть різнитись.

Результати досліджень на людях з різноманітними формами PTH продемонстрували анаболічний вплив на кісткову тканину та викликали значну зацікавленість його застосуванням для лікування остеопорозу та споріднених розладів, пов'язаних з кістками. Значний анаболічний вплив PTH на кісткову тканину, у тому числі стимулювання остеогенезу, наслідком чого є чисте збільшення кісткової маси та/або міцності, був продемонстрований на багатьох тваринних моделях та на людях.

Розповсюджена точка зору полягає у тому, що введення PTH людям та спорідненим тваринним моделям справляє негативний вплив на кортикальний шар кістки. Фактично наслідком природного підвищення вмісту ендогенного PTH, яке спостерігається під час розладу, гіперпаратиреозу, є стоншення кортикального шару кістки, яке супроводжується підвищенням зв'язності та маси губчастої кістки. Результати проведених досліджень дозволяють висунути припущення, суть якого полягає у тому, що у разі ремоделювання гаверсова кортикального шару кістки (який існує у людей та вищих ссавців) під впливом PTH, буде відбуватись перерозподіл кісткової тканини таким чином, що маса та міцність кортикального шару кістки буде падати, у той час як маса та міцність губчастої кістки буде зростати. Наприклад, за результатами опублікованих клінічних досліджень введення PTH, маса кортикального шару кістки після лікування екзогенним PTH зменшувалась, і ці дані викликали занепокоєння тим, що наслідком лікування PTH буде зменшення маси кортикального шару кістки та зниження його міцності. Занепокоєння, яке було викликано згаданими дослідженнями, полягає також у тому, що наслідком втрати кортикального шару кістки буде зменшення загальної скелетної кісткової маси. Це має велике клінічне значення, оскільки у разі остеопорозу більша втрата губчастої кістки, порівняно з втратою кортикального шару кістки, означає, що механічне навантаження буде припадати головним чином на залишкову частину кортикального шару кістки. Постійне розрідження кортикального шару кістки підвищує ризик виникнення перелому. Важливо, таким чином, щоб терапевтичний засіб для лікування остеопорозу підтримував або збільшував залишкову частину кортикального шару кістки суб'єкту.

Вплив PTH на кортикальний шар кістки було досліджено на тваринах, окрім людини, з ремоделюванням гаверсова кортикального шару кістки, наприклад, на собаках, тхорах, вівцях та мавпах, однак величина зразків, як правило, є занадто малою для проведення надійного статистичного аналізу. Вплив змін, яким піддаються механічні властивості кортикального шару кістки у таких тварин у разі лікування за допомогою PTH, залишається невідомим. Результати опублікованих досліджень гризунів демонструють збільшення маси кортикального шару кістки під час введення PTH, але зникнення цієї переваги після припинення введення PTH. Однак структура кортикального шару кісток гризунів чітко відрізняється від структури гаверсова кортикального шару і ремоделюється шляхом поверхневої аппозиції, а не інтракортикальним ремоделюванням остеонів. На додаток до цього унаслідок технологічних обмежень біохімічних випробувань відносно коротких кісток гризунів виникають артефакти вимірів, коли засіб, наприклад, PTH, змінює геометрію кістки для її потовщення. Унаслідок подібних артефактів екстраполювання реакції кортикального шару кісток пацієнтів на кістки людей або інших тварин з ремоделюванням остеонів стає ненадійним. Таким чином дані, які існують для тварин, а також для людей, які піддаються гаверсовому ремоделюванню, вказують на те, що PTH може мати шкідливий вплив на кортикальний шар кістки з викликанням результуючої втрати кісткової маси унаслідок виснаження кортикального шару кістки.

Як наслідок, розповсюджена думка щодо дії PTH полягає у тому, що пацієнти потребують одночасного або подальшого лікування з застосуванням протирезорбційного препарату для зведення до мінімуму втрати кісткової тканини, яку було викликано PTH. Фактично, ця модель була основою проведення декількох клінічних досліджень на жінках. Наприклад, було проведено три клінічні дослідження на постклімактеричних жінках, коли PTH застосовували одночасно з введенням кальцитоніну або естрогену, або на передклімактеричних жінках, які приймали агоніст гонадотропін-релізінг-гормону, синарел, з приводу ендометриту. Протилежний вплив естрогену та PTH на метаболізм кортикального шару кістки особливо ускладнює спостереження ефектів самого PTH під час комбінованого лікування за допомогою двох згаданих препаратів.

Залишається потреба у способі застосування PTH для підвищення міцності та твердості кісток у людей та інших тварин з гаверсовим ремоделюванням, а також для зменшення кількості випадків перелому кісток у згаданих тварин. На додаток до цього залишається потреба у способі підвищення якості та об'єму кортикального шару кістки.

Цей винахід включає спосіб підвищення ударної в'язкості та/або твердості кістки, за переважним варіантом кортикального шару кістки, та/або зменшення кількості випадків та/або тяжкості переломів кісток шляхом введення паратиреоїдного гормону. Зокрема, цей винахід має відношення до способу підвищення ударної в'язкості або твердості кісток на місці потенційної або фактичної травми. Підвищення ударної в'язкості та/або твердості кістки може проявлятися численними шляхами, відомими фахівцям у цій галузі, наприклад, підвищенням мінеральної густини кістки, підвищенням вмісту мінеральних речовин кістки, підвищенням роботи до руйнування тощо. За одним з варіантів втілення цього винаходу спосіб за цим винаходом знижує кількість випадків або тяжкість вертебральних та/або неverteбральних переломів. Згаданий спосіб за цим винаходом може використовуватись для зниження ризику таких переломів або для лікування таких переломів. Зокрема, згаданий спосіб за цим винаходом може знизити кількість випадків вертебральних та/або неverteбральних переломів, знизити тяжкість вертебрального перелому, знизити кількість випадків множинних вертебральних переломів, поліпшити якість кістки тощо.

Згаданий спосіб може підвищити ударну в'язкість або твердість на місці потенційної травми, наприклад, стегна або хребетного стовпу особи з остеопорозом, або на іншому місці, яке має аномально низьку кісткову масу або погану структуру кістки. Згаданий спосіб може також підвищувати ударну в'язкість або твердість кістки на місці фактичної травми, наприклад, перелому, наприклад, стегна або хребця. Переважним суб'єктом для згаданого способу за цим винаходом є жінка або чоловік, який знаходиться у стані ризику виникнення або який має остеопороз, за переважним варіантом жінка у постклімактеричному періоді, та який не піддається одночасній гормональнозамісній терапії (HRT), естрогенній або еквівалентній терапії або протирезорбційній терапії. За одним з варіантів втілення цього винаходу згаданий пацієнт одержує також допоміжні засоби кальцію та/або вітаміну D.

Паратиреоїдний гормон, наприклад, N-кінцеві амінокислоти 1-34 рекомбінантного людського паратиреоїдного гормону, може вводиться циклічним або переміжним чином. За переважним варіантом циклічне введення включає введення РТН впродовж 2 або декількох циклів ремоделювання з подальшим припиненням введення РТН впродовж одного або декількох циклів ремоделювання. На додаток до цього, за згаданим способом за цим винаходом, підвищення ударної в'язкості та/або твердості кістки може тривати впродовж декількох циклів ремоделювання або впродовж декількох років після останнього введення паратиреоїдного гормону.

На фігурах 1A та 1B показано, що BMD (мінеральна густина кістки) та BMC (вміст мінеральних речовин у кістковій тканині) діафізу стегнової кістки (кортикальний шар кістки) (A) та проксимального відділу стегнової кістки (губчаста речовина кістки+кортикальний шар кістки) (B) були значно вищими у тварин, яких піддавали обробці РТН, аніж у контрольних тварин при обох дозах.

На фігурах 2A-2D показано вплив РТН на механічну міцність та момент інерції поперечного розтину (CSMI) кортикального шару діафізу стегнової кістки.

Фігура 3 ілюструє відсоткову зміну критеріїв DXA (подвійної рентгенівської абсорбціометри) загального вмісту мінеральної речовини кісток у контрольній та експериментальній групах.

Фігури 4A-C ілюструють відсоткову зміну критеріїв DXA (подвійної рентгенівської абсорбціометри) хребетного стовпу для контрольної та експериментальної груп у поперекових хребцях 2-4 для площі кістки (A), вмісту мінеральних речовин у кістковій тканині (B) та мінеральної густини кісткової тканини (C).

Фігури 5A та 5B ілюструють збільшення маси кістки (A) та міцності кістки (B) поперекових хребців приматів, яких було піддано обробці паратиреоїдним гормоном.

Фігури 6A та 6B ілюструють підвищення міцності шийки стегнової кістки (A) та постійної міцності середньої частини діафізу плечової кістки (B) приматів, яких було піддано обробці паратиреоїдним гормоном.

Фігура 7 ілюструє активацію швидкості остеогенезу на ендостальній та періостальній поверхнях діафізу плечової кістки.

Фігура 8 ілюструє гістограмний аналіз зміщення густини об'ємного елементу зображення кістки поперекових хребців унаслідок лікування РТН, порівняно до контролю. Слід звернути увагу на підвищення густини кортикального шару кістки після припинення лікування РТН.

Фігура 9 ілюструє підвищення BMD поперекового відділу хребетного стовпу впродовж 23 місяців лікування пацієнтів РТН у дозі 20мкг/день або 40мкг/день, порівняно до контрольних пацієнтів, яким вводили плацебо.

Фігура 10 ілюструє зростання BMD стегнової кістки та шийки стегнової кістки впродовж 24 місяців лікування пацієнтів РТН у дозі 20мкг/день або 40мкг/день, порівняно до контрольних пацієнтів, яким вводили плацебо.

Цей винахід має відношення до способу підвищення ударної в'язкості та/або твердості кістки та/або зменшення кількості випадків перелому у суб'єкті шляхом введення паратиреоїдного гормону. Згаданий спосіб можна застосовувати для підвищення твердості та/або ударної в'язкості на місці потенційної травми або на місці фактичної травми. Травма, взагалі, включає перелом, хірургічну травму, протезування суглобу, ортопедичні процедури тощо. Підвищення ударної в'язкості та/або твердості кістки включає, взагалі, підвищення мінеральної густини кортикального шару кістки, підвищення міцності кістки, підвищення стійкості до навантаження тощо. Зменшення кількості випадків перелому включає, взагалі, зменшення ймовірності або фактичної кількості випадків перелому для суб'єкту, порівняно з контрольними суб'єктами, які лікуванню не піддавались.

Вираз "гранична сила", який використано у цьому описі, означає максимальну силу, яку витримує зразок кістки; твердість означає нахил лінійної ділянки кривої залежності деформації від навантаження; та робота до руйнування означає площу під кривою залежності деформації від навантаження перед переломом. Кожен зі згаданих показників можна виміряти та вирахувати за способами, стандартними для галузі, яка займається вивченням кісток. Згадані параметри є структурними властивостями, які залежать від внутрішніх властивостей та геометрії матеріалу і можуть визначатись за описом, який наведено у роботі Тарнера К.Г. (Turner C.H.) та Барра Д.Б. (Burr D.B.), 1993, "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial", Bone, 14:595-608, яку включено до цього опису як посилання. Гранична сила, твердість та робота до руйнування можуть бути

нормалізовані для визначення внутрішніх властивостей матеріалу, наприклад, межі міцності, модуля пружності та ударної в'язкості, які не залежать від розміру та форми. Термін "межа міцності", який використано у цьому описі, означає максимальне зусилля, яке може витримати зразок; модуль пружності означає внутрішню твердість матеріалу; та ударна в'язкість означає стійкість до руйнування на одиницю об'єму. Кожен зі згаданих показників можна визначити за допомогою способів, відомих у цій галузі. Дивись літературне джерело, яке було згадано перед тим. Міцність стегнової кістки, як згадується у цьому описі, можна визначити на шийці стегнової кістки або на діафізі шляхом згинання згаданої частини кістки у трьох або чотирьох точках.

#### Травма кісток

Згаданий спосіб за цим винаходом є корисним для суб'єкту, який страждає або страждав на травму однієї або декількох кісток, Згаданий спосіб може бути корисним для суб'єктів-ссавців, наприклад, людей, коней, собак та кішок, зокрема, для людей. Травма кістки може бути проблемою для бігових коней та собак, а також для кімнатних тварин. Людина може страждати від будь-якої з різноманітних травм, які можуть бути викликані аварією, медичним втручанням, хворобою або розладом. У молодих людей травма кістки є, ймовірно, наслідком перелому, медичного втручання, яке було здійснено з метою лікування перелому, або відновлення функції суглобів або сполучної тканини, яку було пошкоджено, наприклад, унаслідок зайняття спортом. Травми кісток інших типів, наприклад, травми унаслідок остеопорозу, дегенеративної хвороби кісток (наприклад, артриту або остеоартриту), протезування тазостегнового суглобу або вторинних станів, які пов'язані з лікуванням інших системних станів (наприклад, глюкокортикоїдного остеопорозу, опіків або трансплантації органу) найчастіше спостерігаються у людей похилого віку.

До переважних суб'єктів належить людина, за переважним варіантом жінка, яка знаходиться у стані ризику виникнення або страждає на остеопороз. Фактори ризику для остеопорозу є відомими у цій галузі і включають гіпогонадічні стани у чоловіків та жінок, незалежно від віку, станів, хвороб або лікарських засобів, які викликають гіпогонадізм, фактори харчування, пов'язані з остеопорозом (найпоширенішим є низький вміст кальцію або вітаміну D), паління, споживання спиртних напоїв, лікарські засоби, пов'язані з остеопорозом (наприклад, глюкокортикоїди, тироксин, гепарин, літій, антиконвульсивні засоби тощо), втрату зору, яка сприяє падінням, космічний політ, іммобілізацію, постійну госпіталізацію або постільний режим та інші системні хвороби, які пов'язують з підвищеним ризиком остеопорозу. Ознаки присутності остеопорозу є відомими у цій галузі техніки і включають радіологічне підтвердження компресійного перелому як мінімум одного хребця, низьку кісткову масу (за типовим варіантом як мінімум 1 стандартне відхилення нижче середніх стандартних значень для молодого віку) та/або атравматичні переломи.

Наслідком остеопорозу можуть бути, наприклад, вертебральні та/або невертебральні переломи. Прикладами невертебральних переломів є перелом стегнової кістки, перелом дистального відділу передпліччя, перелом проксимального відділу плечової кістки, перелом зап'ястя, перелом променевої кістки, перелом гомілковостопного суглобу, перелом плечової кістки, перелом ребра, перелом стопи, перелом тазу або комбінація згаданих переломів. Згаданий спосіб за цим винаходом може використовуватись для зменшення ризику таких переломів або для лікування таких переломів. Ризик перелому зменшується завдяки та загоєнню перелому сприяє підвищення міцності та/або твердості кістки, наприклад, стегна, хребетного стовпа або обох. Типовою жінкою, яка знаходиться у стані ризику виникнення остеопорозу, є постклімактерична жінка або передклімактерична, гіпогонадна жінка. Переважним суб'єктом є постклімактерична жінка незалежно від одночасно здійснюваної гормонозамісної терапії (HRT), естрогенної або еквівалентної терапії або протирезорбційної терапії. Згаданий спосіб за цим винаходом може бути корисним для суб'єкту на будь-якому етапі остеопорозу, однак, зокрема, на початковому та прогресуючому етапах.

Цей винахід надає спосіб, ефективний, зокрема, для запобігання або зменшення кількості переломів у суб'єкту, який має або знаходиться у стані ризику прогресування до остеопорозу. Цей винахід, наприклад, може зменшити кількість вертебральних та/або невертебральних переломів, знизити тяжкість вертебральних переломів, зменшити кількість множинних вертебральних переломів, поліпшити якість кістки тощо. За іншим варіантом втілення згаданий спосіб за цим винаходом може бути корисним для пацієнтів з низькою кістковою масою або попередніми переломами, які знаходяться у стані ризику виникнення майбутніх множинних скелетних переломів, наприклад, пацієнтів, у яких може швидко прогресувати остеопороз хребетного стовпу.

Інші суб'єкти також можуть бути у стані ризику виникнення або страждати на травму кістки і можуть одержати користь від згаданого способу за цим винаходом. Наприклад, для найрізноманітніших суб'єктів, які знаходяться у стані ризику виникнення одного або декількох зі згаданих перед тим переломів, може передбачатись хірургічне втручання з наслідковою травмою кістки, або вони можуть піддаватись ортопедичній процедурі з маніпулюванням кісткою на ділянці скелету з аномально низькою кістковою масою або поганою структурою, або з недостатнім рівнем вмісту мінеральних речовин. Наприклад, відновлення функції після хірургічного втручання, наприклад, протезування суглобу (наприклад, колінного або тазостегнового) або іммобілізації хребетного стовпу, або інших процедур, які іммобілізують кістку або скелет, можна поліпшити завдяки згаданому способу за цим винаходом. Згаданий спосіб за цим винаходом може також допомогти виздоровленню після ортопедичних процедур, під час яких здійснювалось маніпулювання з кісткою на ділянці з аномально низькою кістковою масою або поганою структурою; до згаданих процедур належить хірургічний поділ кістки, у тому числі остеотомії, протезування суглобу, де втрата кісткової структури потребує, наприклад, реструктурування зі створенням навісу вертлюжної западини та запобігання зсуву протезу. До інших придатних суб'єктів для практичного втілення цього винаходу належать суб'єкти, які страждають на гіпопаратиреоз або кіфоз, які можуть підлягти травмам, пов'язаним з або спричиненим гіпопаратиреозом або прогресуванням кіфозу.

#### Ударна в'язкість та твердість кісток

Згаданий спосіб за цим винаходом зменшує ризик виникнення травми або допомагає виздоровленню від травми шляхом підвищення ударної в'язкості або твердості кісток, або і того і іншого. Взагалі, ударна в'язкість або твердість кістки є наслідком маси або міцності кортикального шару кістки, губчастої кістки та губчастої

речовини кістки. Згаданий спосіб за цим винаходом може забезпечити рівні ударної в'язкості, твердості, маси та/або міцності у межах або вище рівня нормальних суб'єктів. За переважним варіантом цей винахід забезпечує підвищені рівні відносно рівнів, наслідком яких є виникнення травми, або таких, які ведуть до стану ризику виникнення травми. Підвищення ударної в'язкості, твердості або того та іншого зменшує ризик або ймовірність перелому, порівняно до контрольних суб'єктів, які обробці не піддавались.

Певні характеристики кістки, у разі їхнього поліпшення, підвищують ударну в'язкість та/або твердість кістки. До таких характеристик належить мінеральна густина кісткової тканини (BMD), вміст мінеральних речовин у кістковій тканині (BMC), частота активування або швидкість остеогенезу, кількість кісткових брусків, товщина кісткових брусків, зв'язність кісткових та інших брусків, періостальний та ендокортикальний остеогенез, пористість кортикального шару кістки, площа поперечного розтину кістки та маса кістки, стійкість до навантаження та/або робота до руйнування. Поліпшення або підвищення однієї або декількох зі згаданих характеристик є переважним наслідком згаданого способу за цим винаходом.

Певні характеристики кістки, наприклад, кістково-мозковий проміжок або модуль пружності, у разі їхнього зниження, забезпечують підвищену ударну в'язкість та/або твердість кістки. Молодша (з більшою ударною в'язкістю та твердішою) кістка має кристаліти, які, як правило, є меншими за розміром, аніж кристаліти старшої кістки. Таким чином зменшення, у цілому, розміру кісткових кристалітів підвищує ударну в'язкість та твердість кістки та може зменшити кількість переломів. На додаток до цього, визрівання кристалітів кістки може надати кістці додаткових необхідних характеристик, у тому числі підвищеної ударної в'язкості та твердості, та/або зменшити кількість переломів. Зменшення однієї або декількох зі згаданих характеристик може бути переважним наслідком згаданого способу за цим винаходом.

Згаданий спосіб за цим винаходом є ефективним для підвищення ударної в'язкості та/або твердості будь-якої з декількох кісток. Наприклад, згаданий спосіб може підвищити ударну в'язкість та/або твердість кісток, у тому числі стегнової кістки, наприклад, клубової кістки, кістки вільної нижньої кінцівки, наприклад, стегнової кістки, кістки хребетного стовпу, наприклад, хребця, або кістки верхньої кінцівки, наприклад, дистального відділу кістки передпліччя або проксимального відділу плечової кістки. Це підвищення ударної в'язкості та/або твердості може спостерігатись уздовж усієї кістки або локалізуватись на певних ділянках згаданої кістки. Наприклад, ударна в'язкість та/або твердість стегнової кістки може підвищуватись шляхом підвищення ударної в'язкості та/або твердості шийки стегнової кістки або вертелюгу стегнової кістки. Ударна в'язкість та/або твердість шийки стегнової кістки може підвищуватись шляхом підвищення ударної в'язкості та/або твердості клубового гребеню або клубової ості. Ударна в'язкість та/або твердість хребця може підвищуватись шляхом підвищення ударної в'язкості та/або твердості ніжки, пластинки дуги або тіла хребця. Згаданому впливу, переважно, піддаються хребці певних ділянок хребетного стовпа, наприклад, цервікальні, грудні, поперекові, крижові та/або куприкові хребці. Згаданому впливу за переважним варіантом піддається один або декілька хребців середньої частини груди та/або верхні поперекові хребці.

Згадане підвищення ударної в'язкості та/або твердості може спостерігатись у кістках кожного типу або, головним чином, у кістках одного типу. Типами кісток є кістки з губчастим (губчаста речовина кістки, губчаста кістка або пластинчаста кістка) та компактним (кортикальним або щільним) шарами, а також кісткова мозоля. Згаданий спосіб за цим винаходом за переважним варіантом підвищує ударну в'язкість та/або твердість кістки завдяки своєму впливу на губчасту речовину або кортикальний шар кістки, або лише на кортикальний шар кістки. За допомогою згаданого способу може також підвищуватись ударна в'язкість та/або твердість губчастої кістки, тобто кістки, до якої прикріплюється сполучна тканина. Наприклад, вигідним є надання додаткової ударної в'язкості ділянці прикріплення зв'язки, сухожилля та/або м'язу.

За іншим аспектом цього винаходу підвищення ударної в'язкості або твердості може зменшити кількість випадків переломів. За цим аспектом підвищення ударної в'язкості або твердості може включати зменшення кількості випадків вертебральних переломів, зменшення кількості випадків тяжких переломів, зменшення кількості випадків переломів помірної тяжкості, зменшення кількості випадків невертебральних переломів, зменшення кількості випадків множинних переломів або їхніх комбінацій.

#### Паратиреоїдний гормон

Композиція або розчин може включати як активний інгредієнт повномірну 84-амінокислотну форму паратиреоїдного гормону, зокрема, людську форму, hPTH(1-84), яку було одержано рекомбінантним шляхом, синтезуванням пептидів або шляхом екстрагування з загальної води організму людини. Дивись, наприклад, патент США №5,208,041, який включено до цього опису як посилання. Амінокислотну послідовність hPTH(1-84) повідомлено Кімуру (Kimura) та іншими у *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 114 (2): 493.

Згадана композиція або розчин може також включати як активний інгредієнт, фрагменти або варіанти фрагментів людського PTH або PTH пацюка, свині або великої рогатої худоби, який має активність людського PTH, як було визначено на моделі остеопорузу на оваріоектомізованих пацюках, за повідомленням Кімеля (Kimmel) та інших, *Endocrinology*, 1993, 32 (4): 1577.

Згадані фрагменти паратиреоїдного гормону, бажано, включають як мінімум перші 28 N-кінцевих залишків, наприклад, PTH(1-28), PTH(1-31), PTH(1-34), PTH(1-37), PTH(1-38) та PTH(1-41). Альтернативні різновиди форми варіантів PTH включають від 1 до 5 амінокислотних замінів, які поліпшують стабільність та напівперіод існування PTH, наприклад, заміщення метіонінових залишків у положеннях 8 та/або 18 лейцином або іншою гідрофобною амінокислотою, яка підвищує стійкість PTH проти окиснення та заміщення амінокислот на 25-27 ділянці нечутливими до трипсину амінокислотами, наприклад, гістидином або іншою амінокислотою, яка підвищує стійкість PTH проти протеази. До інших придатних форм PTH належить PTHrP, PTHrP(1-34), PTHrP(1-36) та аналоги PTH або PTHrP, які активують PTH1 рецептор. Ці форми PTH охоплюються згаданим терміном "паратиреоїдний гормон", який використано у цьому описі у родовому значенні. Згадані гормони можна одержати за допомогою відомих рекомбінантних або синтетичних методів, опис яких наведено, наприклад, у патентах США №№4,086,196 та 5,556,940, які включено до цього опису як посилання.

Переважним гормоном є людський PTH(1-34), відомий також як терипаратид. Опис стабілізованих розчинів людського PTH(1-34), наприклад, рекомбінантного людського PTH(1-34) (rhPTH(1-34)), які можуть

застосовуватись за цим способом, наведено у заявці на патент США №60/069,075, яку включено до цього опису як посилання. Опис кристалічних форм людського РТН(1-34), які можуть застосовуватись за цим способом, наведено у заявці на патент США №60/069,875, яку включено до цього опису як посилання.

#### Введення паратиреоїдного гормону

Паратиреоїдний гормон за типовим варіантом може вводиться парентерально, за переважним варіантом шляхом підшкірного впорскування, за допомогою способів та у вигляді лікарських форм, добре відомих у цій галузі техніки. Опис стабілізованих лікарських форм людського РТН(1-34), які за переважним варіантом можуть застосовуватись за цим способом, наведено у заявці на патент США №60/069,075, яку включено до цього опису як посилання. У згаданій заявці також наведено опис численних інших лікарських форм для зберігання та введення паратиреоїдного гормону. Стабілізований розчин паратиреоїдного гормону може включати стабілізатор, буфер, консервант тощо.

До складу згаданого стабілізатору, який включають до згаданого розчину або композиції, входить поліол, який включає сахарид, за переважним варіантом моносахарид або дисахарид, наприклад, глюкозу, трегалозу, рафінозу або цукрозу; спирт з цукру, наприклад, маніт, сорбіт або інозит, та багатоатомний спирт, наприклад, гліцерин, пропіленгліколь або їхні суміші. Переважним поліолом є маніт або пропіленгліколь. Концентрація поліолу може коливатись у межах від приблизно 1% до приблизно 20% (мас), за переважним варіантом від приблизно 3% до 10% (мас.) загального розчину.

Згаданим буфером, який використовують у згаданому розчині або композиції за цим винаходом, може бути будь-яка суміш кислот або солей, яка є фармацевтично прийнятною та здатною до підтримування рН згаданого водного розчину у межах від 3 до 7, за переважним варіантом від 3 до 6. Придатними буферними системами є, наприклад, джерела ацетату, тартрату або цитрату. Переважними буферними системами є джерела ацетату або тартрату, найпереважнішим є джерело ацетату. Концентрація буферу може бути у межах від приблизно 2мМ до приблизно 500мМ, за переважним варіантом від приблизно 2мМ до 100мМ.

Згаданий стабілізований розчин або композиція за цим винаходом може також включати парентерально прийнятний консервант. До таких консервантів належать, наприклад, крезולי, бензиловий спирт, фенол, бензалконійхлорид, бензтронійхлорид, хлорбутанол, фенілетиловий спирт, метилпарабен, пропілпарабен, тимеросал, фенілмеркурнітрат та ацетат. Переважним консервантом є *m*-крезол або бензиловий спирт; найпереважнішим є *m*-крезол. Кількість консерванту, яка застосовується, може коливатись у межах від приблизно 0,1% до приблизно 2% (мас), за переважним варіантом від приблизно 0,3% до приблизно 1,0% (мас.) загального розчину.

Таким чином, до складу згаданого стабілізованого розчину терипаратиду може входити маніт, ацетат та *m*-крезол з прогнозованим строком зберігання, який перевищує 15 місяців при температурі 5°C.

Згадані композиції паратиреоїдного гормону можуть, у разі необхідності, надаватись у порошковій формі, яка включає не більше 2% (мас.) води, що є наслідком ліофілізації стерильного водного розчину гормону, який було одержано шляхом змішування вибраного паратиреоїдного гормону, буферу та стабілізатору за описом, який було надано перед тим. Особливо придатним буфером під час одержання ліофілізованих порошків є джерело тартрату. До особливо придатних стабілізаторів належить гліцин, цукроза, трегалоза та рафіноза.

На додаток до цього паратиреоїдний гормон може вводиться до складу лікарської форми з типовими буферами та наповнювачами, які використовуються у цій галузі для стабілізування та розчинення білків для парентерального введення. Опис визнаних у цій галузі фармацевтичних носіїв та їхніх лікарських форм наведено у роботі Мартіна (Martin), "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15 видання, Mack Publishing Co., Easton (1975). Паратиреоїдний гормон може також доставлятися через легені, рот, ніс, за допомогою супозиторіїв або пероральних лікарських форм.

Паратиреоїдний гормон вводиться до складу лікарської форми для введення дози, ефективної для підвищення ударної в'язкості та/або твердості однієї або декількох кісток суб'єкта та/або для зменшення ймовірності та/або тяжкості перелому кісток. За переважним варіантом ефективна доза забезпечує поліпшення структури, маси та/або міцності кортикального шару кістки. За переважним варіантом ефективна доза зменшує кількість випадків вертебральних переломів, зменшує кількість випадків множинних вертебральних переломів, зменшує тяжкість вертебральних переломів та/або зменшує кількість випадків невертебральних переломів. За переважним варіантом суб'єкт, який одержує паратиреоїдний гормон, одержує також ефективні дози кальцію та вітаміну D, які можуть підвищувати ефективність згаданого гормону. Ефективна доза паратиреоїдного гормону за типовим варіантом перевищує приблизно 5мкг/кг/день, хоча, зокрема, у людей, вона може дорівнювати від приблизно 10мкг/кг/день до приблизно 40мкг/кг/день або більше, у залежності від ефективності забезпечення підвищеної ударної в'язкості або твердості, зокрема, у кортикальному шарі кістки, або зниження кількості випадків переломів. Суб'єкт, який страждає на гіпопаратиреоз, може потребувати додаткових або більших доз паратиреоїдного гормону; такий суб'єкт потребує також замісної терапії зі згаданим гормоном. Дози, необхідні для замісної терапії при гіпопаратиреозі, є відомими у цій галузі. У певних випадках відповідні ефекти РТН можна спостерігати при дозах, менших за приблизно 5мкг/кг/день, або навіть менших за приблизно 1мкг/кг/день.

Згаданий гормон може вводиться регулярно (наприклад, один або декілька разів на день або тиждень), переміжно (наприклад, нерегулярно впродовж дня або тижня) або циклічно (наприклад, регулярно впродовж днів або тижнів з подальшим періодом без введення). За переважним варіантом у пацієнтів, хворих на остеопороз, РТН вводиться один раз на день впродовж 1-7 днів впродовж періоду часу, який становить від 3 місяців до 3 років. За переважним варіантом циклічне введення включає введення паратиреоїдного гормону впродовж як мінімум 2 циклів ремоделювання, та припинення введення паратиреоїдного гормону впродовж як мінімум 1 циклу ремоделювання. Інший переважний режим циклічного введення включає введення паратиреоїдного гормону впродовж як мінімум від приблизно 12 до приблизно 24 місяців, та припинення введення паратиреоїдного гормону впродовж як мінімум 6 місяців. За типовим варіантом благотворний вплив введення паратиреоїдного гормону зберігається після періоду введення. Благотворний вплив декількох місяців введення може зберігатись впродовж року, двох років або більше, без додаткового введення.

Використання лікарських форм паратиреоїдного гормону Цим винаходом передбачається також набір, до складу якого входять згадані фармацевтичні композиції та який призначено для використання за способами за цим винаходом. Згаданий набір може включати ампулу, яка містить лікарську форму за цим винаходом, та відповідні носії, висушені або у рідкій формі. Згаданий набір додатково включає інструкції у вигляді етикетки на згаданій ампулі та/або у формі вкладишу, який розміщують у коробці, до якої пакують згадану ампулу, для використання та введення згаданих сполук. Згадані інструкції можуть також друкуватись на коробці, до якої пакують згадану ампулу. Згадані інструкції містять інформацію, наприклад, інформацію відносно достатньої дози та шляху введення, для того, щоб будь-який працівник в цій галузі міг ввести згаданий лікарський засіб. Передбачається, що згаданим працівником у галузі є врач, медсестра, або інший фахівець, який може ввести згаданий лікарський засіб.

Цей винахід має також відношення до фармацевтичної композиції, яка включає лікарську форму одного або декількох паратиреоїдних гормонів, наприклад, гормону РТН(1-84) або людського РТН(1-34), та яка є придатною для парентерального введення. За цим винаходом лікарська форма одного або декількох паратиреоїдних гормонів, наприклад, людського РТН(1-84) або людського РТН(1-34), може використовуватись для одержання композиції або медикаменту, придатного для введення парентеральним шляхом. Цей винахід має також відношення до способів одержання композицій, які включають лікарську форму одного або декількох паратиреоїдних гормонів, наприклад, людського РТН(1-84) або людського РТН(1-34), у формі, яка є придатною для парентерального введення. Наприклад, рідка або тверда лікарська форма може бути одержана декількома шляхами за допомогою традиційних методів. Рідку лікарську форму можна одержати шляхом розчинення одного або декількох паратиреоїдних гормонів, наприклад, людського РТН(1-84) або людського РТН(1-34) у відповідному розчиннику, наприклад, воді, при відповідному рівні рН, з включенням буферів або інших наповнювачів, наприклад, для одержання одного зі згаданих стабілізованих розчинів, опис яких було наведено перед тим.

Приклади, які наведено далі, ілюструють цей винахід і не призначені для обмеження об'єму згаданого винаходу.

#### ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Підвищення міцності та густини кісток у разі введення rhPTH(1-34) кроликам

Експериментальні процедури

Інтактних білих новозеландських кроликів-самиць (компанія HRP Inc., Denver, штат Пенсільванія), одну з найменших тварин, яка утворює остеони шляхом інтракортикального ремоделювання, віком приблизно 9 місяців та масою 3,25-3,75кг, розподілили за середньогруповою масою тіла на 3 групи по 6 тварин у кожній. Дві експериментальні групи одержували біосинтетичний РТН(1-34) у дозах 10мкг/мл/кг/день або 40мкг/мл/кг/день. Контрольна група, одержували 1,0мл/кг/день підкисленого 0,9М фізіологічного розчину, до складу якого входила 2% термоінактивована кроляча сироватка. РТН(1-34), або носій вводили один раз на день шляхом підшкірного впорскування 5 днів на тиждень впродовж 140 днів. Кролики одержували лабораторний раціон, який вміщував 0,5% Са та 0,41% Р, та воду ad libitum.

Вибір доз було засновано на ряді попередніх досліджень, результати яких показали, що (1) після одноразового впорскування РТН(1-34) у дозі 100мкг/кг рівень кальцію у сироватці підвищувався та до вихідного рівня через 24 години не повернувся, у той час як після одноразової дози 50мкг/кг РТН(1-34) рівень кальцію у сироватці повернувся до вихідного рівня впродовж 24 годин, (2) результатом повторних впорскувань РТН(1-34) у дозі 20мкг/кг було тимчасове підвищення рівня кальцію у сироватці з поверненням до вихідних значень у межах 6-24 годин, та (3) у разі введення РТН(1-34) у дозі  $\leq 5$ мкг/кг, гістоморфометрія поверхні кісток не змінювалась.

Набір подвійних алізаринових міток (компанія Sigma, Сент-Луїс) вводили внутрішньом'язово у дозі 20мг/кг на 55 день та 63 день, у той час як набір подвійних кальцеїнових міток (компанія Sigma, Сент-Луїс) вводили підшкірно у дозі 5мг/кг на 15 день та 7 день, перед забиттям. Кроликів анестезували за допомогою  $\text{CO}_2$  у довільній послідовності через приблизно 3-6 годин після останнього впорскування з метою відбору крові шляхом серцевого проколу, після чого забивали пентобарбіталом натрію (100мг/кг), який вводили внутрішньочеревинно. Після цього видаляли праву плечову кістку, обидві стегнові кістки, поперекові хребці (L3-L5) та праву великогомілкову кістку.

Біохімія крові

Шляхом комп'ютеризованого багатоканального аналізу сироватки крові визначали рівні кальцію, фосфату, лужної фосфатази, креатиніну та азоту сечовини.

Гістоморфометрія

Гістоморфометричні виміри робили на кортикальному шарі діафізу великогомілкової кістки та на губчастій речовині поперекового хребця L3. Після забиття згадані кістки видаляли з кожної тварини та фіксували у 10% нейтральному забуференому розчині формаліну впродовж 24 годин. Згадані тканини дегідрували за допомогою ряду градуйованих спиртів (70-100%, 2 заміни на градус, кожна впродовж 4 годин під вакуумом). Після цього згадані зразки переносили до ксилолу та просочували за 24-годинною схемою просочування метилметакрилатом під вакуумом під тиском 20фунтів/дюйм<sup>2</sup> (1,406кг/см<sup>2</sup>) впродовж 2годин/етап у автоматичному процесорі Shandon Hypercenter (компанія Shandon Lipshaw, Pittsbutgh, штат Пенсільванія). Згадані зразки заливали 2% DDK-пластом з 0,2% ініціатором (компанія Delaware Diamond Knives, Wumington, штат Делавер). З поперечних розтинів великогомілкової кістки за допомогою станку для різання алмазною проволокою (компанія Delaware Diamond Knives, Inc., штат Делавер) робили зрізи товщиною 80мкм, які забарвлювали за допомогою трихрому Голднера. Незабарвлені поперечні розтини товщиною приблизно 80мкм піддавали динамічній гістоморфометрії з фторохромовими мітками. З поперечних розтинів поперекового хребця L3 за допомогою мікротому Райхерта-Юнга (Reichert-Jung) 2050 (компанія Magee Scientific Inc., Dexter, штат Мічиган) робили зрізи товщиною 5мкм, які забарвлювали за допомогою тетрахрому Макніла або залишали незабарвленими для проведення динамічної гістоморфометрії.

Гістоморфометричні дослідження здійснювали з 150× збільшенням за допомогою флуоресцентного

мікроскопу Nikon (Optiphot, Nikon, Tokyo, Японія) та напівавтоматичного цифрового перетворювача (Bioquant IV, R&M Biometrics, Nashville, штат Теннессі). Остеогенез та резорбцію у періостальній, ендокорткальній та інтракорткальній оболонках визначали на повній площі поперечних розтинів середньої частини діяфізу великогомілкової кістки. Визначення на губчастій речовині кістки здійснювали на площі 6мм<sup>2</sup> у центральній частині поперекового хребця на відстані 0,5мм від краю довоколишньої кортикальної оболонки. Номенклатура відповідала вимогам Комітету по гістоморфометричній номенклатурі Американського товариства досліджень кісток та мінеральних речовин (ASBMR Committee on histomorphometric nomenclature) (Парфітт А.М. (Parfitt A.M.), Дрезнер М.К. (Dreznner M.K.), Флоріо Ф.Г. (Florieux F.H.), Каніс Дж.А. (Kanis J.A.), Маллачі Г. (Malluche H.), Муньє П.Дж. (Meunier P.J.), Отт С.М. (Ott S.M.), Рекер Р.Р. (Recker R.R.) "Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee", J.Bone Miner. Res., 2: 595-610). Динамічні параметри вимірювали на основі кальцеїнової мітки.

Визначення кісткової маси

Поперечні розтини діяфізу великогомілкової кістки та четвертого поперекового хребця у 50% суміші етанолу/фізіологічного розчину піддавали кількісному комп'ютерному томографуванню (QCT або pQCT) за допомогою томографа pQCT 960A та аналізували за допомогою програми Dichte, версія 5.1 (компанія Norland/Stratec, Ft. Atkinson, штат Вісконсін). Вимірювали усі параметри тканин, у тому числі волюметричну мінеральну густину кісткової тканини (vBMD, мг/см<sup>3</sup>), площу поперечного розтину (X-площа, мм<sup>2</sup>) та вміст мінеральних речовин кісткової тканини (BMC, мг) з використанням розмірів об'ємного елемента зображення 148×148×1200мкм. Об'єм розраховується шляхом перемноження X-площі на товщину зрізу 1,2мм. Повну площу шийки вирізаної стегнової кістки у ванні з 50% сумішшю етанолу/фізіологічного розчину піддавали периферійній подвійній енергетичній абсорбціометри (pDEXA, компанія Norland/Stratec). Об'ємну мінеральну густину кісткової тканини (aBMD, г/см<sup>2</sup>), площу проекції (см<sup>2</sup>) та вміст мінеральних речовин кісткової тернини (BMC, г) вимірювали, зокрема, з застосуванням кроку сканування 0,5×1,0мм та порогу 0,04.

Біомеханічні випробування

Механічні властивості кісток вимірювали на діяфізі правої стегнової кістки та на тілі поперекового хребця L5. Кістки вирізали, очищали від сполучної тканини, обертали марлею, просоченою ізотонічним фізіологічним розчином та зберігали у замороженому стані при температурі -20°C до проведення випробувань. Перед проведенням випробувань зразки відтаювали впродовж 1-2 годин при кімнатній температурі. Усі зразки випробували до руйнування у циркуляційній водяній ванні при температурі 37°C за допомогою сервогидравлічної установки для випробувань MTS 810 (компанія MTS Corp., Minneapolis, штат Мінесота). Криві навантаження-деформації реєстрували за допомогою вимірювально-графічної системи HP 7090A (компанія Hewlett Packard, Camas, штат Вашингтон). Граничну силу (максимальна сила, яку витримують зразки), твердість (нахил лінійної частини кривої навантаження-деформації) та роботу до руйнування (площа під кривою навантаження-деформація перед руйнуванням) вимірювали за допомогою цифрового перетворювача (компанія Jandel Scientific, Corte Madera, штат Каліфорнія). Згадані параметри є структурними властивостями, які залежать від внутрішніх властивостей та геометрії матеріалу. Тарнер К.Г. (Turner C.H.) та Барр Д.Б. (Burr D.B.), 1993, "Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial", Bone, 14: 595-608. Згадані дані було нормалізовано для визначення внутрішніх властивостей матеріалу, наприклад, межі міцності (максимальне зусилля, яке витримують зразки), модулю пружності (внутрішня твердість матеріалу) та ударної в'язкості (стійкості до руйнування на одиницю об'єму, які не залежать від розміру та форми. Дивись те ж саме літературне джерело, яке було наведено перед тим.

Міцність стегнової кістки вимірювали на діяфізі шляхом згинання у трьох точках. Стегнову кістку розміщували у затискачі таким чином, що її передню сторону було спрямовано до навантажувача. Навантаження прикладавали у середній точці між двома опорами, які знаходились на відстані 54мм одна від другої. Динамометричний датчик переміщували зі швидкістю 1мм/сек до руйнування. Для нормалізації даних, які було одержано з кривої навантаження-деформація, межу міцності при згинанні вираховували з граничної сили за допомогою наведеної далі формули:

$$\sigma_t = F_u L / 8I \quad (1)$$

де  $\sigma_t$  - зусилля руйнування при згинанні,  $F_u$  - гранична сила.  $L$  - відстань між опорами,  $r$  - радіус у передньо-задньому напрямку, та  $I$  - момент інерції. Дивись те ж саме літературне джерело, яке було наведено перед тим. Значення моменту інерції вираховували, приймаючи поперечні розтини стегнової кістки еліптичними.

Середню товщину кортикального шару було вираховано за визначеннями товщини кожного з чотирьох квадрантів поперечного розтину стегнової кістки, які було одержано за допомогою цифрових штангенциркулів з точністю 0,01±0,005мм (компанія Mitutoyo, Японія).

Модуль пружності стегнової кістки ( $E_t$ ) було вираховано за допомогою рівняння, яке наведено далі:

$$E_t = (\text{твердість}) * (L^3 / 48I) \quad (2)$$

Ударну в'язкість стегнової кістки (ударна в'язкість<sub>t</sub>) було також вираховано за допомогою рівняння, яке наведено далі:

$$\text{Ударна в'язкість} = 3 * (\text{робота до руйнування}) * r^2 / LI \quad (3)$$

Для механічного випробування п'ятого поперекового хребця (L5) обидві кірцеві пластини тіла хребця були розрізані паралельно за допомогою низькошвидкісного станку для різання Bühler Isomet (компанія Bühler LTD, Evanston, штат Іллінойс). Після резекції задніх виступів визначали механічну міцність L5 на стискання. Стискувальне навантаження прикладавали з регулюванням ходу при швидкості повзуна 1мм/сек через оберталну пластину для коректування непаралельності лицьових поверхонь тіла хребця. Для нормалізування даних, які було одержано з кривої навантаження-деформація та для визначення внутрішніх властивостей матеріалу, які не залежать від геометрії тіла, межу міцності вираховували, як граничну силу, поділену на повну площу поперечного розтину.

Площу поперечного розтину (CSA) вираховували наведеним далі чином:

$$CSA = \pi ab / 4 \quad (4)$$

де а та b - ширина у передньо-задньому та середньо-боковому напрямках, відповідно.

Модуль пружності хребця ( $E_v$ ) вираховували наведеним далі чином:

$$E_v = (\text{міцність}) / (CSA/h) \quad (5)$$

де h - черепно-хвостова висота тіла хребця.

Ударну в'язкість хребця (Ударна в'язкість<sub>v</sub>) вираховували наведеним далі чином:

$$\text{Ударна в'язкість}_v = (\text{робота до руйнування}) / (CSA \cdot h) \quad (6)$$

Акустична мікроскопія

З середньої частини діяфізу правої плечової кістки за допомогою станку для різання алмазною проволокою вирізали поперечні зрізи товщиною 500мкм. Точну товщину кожного зразку вимірювали за допомогою мікрометра (компанія Mitutoyo, Японія) з роздільною здатністю 1мкм. Швидкість звуку вимірювали за допомогою сканувального акустичного мікроскопу (UH3, Olympus, Японія) за методом, опис якого було наведено раніше у роботі Хасегава К. (Hasegawa K.), Тарнера К.Г. (Turner C.H.), Рекера Р.Р. (Recker R.R.), Ву Е. (Wu E.), Барра Д.Б. (Burr D.B.), "Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy", Bone, 16: 85-90. За згаданою методикою можна докладно вимірювати внутрішні механічні властивості у вибраній фокальній точці. Акустичні хвилі у імпульсно-еховому режимі одержували за допомогою 50МГц перетворювача (V-390, Panametrics, Waltham, штат Массачусетс). 50МГц лінза забезпечувала одержання акустичного променя діаметром приблизно 60мкм. Зразки закріплювали на дні камери, яку було заповнено водою з постійною температурою (22°C). Час запізнення між звуковими хвилями, які відбивались від верхньої частини згаданих зразків та звуковими хвилями, які відбивались від нижньої частини згаданих зразків вимірювали за допомогою цифрового осцилоскопу (TDS 620, Tekronix, Beaverton, штат Орегон). Час запізнення вимірювали у п'яти різних точках. Взаємна відстань між точками на передньому корковому шарі перевищувала 300мкм. Швидкість звуку вираховували як подвійну товщину зразків, розділену на середній час запізнення. Масу у вологому стані (Ww) та масу у зануреному стані (Ws) у 100% етиловому спирті вимірювали за допомогою вагів (AJ100, компанія Mettler Instrument Corp., Heightstown, штат Нью-Джерсі). Густина у вологому стані ( $\rho$ ) вираховували за законом Архімеда:

$$\rho = \{Ww / (Ww - Ws)\} \cdot \rho_{\text{ЕТОН}} \quad (7)$$

де  $\rho_{\text{ЕТОН}}$  - густина спирту (0,789г/см<sup>3</sup>).

Приймаючи шлях звукової хвилі у кістці за однорідний, коефіцієнт пружності (C), який представляє внутрішню твердість зразків, вираховували наведеним далі чином:

$$C = \rho \cdot v^2 \quad (8)$$

де  $\rho$  - густина у вологому стані та v - швидкість звуку.

Статистичний аналіз

Для перевірки однорідності дисперсії вдавались до аналізу Барлетту. У разі, коди дисперсія була однорідною, для кінцевого порівняння застосовували однофакторний дисперсійний аналіз з частковими випробуваннями за Фішером з середнім квадратичним відхиленням. У разі, коли дисперсія була неоднорідною, вдавались до непараметричного аналізу Краскала-Уелліса (Kruskal-Wallis) з кінцевим аналізом за допомогою U-тестів Мена-Уітні (Mann-Whitney). Статистична значущість приписувалась при  $p < 0,05$ . Результати представлено як середнє ± середня квадратична помилка середнього.

Результати

Маса та біохімія тіла

Кролики, які піддавались обробці носієм РТН(1-34) у дозі 10мг/кг/день, демонстрували незначне підвищення маси тіла впродовж 140 днів. Кролики, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мг/кг/день, демонстрували незначне зменшення (51г) маси тіла, що представляло 1,4+1,6% втрати маси тіла впродовж експерименту (Таблиця 1). Показники сироватки знаходились у межах нормальної фізіологічної реакції для кроликів, хоча спостерігалось незначне підвищення рівня кальцію та азоту сечовини у сироватці. У разі більшої дози РТН(1-34) рівень лужної фосфатази у сироватці зростав у 2 рази (Таблиця 2).

Таблиця 1

Вплив РТН(1-34) на масу тіла

	Контроль	РТН(1-34) 10мг/кг/день	РТН(1-34) 40мг/кг/день
Початкова маса тіла (кг)	3,43±0,08	3,42±0,08	3,42±0,08
Кінцева маса тіла (кг)	3,70±0,05	3,51±0,05	3,37±0,10
Приріст маси тіла (кг)	0,26±0,09	0,09±0,05	-0,05±0,05*

Дані представлено як середнє ± середня квадратична помилка середнього для 6 кроликів на групу.  
\* $P < 0,05$  порівняно до контролю.

Таблиця 2

Вплив РТН(1-34) на біохімію сироватки

	Контроль	РТН(1-34) 10мг/кг/день	РТН(1-34) 40мг/кг/день
Кальцій (мг/дл)	12,1±0,3	12,6±0,2	13,5±0,3*



Фосфат (мг/дл)	4,7±0,2	4,7±0,2	5,5±0,3
Лужна фосфатаза (М.Од./л)	24,7±4,1	41,0±8,1	49,8±7,1*
Креатинін (мг/дл)	1,9±0,1	1,6±0,1	1,8±0,1
Азот сечовини (мг/дл)	18,3±0,3	18,1±0,8	23,9±1,9

Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього для 6 кроликів на групу.  
\*P<0,05 порівняно до контролю.

#### Гістоморфометрія

У групах, які піддавались обробці РТН(1-34), остеогенез підвищувався на періостальній (Ps.MS/BS) та ендокортикальній (Ec.MS/BS) поверхнях діяфізу стовпкової кістки (Таблиця 3). Ps.MS/BS у групі з більш високою дозою був значно вищим, ніж у 2 інших групах (p<0,001), та Ec.MS/BS у групі з більш високою дозою був значно вищим, ніж у контрольній групі (p<0,05). Відповідно до підвищення рівня лужної фосфатази у сироватці, швидкість остеогенезу на кожній поверхні (Ps.BFR/BS та Ec.BFR/BS) була значно більшою у групі з більш високою дозою, ніж у 2 інших групах (p<0,05). Швидкість аппозиції мінеральних речовин (MAR) не змінювалась ні на періостальній, ні на ендокортикальній оболонках.

Інтракортикально, кількість ділянок резорбції (Rs.N/Ct.Ar) у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, була значно більшою (у 7 разів), аніж у 2 інших групах (p<0,05) (Таблиця 4). Кількість мічених остеонів (UOp.N/Ct.Ar) у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, також була значно більшою, порівняно до 2 інших груп (p<0,01 порівняно до контрольної групи, p<0,05 порівняно до групи, яка одержувала дозу 10мкг/кг/день). MAR була значно більшою у обох експериментальних групах, аніж у контрольній групі (p<0,01), однак, суттєвої різниці між групами, які піддавались обробці РТН, не спостерігалось. Швидкість остеогенезу (BFR/BV) та частота активації (Ac.F) зростали (p<0,05 та p<0,01, відповідно) при обох дозах.

Таблиця 3

Вплив РТН(1-34) на ремоделювання  
періостальної та ендокортикальної ділянки діяфізу великогомілкової кістки

Параметри	Скорочення	Контроль	РТН(1-34) 10мкг/кг/день	РТН(1-34) 40мкг/кг/день
Поверхня ендокортикальних остеонів	Ec.OS/BS (%)	8,8±6,0	13,7±10,5	20,2±5,8
Товщина ендокортикальних остеонів	Ec.O. Th (мкм)	7,4±2,4	3,7±2,3	8,1±0,9
Швидкість аппозиції мінеральних речовин на періостальній поверхні	Ps.MAR (мкм/день)	0,33±0,17	0,38±0,08	0,66±0,14
Швидкість аппозиції мінеральних речовин на ендокортикальній поверхні	Ec.MAR (мкм/день)	1,33±0,22	0,79±0,16	1,32±0,15
Поверхня мінералізації на періостальній ділянці	Ps.MS/BS (%)	3,8±1,9	8,2±2,1	22,3±2,7*
Поверхня мінералізації на ендокортикальній ділянці	Ec.MS/BS (%)	26,4±6,6	32,6±8,2	57,7±10,4*
Остеогенез на періостальній ділянці	Ps.BFR/BS (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>2</sup> /рік)	0,02±0,02	0,03±0,01	0,16±0,05*
Остеогенез на ендокортикальній ділянці	Ec.BFR/BS (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>2</sup> /рік)	0,40±0,10	0,31±0,10	0,72±0,12*

Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього для 6 кроликів на групу.  
\*P<0,05 порівняно до контролю. P<0,05 порівняно до групи, яка одержувала РТН(1-34) у дозі 10мкг/кг/день.

Таблиця 4

Вплив РТН(1-34) на інтракортикальне ремоделювання діяфізу великогомілкової кістки

Параметри	Скорочення	Контроль	РТН(1-34) 10мкг/кг/день	РТН(1-34) 40мкг/кг/день
Кількість порожнин резорбції	Rs.N/Q.Ar (кількість/мм <sup>2</sup> )	0,014±0,013	0,013±0,004	0,097±0,036*
Кількість мічених остеонів	L.On.N/Ct.Ar (кількість/мм <sup>2</sup> )	0,011±0,006	0,027±0,006	0,215±0,094*
Товщина остеонів	O.Th (мкм)	4,92±0,59	5,42±0,30	5,16±0,27
Швидкість аппозиції мінеральних речовин	MAR (мкм/день)	1,19±0,20	1,56±0,13*	1,60±0,12*
Швидкість остеогенезу	BFR/BV (%/рік)	0,5±0,3	8,5±2,9*	21,4±3,8*
Частота активації	Ac.F (кількість/мм <sup>2</sup> /рік)	1,8±1,0	15,1±5,0*	43,8±10,5*
Площа кістки	B.Ar (мм <sup>2</sup> )	29,1±1,3	33,3±1,9	37,8±2,7*
Площа кісткового мозку	Ma.Ar (мм <sup>2</sup> )	12,7±0,7	11,9±1,0	10,7±1,0
Площа кортикального шару	Ct.Ar (мм <sup>2</sup> )	16,4±0,9	21,3±1,2*	27,1±2,0*
Площа кортикального шару у %	%Ct.Ar (%)	56,4±1,5	64,2±1,6*	71,6±1,5*

Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього для 6 кроликів на групу.  
\*P<0,05 порівняно до контролю. P<0,05 порівняно до групи, яка одержувала РТН(1-34) у дозі 10мкг/кг/день.

Незважаючи на те, що площа кістки (В.Аг) зростала при кожній дозі, значна різниця спостерігалась лише між групою з більшою дозою та контрольною групою (p<0,01). Площа кісткового мозку (Ма.Аг) зменшувалась після обробки, однак значної різниці поміж трьома групами не спостерігалось. Однак площа кортикального шару (Ст.Аг) у групі з більшою дозою була значно більшою ніж у 2 інших групах (p<0,0001 порівняно до контрольної групи, p<0,05 порівняно до групи з нижчою дозою). Ст.Аг у групі з нижчою дозою також була значно вищою ніж у контрольній групі (p<0,05). Подібні ж результати спостерігали і відносно %Ст.Аг.

Пористість кортикального шару (Ст.Ро) у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 10мкг/кг/день, удвічі перевищувала відповідний показник для контрольної групи (p<0,05), у той час як Ст.Ро у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, була у 6 разів вищою ніж у контрольній групі (p<0,01). Однак пористість знаходиться у межах ендокортикального компартменту і, завдяки знаходженню на цій ділянці, навряд чи додає свій внесок до біомеханічної міцності, оскільки РТН також підвищує площу кортикального шару кістки, що відповідає підвищенню моменту інерції поперечного розтину.

Більшість параметрів остеогенезу у губчастій речовині кістки (OS/BS, ObS/BS, OV/TV та MS/BS) зростала у разі обробки за допомогою РТН(1-34) (Таблиця 5). Згадані параметри у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, були значно більшими ніж у 2 інших групах (p<0,01 порівняно до контрольної групи та групи, яка одержувала 10мкг/кг/день за всіма параметрами). Швидкість остеогенезу (BFR/BS) також значно зростала у кроликів, які одержували РТН(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, порівняно до 2 інших груп (p<0,0001 порівняно до обох груп, контрольної та групи, яка одержувала 10мкг/кг/день). Незважаючи на те, що резорбція (ES/BS та Oc.S/BS) зростала у обох групах, які одержували РТН(1-34), лише еродована поверхня (ES/BS) у групі з більшою дозою була значно вищою ніж у контрольній групі (p<0,001). Різниця за товщиною остеїдів (O.Th) між трьома групами не спостерігалась. Незважаючи на ознаки прискореного кісткового метаболізму, відносний об'єм щеток (BV/TV) після обробки за допомогою РТН(1-34) не змінювався. Тунельна резорбція та перитрабекулярний фіброз у жодній групі не спостерігались.

Таблиця 5

Вплив РТН(1-34) на ремоделювання губчастої речовини третього поперекового хребця

Параметри	Скорочення	Контроль	РТН(1-34) 10мкг/кг/день	hPTH(1-34) 40мкг/кг/день
Об'єм кістки	BV/TV (%)	27,5±1,4	30,5±3,4	27,9±3,2
Товщина кісткового брусу	Tb.Th (мкм)	124,8±7,3	147,4±12,7	126,4±13,7
Еродована поверхня	ES/BS (%)	0,5±0,3	1,4±0,3	2,6±0,7*
Поверхня остеокластів	Oc.S/BS (%)	0,4±0,2	0,9±0,3	1,3±0,3
Поверхня остеїдів	OS/BS (%)	5,2±1,3	7,2±1,2	27,7±3,8*
Поверхня остеобластів	Ob.S/BS (%)	1,4±0,6	1,3±0,6	15,3±5,6*
Товщина остеїдів	O.Th (мкм)	5,2±0,5	5,3±0,5	4,4±0,2
Об'єм остеїдів	OV/TV (%)	0,10±0,02	0,13±0,03	0,46±0,07*
Швидкість аппозиції мінеральних речовин	MAR (мкм/день)	1,3±0,2	1,5±0,1	1,7±0,1
Поверхня мінералізації	MS/BS (%)	4,4±1,4	7,4±1,9	24,2±1,5*
Швидкість остеогенезу	BFR/BS (мкм <sup>3</sup> /мкм <sup>2</sup> /рік)	19,7±5,3	38,5±8,9	153,0±15,6*

Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього для 6 кроликів на групу.  
\*P<0,05 порівняно до контролю. P<0,05 порівняно до групи, яка одержувала РТН(1-34) у дозі 10мкг/кг/день.

#### Визначення маси кісток

Показники vBMD та BMC діафізу стегнової кістки, які оцінювались за допомогою pQCT у групі, яка одержувала 40мкг/кг/день, були значно вищими ніж у 2 інших групах (p<0,001 для vBMD та p<0,0001 для BMC порівняно до контрольної групи, p<0,05 для vBMD та p<0,01 для BMC порівняно з групою, яка одержувала нижчу дозу) (Фіг.1А). Показники vBMD та BMC у групі, яка одержувала 10мкг/кг/день, також були значно вищими ніж у контрольній групі (p<0,05 як для vBMD, так і для BMC). Незважаючи на те, що площа діафізу стегнової кістки також зростала дозозалежним чином, статистично значуще зростання спостерігалось лише у групі, яка одержувала дозу 40мкг/кг/день (p<0,05).

Показники aBMD та BMC проксимального відділу стегнової кістки, за даними подвійної рентгенівської абсорбціометри (DXA або pDXA) зростали дозозалежним чином. Статистично значущі різниці aBMD та BMC спостерігались між контрольною групою та групою, яка одержувала дозу 10мкг/кг/день (p<0,05), а також між контрольною групою та групою, яка одержувала дозу 40мкг/кг/день (p<0,001) (Фіг.1В). Статистично значущих різниць за площею кістки серед трьох груп не спостерігалось.

Взагалі, Фігура 1 показує, що BMD (мінеральна густина кісткової тканини) та BMC (вміст мінеральних речовин кісткової тканини) діафізу стегнової кістки (кортикальний шар кістки) (А) та проксимального відділу стегнової кістки (губчаста речовина кістки+кортикальний шар кістки) (В) були значно більшими у тварин, які піддавались обробці РТН, аніж у контрольних тварин при обох дозах. Площа кортикального шару діафізу стегнової кістки у кроликів, які одержували вищу дозу, була значно більшою ніж у контрольних тварин. Статистично значущих різниць за площею проксимального відділу стегнової кістки між групами виявлено не

було. Дані представлено як середне $\pm$ середня квадратична помилка середнього. \* $P<0,05$  порівняно до контролю.  $P<0,05$  порівняно до групи, яка одержувала PTH у дозі 10мкг/кг/день.

Статистично значущих різниць за vBMD, BMC або площею поперекового хребця (L-4), які визначались за допомогою pQCT, серед трьох груп виявлено не було.

#### Біомеханічні випробування

Структурні властивості діафізу стегнової кістки, наприклад, гранична сила, міцність та робота до руйнування, зростали дозозалежним чином (Фіг.2). Фігура 2 показує вплив PTH на механічну міцність та момент інерції поперечного розчину (CSMI) кортикального шару діафізу стегнової кістки. Структурні механічні властивості (незаштриховані стовпчики) та CSMI значно зростали у групі, яка одержувала більш високу дозу, у той час як міцність також значно зростала у групі, яка одержувала меншу дозу. З-посеред внутрішніх властивостей матеріалу (заштриховані стовпчики) лише модуль пружності значно зростав у групі, яка одержувала меншу дозу, у разі порівняння з контрольними тваринами. Модуль пружності у групі, яка одержувала більшу дозу, значно знижувався у порівнянні з групою, яка одержувала меншу дозу. На Фігурі 2: дані представлено як середне $\pm$ середня квадратична помилка середнього. \* означає  $P<0,05$  порівняно до контролю; та <sup>1</sup> означає  $P<0,05$  порівняно до групи, яка одержувала дозу 10мкг/кг/день.

У цьому дослідженні та згідно до результатів, які показано на Фігурі 2, усі параметри були значно вищими у кроликів, які одержували PTH(1-34) у дозі 40мкг/кг/день, аніж у контрольній групі ( $p<0,01$  для граничної сили та роботи до руйнування,  $p<0,05$  для міцності). Міцність у групі, яка одержувала меншу дозу, також була значно вищою, аніж у контрольній групі ( $p<0,05$ ). З-посеред внутрішніх властивостей матеріалу, модуль пружності був значно меншим у кроликів, які одержували 40мкг/кг/день, аніж у тварин, які одержували 10мкг/кг/день ( $p<0,01$ ).

Щодо тіла поперекових хребців, статистично значущих різниць механічних властивостей серед трьох груп виявлено не було.

#### Акустична мікроскопія

Статистично значущих різниць у швидкості звуку або коефіцієнті пружності серед трьох згаданих груп виявлено не було.

#### Обговорення

Скелетна реакція кортикального шару кісток на біосинтетичний hPTH(1-34) залучала як безпосередню регуляцію властивостей матеріалу, так і компенсаторну регуляцію біомеханічних властивостей трубчастих кісток інтактних статевозрілих кроликів. PTH(1-34) підвищував метаболізм кісток та пористість кортикального шару, а у дозі 40мкг/кг зменшував модуль пружності кортикального шару кістки. Однак знижений модуль пружності було більш ніж компенсовано підвищенням апозиції на періостальній та ендокортикальній поверхнях, наслідком чого було значне поліпшення структурної міцності, твердості та роботи до руйнування кортикального шару кісток у кроликів.

Під час цього дослідження з використанням інтактних кроликів, об'єм губчастої речовини поперекового хребця не змінився після обробки за допомогою PTH(1-34), незважаючи на ознаки підвищеного метаболізму кісток. Попереднє використання як моделі остеопенії, присутність інтакортикального ремоделювання та короткий період ремоделювання, разом зі швидким ростом кроликів та раннім скелетним визріванням (на 6-9 місяць), утворили основу для вибору кроликів як моделі для визначення впливу переміжного введення PTH(1-34).

У кроликів може спостерігатись коливання рівнів кальцію у сироватці у широких межах (10-16мг/дл), однак згадані рівні не знаходяться під безпосереднім впливом кількості кальцію у раціоні, що надає ще одну перевагу згаданим моделі. Незважаючи на те, що у кроликів, які одержували PTH(1-34) у дозі 40мкг/кг, були зареєстровані тимчасові значні підвищення (приблизно 1мг/мл), фактичні значення завжди знаходились у відомих фізіологічних межах.

Під час проведення згаданого дослідження унаслідок 140-денного введення біосинтетичного hPTH(1-34) спостерігалось підвищення як інтракортикального остеогенезу, так і остеогенезу на періостальній та ендокортикальній поверхнях. У групі, яка одержувала меншу дозу, спостерігався восьмиразовий зріст інтракортикального As.F, у той час як відповідний показник у групі, яка одержувала більшу дозу, зріс у 20 разів. Наслідком цього було дворазове підвищення пористості кортикального шару великомілкової кістки у групі, яка одержувала меншу дозу, та шестиразове підвищення у групі, яка одержувала більшу дозу. Дані акустичного мікроскопування показують, що пружні властивості самого кісткового матеріалу плечової кістки згаданому впливу не піддавались. Це свідчить про те, що якість внутрішнього кортикального шару кістки була нормальною. Таким чином, незначне зменшення модулю пружності, властивості матеріалу, яка включає проміжки у корковому шарі, повинно пояснюватись підвищеною пористістю.

Підвищена кортикальна пористість була, однак, більш ніж компенсована значним підвищенням MS/BS та BFR/BS як на періостальній, так і на ендокортикальній поверхнях діафізу великомілкової кістки у групі, яка одержувала більшу дозу, наслідком чого виявилось значне збільшення площі кістки. Як і у випадку діафізу стегнової кістки, це підвищить момент інерції поперечного розчину, який є пропорційним жорсткості кістки до вигинання (Фіг.2). Наслідками згаданих змін форми та властивостей матеріалу було підвищення механічної міцності та твердості діафізу стегнової кістки порівняно до контролів, що компенсувало потенційно шкідливі механічні ефекти підвищеної кортикальної пористості.

На завершення, підвищення кісткового метаболізму та кортикальної пористості після обробки за допомогою PTH(1-34) супроводжувалось одночасним збільшенням кістки на періостальній та ендокортикальній поверхнях. Наслідком комбінування згаданих явищ було підвищення ударної в'язкості, межі міцності, твердості та роботи до руйнування стегнової кістки.

#### Приклад 2 - Підвищення міцності та густини кісток у разі введення ghPTH(1-34) мавпам

##### Експериментальні процедури

На живому етапі цього дослідження було використано диких дорослих (з закритим тім'ячком) приматів *Macaca fascicularis* (макак-крабоїдів) масою  $2,77\pm0,03$ кг (середне $\pm$ середня квадратична помилка середнього

[SEM]). Мавп витримували на карантині впродовж 3 місяців, після чого тварин почали годувати раціоном, який включав 0,3% кальцію, 0,3% фосфату та 250 міжнародних одиниць вітаміну D3/100г з даванням фторованої води (1ppm (частин на мільйон) фтору) ad libitum. Вміст кальцію відповідав 1734мг кальцію/2000 калорій. Після 1 місяця на згаданій дієті тварин було розподілено на групи 21 або 22 (група, тварини у складі якої піддавались симульованій операції, та група, тварини у складі якої піддавались оваріоектомії). Підшкірні впорскування носію (контрольні тварини для групи, яка піддавалась симульованій операції, та групи, тварини у складі якої піддавались оваріоектомії) або rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг (PTH1) або 5мкг/кг (PTH5) було розпочато через 24 години після оваріоектомії. Тварин обробляли впродовж 18 місяців (PTH1 та PTH5) або впродовж 12 місяців з подальшим припиненням обробки (PTH1-W та PTH5-W).

Згадані експериментальні групи було поділено, як показано у Таблиці 6.

Таблиця 6

Експериментальні групи для проведення досліджень на приматах

Група	Скорочення	Мавпи на початку дослідження (n=128)	Мавпи під час проведення кінцевих аналізів (n=121)
Симульована оваріоектомізація, носій впродовж 18 місяців	Sham	21	21
Оваріоектомізовані, носій впродовж 18 місяців	OVX	22	20
Оваріоектомізовані, 18 місяців PTH(1-34) у дозі 1мкг/кг/день	PTH1	21	19
Оваріоектомізовані, 12 місяців rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг/день, 6 місяців носій	PTH1-W	21	20
Оваріоектомізовані, 18 місяців rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг/день	PTH5	22	21
Оваріоектомізовані, 12 місяців rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг/день, 6 місяців носій	PTH5-W	21	20

Зразки сироватки та сечі відбирали через 24 години після впорскування носія або rhPTH(1-34) з 3-місячними інтервалами. Для здійснення фармакокінетичних досліджень було розроблено план неінтенсивного відбирання зразків від 5 мавп у кожній групі, яка одержувала rhPTH(1-34). Відбирання зразків (з 0-240-хвилинним часовим інтервалом кожного разу) здійснювали у вихідній точці, через 7 місяців, 11 місяців та 17 місяців. У час 0 та з 6-місячними інтервалами за допомогою подвійної енергетичної рентгенівської абсорбціометри (DXA) визначали загальну кісткову масу скелету та хребетного стовпу (від L-2 до L-4); периферійну кількісну комп'ютерну рентгенографічну томографію (pQCT) було використано для визначення кісткової маси діяфізу та дистального відділу променевих кісток та проксимального відділу великогомілкових кісток. Через 6 місяців та 15 місяців робили біопсію клубової кістки з метою проведення гістоморфометричних досліджень. Усіх тварин забили через 18 місяців.

Біохімічним випробуванням було піддано поперекові хребці (від L-3 до L-4), шийку стегнової кістки, діяфіз плечової кістки та зразок кортикального шару, який було вирізано з діяфізу стегнової кістки (розміри наведено у Таблиці 7). Традиційним статичним та динамічним гістоморфометричним дослідженням було піддано (розміри наведено у Таблиці 11) діяфіз плечової кістки, поперековий хребець L-2, шийку великогомілкової кістки, діяфіз стегнової кістки, діяфіз променевої кістки та дистальний відділ променевої кістки. За допомогою початкового статистичного аналізу усі групи порівняли з оваріоектомізованими тваринами контрольної групи, яким вводили носій. Одержані дані є придатними для додаткового дослідницького аналізу з метою визначення дозозалежності, впливу припинення введення засобу, взаємодії між кінцевими результатами та часових змін за допомогою методів, відомих фахівцям у цій галузі. Усі аналізи було здійснено та визначено за методами, відомими у цій галузі.

Для певних експериментальних завдань кортикальний шар плечової кістки було піддано гістоморфометричному дослідженню та дослідженню за допомогою поляризаційного інфрачервоного мікроскопу з перетворенням Фур'є. Інфрачервону мікроскопію з перетворенням Фур'є було здійснено шляхом пристосування методів, відомих для здійснення такої мікроскопії.

Дослідження з об'ємним моделюванням з кінцевою кількістю елементів

Під час проведення цих досліджень були одержані дані для об'ємного моделювання з кінцевою кількістю елементів на хребцях мавп, яким впродовж 18 місяців вводили PTH. Вирізані хребці L-5 групи оваріоектомізованих тварин (n=7) та групи тварин, які одержували PTH (n=7), у 50% суміші етанолу/фізіологічного розчину піддавали періодичному скануванню з 500мкм кроком засобами кількісного комп'ютерного томографування (QCT, Norland, Ft. Atkinson, штат Вісконсін) з об'ємними елементами зображенням 70×70мкм. Кожен з 500мкм поперечних розтинів аналізували на волюметричну мінеральну густину кісткової тканини (BMD, мг/см<sup>3</sup>), вміст мінеральних речовин кісткової тканини (BMC, мг), поперечну площу (X-площу), об'єм губчастої речовини кістки (BV/TV), товщину кісткових брусів (Tb.Th) та зв'язність (густина вузлів, аналіз міжвузлових перемичок). Елементи зображення під час кожного періодичного сканування усереднювались з одержанням об'ємних елементів зображення 490×490×500мкм. Після цього усі скановані зображення об'єднували і для кожної кістки розробляли триангуляційну поверхневу сітку з використанням алгоритму "крокуючих кубів" (дивись, наприклад, Лоренсен (Lorenson) та Клайн (Cline), 1987, "Marching cubes, a high resolution 3D surface construction algorithm", Computer Graphics, 21, 163-169). Після цього упорядковану версію кожної поверхневої сітки використовували для створення тетраедричної сітки для об'ємного моделювання з кінцевою кількістю елементів.

Модулі Юнга для кожного тетраедричного елементу було одержано з густини вихідного об'ємного елементу зображення, а властивості матеріалу було визначено шляхом випробувань зразку кортикального шару у вигляді бруса, який було вирізано з діяфізу стегнової кістки мавп. Кожну тетраедричну сітку повертали таким чином, щоб нижня поверхня кожного хребця співпадала з площиною. Після цього кожну модель L-5 піддавали лінійному аналізу пружного зусилля, під час якого до верхньої поверхні тіла хребця, перпендикулярно нижній площині, прикладували розподілене навантаження величиною 100Н, у той час як нижню поверхню було зафіксовано у напрямку навантаження. Визначали контури результуючої аксіальної деформації та розподіл BMD, та порівнювали одержані результати між РТН- та оваріоектомізованою групою. При цій роздільній здатності густина кожного об'ємного елементу зображення залежить від ступеню заповненості кожного об'ємного елементу зображення кістковою тканиною, у протилежність до м'якої тканини.

#### Результати

Повідомлені різниці у тексті є статистично значущими,  $p < 0,05$ . Під час проведення дослідження, незалежно від обробки, усі тварини мали 4-9% приріст до початкової маси тіла.

#### Результати аналізів сироватки та сечі

Рівні естрадіолу у сироватці усіх оваріоектомізованих мавп на 3 місяцях та 18 місяцях були нижче за 5пг/мл. У разі порівняння показників кальцієвого гомеостазу з контрольними тваринами, які було піддано симульованій операції, оваріоектомізовані контролі мали нижчі рівні сироваткового кальцію, фосфату та 1,25-дигідроксिवітаміну D, однак не відрізнялись за рівнями ендогенного РТН, циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) у сечі, кальцію у сечі, креатиніну у сечі або азоту сечовини у сироватці при визначенні через 24 години після останнього впорскування. Тварини, які одержували rhPTH(1-34), мали нижчі рівні фосфату у сироватці, нижчі рівні ендогенного РТН та вищі рівні 1,25-дигідроксिवітаміну D та цАМФ у сечі, порівняно з відповідними показниками оваріоектомізованих тварин. Результати аналізу сироваткового маркера остеогенезу показали, що оваріоектомізовані мавпи мали низькі сироваткові рівні загальної лужної фосфатази (ALP) та остеокальцину, порівняно до симульовано оперованих; відповідні рівні у тварин, які одержували rhPTH(1-34) повернулись до рівня симульовано оперованих. Екскретування С-телопептиду (кісткові перекладини) з сечею, який було використано як біохімічний маркер резорбції кісткової тканини, не змінилось під впливом rhPTH(1-34), порівняно до відповідних показників оваріоектомізованих контрольних тварин.

#### Кісткова маса

Загальна скелетна кісткова маса, яку було виражено як загальну тілесну ВМС, значно збільшувалась під впливом РТН(1-34) (Фіг.3). Мінеральна густина (BMD) кісток хребетного стовпу залишалась стабільною у оваріоектомізованих контрольних тварин впродовж 18 місяців, у той час як симульовано оперовані тварини мали приблизно 5% приріст відносно вихідного рівня (Фігури 4А-4С та 5А). rhPTH(1-34) підвищував BMD хребетного стовпу на 7-14% та вміст мінеральних речовин кісткової тканини (ВМС, Фігура 3) усього тіла на 6%, порівняно до вихідних рівнів (Фігури 4А-4С та 5А). Вміст мінеральних речовин кісткової тканини хребетного стовпу також підвищився (Фіг.5А). У приматів, які одержували rhPTH(1-34), величина цих підвищень була значно вищою, ніж відповідні показники оваріоектомізованих контрольних тварин. Вона співпадала (РТН1) або перевищувала (РТН5) відповідний показник симульовано оперованих. rhPTH(1-34) не змінив BMD діяфізу або дистального відділу променевих кісток. Площа поперечних розтинів у групі РТН5 зросла на 7%. У проксимальному відділі великогомілкової кістки не спостерігалось підвищення площі поперечних розтинів, але rhPTH(1-34) підвищив ВМС та BMD, порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин. Через шість місяців після припинення лікування, показники BMD та ВМС кісток хребетного стовпа та шийки стегнової кістки були більшими за відповідні показники оваріоектомізованих контрольних тварин за відсутності змін у кортикальному шарі діяфізу плечової кістки.

#### Міцність кісток

rhPTH(1-34) підвищив міцність ( $F_y$ ) хребців майже на 43% (Таблиці 7 та 8, Фіг.5В). rhPTH(1-34) підвищив міцність шийки стегнової кістки ( $f_u$ ) майже на 12% (Таблиці 7 та 9, Фіг.6А). rhPTH(1-34) не змінив параметри кортикального шару діяфізу плечової кістки (Таблиці 7 та 10) або властивості матеріалу зразків у вигляді балок, яку було вирізано з діяфізу стегнової кістки (Таблиці 7 та 9, Фіг.6В), у разі їхнього порівняння до відповідних показників оваріоектомізованих контрольних тварин. У тварин, які одержували rhPTH(1-34) впродовж 12 місяців з подальшим припиненням введення впродовж 6 місяців, показники міцності кісток залишались значно вищими ніж у оваріоектомізованих контрольних тварин (Таблиці 7-10, Фігури 5В та 6А).

Таблиця 7

Змінні величини для третього та четвертого  
поперекових хребців (L-3 та L-4), діяфізу плечової кістки, проксимального  
відділу шийки стегнової кістки та зразків у форми балки, які було вирізано зі стегнової кістки

Змінна величина	Одиниці	Опис
Поперекові хребці, L-3 та L-4		
A	мм <sup>2</sup>	Площа поперечного розтину
$F_v$	Н	Силою пластичної деформації є сила при 0,2% відхиленні
S	Н/мм	Нахил лінійної ділянки кривої сила-зміщення (твердість)
$\sigma_y$	МПа	Межа плинності
E	МПа	Модуль Юнга
Діяфіз плечової кістки		
t	мм	Середня товщина кортикального шару кістки
$F_u$	Н	Граничною силою є максимальна сила, яку може витримати зразок
S	Н/мм	Нахил лінійної ділянки кривої сила-зміщення (твердість), у

mJ/U	Н/мм	цьому випадку твердість Площа під кривою навантаження-зміщення (U=робота до руйнування)
Проксимальний відділ шийки стегнової кістки F <sub>u</sub>	Н	Граничною силою є максимальна сила, яку може витримати зразок
Зразки у формі балки, які було вирізано з діафізу стегнової кістки σ <sub>H</sub> E u ε <sub>u</sub>	МПа ГПа Дж/м <sup>3</sup>	Межа міцності Модуль Юнга Ударна в'язкість гранична деформація

Таблиця 8

Біохімічні параметри міцності хребетного стовпу (об'єднані показники для поперекових хребців L-3 та L-4) оваріоектомізованих приматів через 18 місяців

Змінна величина (одиниці) <sup>a</sup>	Sham	OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
A (мм <sup>2</sup> )	90,5±2,1 <sup>b</sup>	86,7±2,3	88,3±2,0	90,9±2,3	87,3±2,7	82,8±2,1
F <sub>v</sub> (Н)	1738±52	1499±94 <sup>s</sup>	1915±105 <sup>o</sup>	1899±73 <sup>o</sup>	2113±77 <sup>s,o</sup>	1792±59 <sup>o</sup>
S (Н/мм)	7312±319	5805±476 <sup>s</sup>	7701±474 <sup>o</sup>	7401±452 <sup>o</sup>	8012±367 <sup>o</sup>	7074±314 <sup>o</sup>
σ <sub>v</sub> (МПа)	194±0,6	17,3±1,0	21,9±1,3 <sup>o</sup>	21,1±0,8 <sup>o</sup>	24,6±1,1 <sup>s,o</sup>	21,9±0,9 <sup>o</sup>
E (МПа)	650±32	546±49	717±48 <sup>o</sup>	659±42	759±36 <sup>o</sup>	698±41 <sup>o</sup>

Скорочення: Sham=Симульовано оперовані тварини;

OVX=Оваріоектомізовані контрольні тварини; PTH1=rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH1-W=припинення введення впродовж 6 місяців після лікування rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 12 місяців; PTH5=rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH5-W=припинення введення впродовж 6 місяців після лікування rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 12 місяців.

<sup>a</sup> Дивись Таблицю 4.1 для опису змінних величин.

<sup>b</sup> Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього (SEM) на групу.

<sup>o</sup> Статистично значуща порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин (p<0,05).

<sup>s</sup> Статистично значуща порівняно до симульовано оперованих контрольних тварин (p<0,05).

Таблиця 9

Біомеханічні параметри властивостей матеріалу зразків у формі балок еквівалентного розміру з діафізу стегнової кістки та біомеханічні параметри міцності шийки стегнової кістки оваріоектомізованих приматів через 18 місяців

Змінна величина (одиниці) <sup>a</sup>	Sham	OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
σ <sub>u</sub> (МПа)	222±5 <sup>b</sup>	216±5	222±4	214±6	206±6	208±6
E (ГПа)	17,2±0,6	16,4±0,4	17,1±0,4	16,6±0,6	15,4±0,6 <sup>s</sup>	15,3±0,6 <sup>s</sup>
u (мДж/м <sup>3</sup> )	5,9±0,3	5,8±0,4	6,1±0,4	5,5±0,4	5,4±0,4	6,1±0,4
ε <sub>u</sub>	0,035±0,001	0,035±0,002	0,036±0,002	0,034±0,002	0,034±0,002	0,038±0,002
Проксимальний відділ шийки стегнової кістки F <sub>u</sub>	1288±41	1105±53 <sup>s</sup>	1235±45 <sup>o</sup>	1258±52 <sup>o</sup>	1362±30 <sup>o</sup>	1213±42

Скорочення: Sham=Симульовано оперовані тварини;

OVX=Оваріоектомізовані контрольні тварини; PTH1=rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH1-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 12 місяців; PTH5=rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH5-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 12 місяців.

<sup>a</sup> Дивись Таблицю 4.1 для опису змінних величин.

<sup>b</sup> Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього (SEM) на групу.

<sup>o</sup> Статистично значуща порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин (p<0,05).

<sup>s</sup> Статистично значуща порівняно до симульовано оперованих контрольних тварин (p<0,05).

Таблиця 10

Біомеханічні параметри кортикального шару діалізу плечової кістки оваріоектомізованих приматів через 18 місяців

Змінна величина	Sham	OVX	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
-----------------	------	-----	------	--------	------	--------

(одиниці) <sup>a</sup>						
t (мм)	1,74±0,04 <sup>b</sup>	1,63±0,03 <sup>s</sup>	1,68±0,03	1,66±0,04	1,80±0,04 <sup>o</sup>	1,72±0,05
F <sub>u</sub> (Н)	725±26	636±26	654±23	689±23	680±15 <sup>s</sup>	707±24
S (Н/мм)	601±23	520±26	544±23	573±20	548±18	573±24
U (мДж)	1797±85	1542±92	1641±137	1751±84	1804±99	1775±113

Скорочення: Sham=Симульовано оперовані тварини;

OVX=Оваріоектомізовані контрольні тварини; РТН1=rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 18 місяців; РТН1-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 12 місяців; РТН5=rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 18 місяців; РТН5-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 12 місяців.

<sup>a</sup> Дивись Таблицю 4.1 для опису змінних величин.

<sup>b</sup> Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього (SEM).

<sup>o</sup> Статистично значуща порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин (p<0,05).

<sup>s</sup> Статистично значуща порівняно до симульовано оперованих контрольних тварин (p<0,05).

#### Гістоморфометрія кісток

Незважаючи на більш інтенсивний метаболізм у оваріоектомізованих порівняно до симульовано оперованих контрольних тварин, значного зниження об'єму кісткової тканини клубового гребеню не спостерігалось. Оскільки тетрациклінова мітка, яка вводилась на 6 місяцях, у багатьох тварин не виявлялась, для цієї часової точки визначали лише статичні параметри. Дані статичної та динамічної гістоморфометрії на 15 місяцях показали, що лікування за допомогою rhPTH(1-34) збільшило об'єм губчастої речовини кістки порівняно до оваріоектомізованих тварин та підвищило остеогенез без перевищення параметрами резорбції відповідних показників у оваріоектомізованих контрольних тварин. Швидкість остеогенезу поступово збільшувалась більшими дозами rhPTH(1-34). Незважаючи на те, що об'єм губчастої речовини кістки залишався підвищеним, порівняно до відповідного показника оваріоектомізованих контрольних тварин після припинення введення rhPTH(1-34) після 12 місяців лікування, параметри остеогенезу та резорбції повернулись до рівня, який спостерігався у оваріоектомізованих контрольних тварин, у той час як метаболізм кісток залишався на більш високому рівні порівняно до симульовано оперованих контрольних тварин. rhPTH(1-34) не впливав на мінералізацію, частоту активації або періоди ремоделювання. Різниця у рівновазі (на основі кісткової багатоклітинної одиниці (BMU)) між резорбцією та остеогенезом у окремих тварин не спостерігалось. Узагальнено, rhPTH(1-34) збільшив об'єм губчастої речовини кістки шляхом вибіркового стимулювання остеогенезу.

У кортикальному шарі плечової кістки, де rhPTH(1-34) не викликав значного модифікування показників BMD або міцності, rhPTH(1-34) стимулював зміни у періостальному, ендостальному та інтракортикальному компартментах (Таблиці 11 та 12). Незважаючи на відсутність різниці у загальній площі або площі кісткового мозку між групами, rhPTH(1-34) збільшив площу кортикального шару і групи РТН5 та РТН5-W мали значно більший кортикальний шар, що дозволяє припустити можливість існування більшого моменту інерції поперечного розтину, критерію міцності. Збільшення площі може пояснюватись підвищенням остеогенезом як на періостальній, так і на ендостальній поверхнях (Фіг.7).

Симульовано оперовані контрольні тварини та тварини групи РТН5-W мали зменшені періостальні поверхні мінералізації порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин та інших груп, які одержували rhPTH(1-34). Ендокортикальні поверхні мінералізації були значно більшими у оваріоектомізованих контрольних тварин, порівняно до симульовано оперованих, і rhPTH(1-34) не підвищив згаданого параметру над відповідними параметрами оваріоектомізованих контрольних тварин. Відносно інтракортикального ремоделювання, оваріоектомізовані тварини мали більші резорбційні проміжки і частота активації була більшою у оваріоектомізованих, РТН1 та РТН5 групах, аніж у симульовано оперованих контролів або будь-якої групи з припиненням введення rhPTH(1-34). Оваріоектомізовані тварини мали значно більше мічених остеонів на одиницю площі, аніж симульовано оперовані контрольні тварини і rhPTH(1-34) забезпечив лише незначне перевищення показників оваріоектомізованих контрольних тварин.

Інтракортикальна пористість була більшою у оваріоектомізованих порівняно до симульовано оперованих тварин і не різнилась між оваріоектомізованими контрольними тваринами та тваринами, які входили до складу групи РТН1. Пористість у тварин груп РТН5 та РТН5-W перевищувала відповідний показник у оваріоектомізованих контрольних тварин. Дані досліджень на кроликах дозволяють висунути гіпотезу, суть якої полягає у тому, що згадане підвищення пористості, яке супроводжується збільшенням кортикального шару кістки, може бути структурною реакцією, яка спрямовується на підтримку біомеханічних властивостей кістки, яку було оброблено rhPTH(1-34). Різниць у періоді остеогенезу, ширині остеоїдів, ширині стінок або визріванні остеоїдів у 18 місяців між оваріоектомізованими та іншими групами не спостерігалось.

Узагальнено, не існувало різниць у швидкості метаболізму між оваріоектомізованими контрольними тваринами та тваринами, які одержували rhPTH(1-34) у будь-якій зі згаданих доз. Симульовано оперовані контрольні тварини мали нижчу швидкість метаболізму аніж оваріоектомізовані контрольні тварини або тварини, які одержували rhPTH(1-34). У разі припинення введення rhPTH(1-34) впродовж 6 місяців швидкість метаболізму значно зменшувалась, однак показники BMD та біохімічні параметри міцності залишались вищими, аніж у оваріоектомізованих контрольних тварин. Нормальні показники ширини остеоїдів та часу інтракортикального визрівання для усіх груп вказують на те, що лікування не викликало будь-якого порушення нормального часового проходження процесу мінералізації. Нормальні показники ширини стінки вказують на те, що лікування не змінило нормальної рівноваги між резорбцією та остеогенезом на рівні окремої BMU.

Гістоморфометричні змінні величини параметрів кортикального шару плечової кістки

Змінна величина <sup>a</sup>	Одиниці	Опис
Ac.F	циклів/рік	Частота активації
BFR/BS.Ec	мкм/день	Швидкість остеогенезу, еталон - ендокортикальна поверхня
BFR/BS.Ps	мкм/день	Швидкість остеогенезу, еталон - періостальна поверхня
BFR/BV	%/рік	Швидкість остеогенезу, еталон - об'єм кістки
FP	ДНІ	Період утворення
L.On.N/Ct.A	кількість/мм <sup>2</sup>	Кількість остеонів, мічених фторохромом, на одиницю поверхні кортикального шару кістки
MAR	мкм/день	Швидкість аппозиції мінеральних речовин, інтракортикальна
MAR.Ec	мкм/день	Швидкість аппозиції мінеральних речовин, ендокортикальна поверхня
MAR.Ps	мкм/день	Швидкість аппозиції мінеральних речовин, періостальна поверхня
MS/BS.Ec	%	Мінералізована ендокортикальна поверхня, нормалізована до загальної ендокортикальної поверхні
MS/BS.Ps	%	Мінералізована періостальна поверхня, нормалізована до загальної періостальної поверхні
O.Wi	мкм	Ширина остеїдів
Rs.N/Ct.A	кількість/мм <sup>2</sup>	Кількість проміжків резорбції на одиницю поверхні кортикального шару кістки
W.Wi	мкм	Ширина стінки остеону
omt	дні	Час визрівання остеїду
Po	%	Пористість, відсоток кісткової площі, зайнятий проміжками
B.Ar	мм <sup>2</sup>	Кісткова площа, загальна площа у межах періостальної поверхні
Ct. Ar	мм <sup>2</sup>	Площа кортикального шару кістки, площа кістки у межах періостальної поверхні (з включенням пористості)
Me. Ar	мм <sup>2</sup>	Площа кістково-мозкової порожнини

<sup>a</sup> Номенклатура, рекомендована у Journal of Bone and Mineral Research, 1987.

Таблиця 12

Гістоморфометрія кортикального шару діяфізу  
плечової кістки оваріоектомізованих приматів у 18 місяців (n=121)

Змінна величина (одиниці) <sup>a</sup>	Sham	ovx	PTH1	PTH1-W	PTH5	PTH5-W
Ac.F	1,85±1,87 <sup>a,c</sup>	6,06±3,31	7,69±4,96	3,05±2,15 <sup>a</sup>	8,70±3,97	2,05±1,46 <sup>a</sup>
BFR/BS.Ec	7,08±3,80	20,93±19,23	18,14±13,95	14,89±10,32	34,04±19,01	12,73±16,33 <sup>a</sup>
BFR/BS.Ps	3,79±3,07	9,12±7,58	8,53±10,54	3,60±3,84 <sup>a</sup>	8,99±5,81	5,79±4,05
BFR/BV	2,13±2,06 <sup>a</sup>	9,16±5,37	9,23±5,93	4,39±3,48 <sup>a</sup>	12,93±5,94 <sup>a</sup>	2,21±1,73 <sup>a</sup>
FP	82,73±41,06	65,94±19,79	63,44±10,02	64,94±11,99	81,97±97,63	88,63±52,90
L.On.N/Ct.A	0,28±0,27 <sup>a</sup>	1,03±0,52	1,26±0,71	0,50±0,36 <sup>a</sup>	1,45±0,47 <sup>a</sup>	0,38±0,26 <sup>a</sup>
MAR	0,91±0,33 <sup>a</sup>	1,07±0,19	0,98±0,12 <sup>a</sup>	1,06±0,27	1,03±0,23	0,85±0,28 <sup>a</sup>
MAR.Ec	0,48±0,19 <sup>a</sup>	0,75±0,25	0,66±0,15	0,66±0,16	0,75±0,14	0,63±0,17
MAR.Ps	0,62±0,24	0,69±0,23	0,89±0,95	0,54±0,15 <sup>a</sup>	0,66±0,17	0,82±0,15
MS/BS.Ec	3,09±6,49 <sup>a</sup>	20,99±18,04	25,19±17,14	11,74±14,41 <sup>a</sup>	40,47±24,68 <sup>a</sup>	8,93±15,39 <sup>a</sup>
MS/BS.Ps	1,81±3,59 <sup>a</sup>	10,03±10,49	8,59±5,73	3,86±4,83 <sup>a</sup>	11,00±9,63	2,30±3,76 <sup>a</sup>
O.Wi	3,77±0,92	4,04±0,91	3,66±0,67	3,96±0,83	3,94±1,13	3,76±0,83
Rs.N/Ct.A	0,12±0,17 <sup>a</sup>	0,21±0,13	0,28±0,18	0,12±0,07 <sup>a</sup>	0,43±0,26 <sup>a</sup>	0,19±0,18
W.Wi	63,23±13,61	68,63±15,09	61,36±7,79	63,12±17,35	65,28±9,43	63,82±8,31
omt	4,58±1,26 <sup>a</sup>	3,87±1,04	3,76±0,70	3,86±0,74	6,45±13,85	5,07±2,65
Po	1,32±0,60 <sup>a</sup>	2,61±1,40	4,65±4,78	2,23±1,60	6,78±4,23 <sup>a</sup>	6,40±4,22 <sup>a</sup>
B.Ar	53,12±5,50	52,82±7,09	54,22±5,97	54,94±6,55	55,81±6,24	58,16±8,79 <sup>a</sup>
Ct. Ar	37,40±3,75	33,35±5,04	37,61±3,86	38,10±4,83	40,96±4,30 <sup>a</sup>	40,83±5,80 <sup>a</sup>
Me. Ar	15,72±4,07	17,47±4,22	16,61±3,77	16,84±3,74	14,85±4,72 <sup>a</sup>	17,34±6,05

Скорочення: Sham=Симульовано оперовані тварини;

OVX=Оваріоектомізовані контрольні тварини; PTH1=rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH1-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 1мкг/кг впродовж 12 місяців; PTH5=rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 18 місяців; PTH5-W=припинення введення після лікування rhPTH(1-34) у дозі 5мкг/кг впродовж 12 місяців.

<sup>a</sup> Статистично значуща порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин (p<0,05).

<sup>b</sup> Дивись Таблицю 4.2 для опису змінних величин.

<sup>c</sup> Дані представлено як середнє±середня квадратична помилка середнього (SEM).



Результати аналізу засобами гістоморфометрії та поляризаційної інфрачервоної мікроскопії з перетворенням Фур'є показали, що введення РТН поліпшувало якість кісток завдяки заміщенню старої кісткової тканини (кристаліти великого розміру) молодію кістковою тканиною (кристаліти різного розміру зі схильністю до меншого). На додаток до цього після припинення введення РТН мавпам, які одержували малі дози, з'являється додаткова вигода, оскільки матрикс стає оптимально мінералізованим і кристаліти визрівають. Дані, які було одержано засобами гістоморфометрії та поляризаційної інфрачервоної мікроскопії з перетворенням Фур'є, показали неочікувану вигоду для якості кортикального шару кістки, яка полягає у тому, що у той час коли відбувається оптимальна мінералізація, мінеральна фаза визріває.

Дослідження з об'ємним моделюванням з кінцевою кількістю елементів

Дослідження середнього 500мкм зрізу L-5 показало 21% підвищення BMD для РТН порівняно до оваріоектомізованих тварин, що було обумовлено 27% зростанням BMC без зміни площі поперечного розтину. Аналіз тіла хребця з РТН показав 73% зростання BV/TV, що було обумовлено 30% збільшенням Tb.Th та Tb.N, яке перевищувало на 37% відповідний показник оваріоектомізованих тварин. Аналіз зв'язності для цієї ділянки показав для хребців з РТН на 140% більшу густину вузлів (вузол/об'єм тканини) та більшу на 286% кількість міжвузлових перемичок.

Гістограмний аналіз розподілу густини об'ємних елементів зображення кістки для РТН показав зменшення пропорції низької густини ( $0-355\text{мг/см}^3$ ) та підвищення середньої густини ( $356-880\text{мг/см}^3$ ) з незначним впливом на об'ємні елементи зображення з високою густиною ( $887-1200\text{мг/см}^3$ ) порівняно до оваріоектомізованих тварин (Фіг.8). Найбільш вражаючим був зсув до більшої густини об'ємного елемента зображення кортикального шару кістки після припинення лікування впродовж 6 місяців (Фіг.8).

Було вираховано пропорцію елементів хребцевої кістки (об'ємні елементи зображення), які знаходились у межах певного діапазону значень BMD. Обрані діапазони BMD виглядали наведеним далі чином: низька BMD,  $0-300\text{мг/см}^3$ ; середня BMD,  $300-700\text{мг/см}^3$ ; висока BMD,  $700-1000\text{мг/см}^3$ ; та кортикальна BMD  $>1000\text{мг/см}^3$  (Таблиця 13). Порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин, обробка РТН значно знизила об'єм кісток з низькою BMD та підвищила об'єм кісток з середньою BMD. Після припинення введення РТН спостерігалось зниження кісток з середньою BMD та підвищення кісток з високою BMD, що вказувало на підвищення густини кісток з середньою BMD.

Таблиця 13

Відсотки об'єму хребців L5, згруповані за значеннями BMD (середнє±середня квадратична помилка середнього)

Лікування	Низька BMD (%)	Середня BMD (%)	Висока BMD (%)	BMD кортикального шару кістки (%)
Оваріоектомізовані	30,4±2,2	48,7±1,6	19,9±1,2	0,9±0,3
РТН	17,7±1,6*	58,9±1,9*	22,8±2,7	0,6±0,3
РТН-W	22,4±1,3*	49,7±1,2	27,0±1,6*	0,8±0,2

Таблиця 14

BMC на середньому рівні хребця L5 та результативна деформація хребця

Лікування	BMC (мг)	Результативна деформація (гранична деформація)
Оваріоектомізовані	37,2±1,6	701±64
РТН	47,4±1,5*	447±36*
РТН-W	44,2±1,2*	539±34*

\* статистично різні ( $p<0,05$  за частковим випробуванням за Фішером з середнім квадратичним відхиленням).

Дані, які узагальнено на Фігурі 8, показують, що хребець L-5 мавп *Macaca fascicularis* (макак-крабодів), яким впродовж 18 місяців вводили РТН, відреагував значним підвищенням кісткової маси, товщини кісткового бруса, зв'язності кісткових брусів, з незначним впливом на зовнішні розміри (Х-площа) хребця. Аналіз розподілу кісткових елементів у L-5 показав, що сильно мінералізовані ділянки кістки піддались найменшим змінам без ознак остеосклерозу. Скоріше максимальну реакцію на РТН продемонструвала пориста губчаста кістка. Зміщення BMD обумовило значне зниження аксіальної деформації, що свідчить про поліпшення механічних властивостей. Як чітко показано на гістограмах BMD оваріоектомізованих тварин та тварин, які одержували РТН, паратиреоїдний гормон перетворив об'ємні елементи зображення кісток низької густини на об'ємні елементи зображення середньої густини без значного впливу на об'ємні елементи зображення високої густини.

Дані, які узагальнено у Таблиці 2, показують, що BMC у середній частині хребців було значно підвищено обробкою за допомогою і благотворний ефект РТН залишився після 6 місяців припинення його введення. Середню механічну деформацію хребця було знижено на 36% завдяки лікуванню за допомогою і цей показник був на 23% нижче за відповідний показник для оваріоектомізованих тварин після припинення введення РТН. Результати цього дослідження показують, що припинення лікування за допомогою РТН на 6 місяців не спричинювало резорбції новоутвореної кістки. Замість цього спостерігався корисний перерозподіл кісток середньої густини на кістки нижчої та вищої густини. Наслідком цього перерозподілу є постійне зниження

деформації і, таким чином, поліпшення механічної функції.

Результати цього дослідження на приматах показують, що РТН, у разі його введення за відсутності інших медикаментів, які могли б вплинути на кістки, благотворно впливає як на кортикальний шар кісток, так і на губчасту кістку з підвищенням загальної кісткової маси скелету. Більше того, припинення введення РТН не викликає значної втрати благотворного впливу, який пов'язано з лікуванням за допомогою РТН, впродовж як мінімум 2 циклів ремоделювання.

Під час проведення інших випробувань для індикації активності у кістках було використано сурогатні маркери. Приймали, що зміна параметру відбиває зміни кісткової маси. Незважаючи на існування опублікованих даних, які було одержано на людях та приматах, та які вказують на підвищення маркерів утворення та резорбції кісткової тканини, що відповідає активації кісткового метаболізму, наприклад, на початковому етапі менопаузи або на активному етапі хвороби, високий рівень метаболізму розглядається як свідчення rareфікації кісткової тканини. Високий рівень метаболізму під час визрівання людського скелету у підлітковому віці було досліджено з меншою докладністю, однак він супроводжується анаболічним приростом кісткової маси. Таке явище, відповідно до сучасного стану у цій галузі, було б повністю неочікуваним у фармакотерапії остеопорозу. Таким чином, підвищення маркерів кісткового метаболізму не співпадає з відомим анаболічним ефектом РТН, який полягає у підвищенні маси та міцності кісток, як показано даними цього дослідження.

Дані цього 18-місячного дослідження на макаках-крабоїдах підтримують неочікувані результати, які наведено далі:

- Загальне значне підвищення повної скелетної маси.
- Значне підвищення маси та міцності шийки стегнової кістки.
- Відсутність ознак "крадіжки" кортикального шару кісток для збільшення губчастої кістки. Підвищення маси та міцності кісток було статистично значущим на ділянках, зі збагаченням або кортикального шару (шийка стегнової кістки), або губчастої кістки (поперекові хребці). На ділянках чисто кортикального шару (середня частина діяфізу стегнової кістки) спостерігалась схильність РТН до стабілізування або незначного збільшення маси та міцності кісток, порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин.
- Зміни кісткових маркерів у оваріоектомізованих мавп (та людей) не відбивають благодійного анаболічного впливу РТН на скелет. Використання загальної води організму приматів у цьому дослідженні забезпечує можливість розробки нових та більш придатних сурогатних маркерів.
- Збереження приросту кісткової маси та міцності впродовж як мінімум 2 циклів ремоделювання після припинення лікування.

Результати цього дослідження РТН на приматах відрізняються від опублікованих результатів досліджень на макаках-резус та макаках-крабоїдах тим, що у цьому дослідженні було використано зразки великого розміру для одержання відповідної потужності статистики для виявлення різниць, які не могли бути явними у попередніх, набагато менших, дослідженнях; контролі включали як оваріоектомізованих приматів (які було використано у опублікованих дослідженнях), так і симульовано оперованих, однак інтактних приматів. Про останню контрольну групу раніше у дослідженнях такого типу не повідомлялось, завдяки чому деякі благотворні ефекти РТН та відновлення певних параметрів до рівнів симульовано оперованих контрольних тварин було визначено вперше.

Це 18-місячне дослідження на статевозрілих, диких, оваріоектомізованих (OVX) мавпах *Macaca fascicularis* (макаках-крабоїдах) забезпечило ефективне одержання надійних результатів лікування за допомогою rhPTH(1-34) впродовж 12 місяців з подальшим припиненням лікування на 6 місяців, або лікування впродовж 18 місяців. rhPTH(1-34) значно підвищував масу та міцність кісток хребетного стовпу та шийки стегнової кістки порівняно до оваріоектомізованих контрольних тварин, до рівнів, еквівалентних або більших за рівні симульовано оперованих контрольних тварин. У оваріоектомізованих мавп, які одержували rhPTH(1-34), параметри кальцієвого гомеостазу (рівень кальцію, фосфату та 1,25-дигідроксिवітаміну D у сироватці) було відновлено до рівнів симульовано оперованих контрольних тварин. Параметри сироватки, сечі та гістоморфометрії, які було використано для оцінки кісткового метаболізму, показали, що rhPTH(1-34) підтримував швидкість остеогенезу на рівні, еквівалентному або вищому за рівні оваріоектомізованих контрольних тварин, у той час як біохімічні маркери резорбції кісток залишались еквівалентними маркерам симульовано оперованих контрольних тварин. Фармакокінетичні параметри усіх тварин, які одержували rhPTH(1-34) до 18 місяців, з часом не змінювались, і накопичення rhPTH(1-34) не спостерігалось. Після 18-місячного лікування ознак тривалої гіперкальціємії або патології нирок не спостерігалось. Змін періодів мінералізації або ремоделювання не спостерігалось. Чисте збільшення вмісту мінеральних речовин скелетних кісток, яке спостерігалось під час лікування rhPTH(1-34), може пояснюватись підвищенням швидкості остеогенезу та збільшенням поверхні остеогенезу з незначним або з повною відсутністю впливу на резорбцію кісткової тканини. Спостерігалось значне підвищення вмісту мінеральних речовин кісткової тканини, мінеральної густини кісткової тканини та біохімічних параметрів міцності, у тому числі ударної в'язкості та твердості, на клінічно важливих ділянках, наприклад, хребтового стовпу, шийки стегнової кістки та проксимального відділу великогомілкової кістки.

rhPTH(1-34) підвищив інтенсивність метаболізму кортикального шару діяфізу плечових та променевих кісток, однак, не викликав значної зміни кісткової маси або біохімічних параметрів міцності, порівняно до оваріоектомізованих або симульовано оперованих контрольних тварин. Однак збільшення ширини та/або площі кортикального шару співпадає з підвищенням моменту інерції поперечного розтину, параметру міцності та твердості. rhPTH(1-34) не справив значного впливу на внутрішні властивості матеріалу кортикального шару кісток. Було стимульовано ендокортикальний остеогенез, завдяки чому зросла ширина кортикального шару та інтракортикальна пористість. Видається, що ці зміни пористості є відповідальними за підтримання пружності кістки.

У мавп 12-місячне лікування за допомогою rhPTH(1-34) з подальшим припиненням лікування на 6 місяців пов'язувалось з невеликим, але усе ж таки значущим, приростом маси та міцності кісток хребетного стовпа та

шийки стегнової кістки. Після припинення лікування не спостерігалось значного впливу на кортикальний шар діафізу плечових та променевих кісток. Кісткові маркери та гістоморфометричні параметри продемонстрували схильність до повернення до низьких рівнів метаболізму, які реєструвались у симульовано оперованих контрольних тварин.

Результати механістичних досліджень на гризунах *in vivo* показали, що гени, пов'язані з анаболічними наслідками rhPTH(1-34), активуються впродовж 1-6 годин і збільшення поверхні остеогенезу може бути виявленим у межах 24 годин після першої дози за відсутності явного впливу на резорбцію. rhPTH(1-34), здається, рекрутує недиференційовані клітини-попередники остеоцитів у S-фазі та стимулює їхню диференціацію на остеобласти і, тим самим, забезпечує швидке збільшення відсоткової поверхні остеогенезу. Для індукування анаболічного ефекту у кістках у межах 1-годинного періоду може здійснюватись разове або багаторазове впорскування rhPTH(1-34). Однак у разі, коли еквівалентна доза вводиться молодим пацієнтам шляхом численних впорскувань впродовж 6 годин або 8 годин, анаболічний ефект нейтралізується, що дозволяє зробити припущення про те, що індукування анаболічного ефекту потребує обмеженого впливу rhPTH(1-34).

Узагальнено, rhPTH(1-34) є анаболіком для кісток мавп та кроликів. Цей гормон збільшує кісткову масу та підвищує біомеханічні параметри міцності на клінічно важливих ділянках, наприклад, на поперековій ділянці хребтного стовпа та на шийці стегнової кістки, шляхом вибіркового стимулювання остеогенезу. Стимулювання кісткового метаболізму, утворення ендокортикальної поверхні та пористості, яке виявляється засобами гістоморфометрії на ділянках кортикального шару кісток, не змінює кісткову масу або біомеханічні параметри міцності кісток, але збільшує момент інерції поперечного розчину шляхом збільшення площі та/або ширини кортикального шару кісток.

Результати цих досліджень показують, що введення активаторів рецептору паратиреоїдного гормону, наприклад, рекомбінантного людського PTH(1-34), поліпшує якість кісток як під час так і після лікування. Фактично, введення PTH один раз на день впродовж 18 місяців або у таких же самих дозах впродовж 12 місяців з подальшим 6-місячним припиненням введення продемонструвало, за результатами гістоморфометричного аналізу та поляризаційної інфрачервоної мікроскопії з перетворенням Фур'є (FTIR), явно виражене поліпшення якості кортикального шару плечової кістки. Результати цього аналізу показали, що введення PTH поліпшувало якість кістки завдяки заміщенню старої кісткової тканини (кристаліти великого розміру) молодією кістковою тканиною (кристаліти різного розміру зі схильністю до меншого). Таким чином, введення PTH може підвищити якість кортикального шару кістки, поліпшити та прискорити мінералізацію та заміну старої кісткової тканини на нову.

На додаток до цього після припинення введення PTH мавпам, які одержували малі дози, з'являється додаткова вигода, оскільки матрикс стає оптимальніше мінералізованим і кристаліти визрівають. Тобто у малих дозах PTH може забезпечувати додаткову вигоду під час припинення лікування шляхом стимулювання мінералізації. Ці дані вказують на вигоду кінцевого режиму лікування за допомогою PTH з подальшим періодом припинення лікування для одержання посиленої вигоди. Сучасні визначення якості кісток не включають ці аспекти поліпшеної мінералізації.

У попередніх дослідженнях лікувального етапу PTH з подальшим етапом припинення лікування, тривалість згаданого лікувального етапу була меншою за 1 місяць. Тривалий але кінцевий 18-24-місячний етап лікування з подальшим періодом, тривалість якого дорівнює як мінімум 2 циклам ремоделювання, раніше не досліджувався. Подальший благотворний вплив на приматів після припинення лікування знаходиться у явному протиріччі з результатами, які було одержано на гризунах при введенні PTH. Результати досліджень на гризунах однозначно показали, що кісткова тканина після припинення лікування піддається прискореній рарефікації. Ганнес-Хі М. (Gunnness-Hey M.) та Хок Дж.М. (Hock J.M.) (1989) Bone, 10: 447-452; Шен В. (Shen V.) та інші, (1993) J.Clin. Invest, 91: 2479-2487; Шен В. (Shen V.) та інші, (1992), Calcif. Tissue Int., 50: 214-220; та Москілд Л. (Mosekilde L.) та інші, (1997), Bone, 20: 429-437.

Такий спосіб стимулювання мінералізації кісткової тканини раніше не спостерігався і є неочікуваним. Це новий спосіб, завдяки якому PTH забезпечує підвищення міцності та твердості кістки та може запобігати переломам. Цей новий спосіб включає посилення та регулювання мінералізації з одержанням твердішої, міцнішої та стійкішої до переломів кістки. Такий благотворний вплив потребує більше, ніж утворення нового матриксу. Ці дані вказують на те, що PTH може бути корисним для пацієнтів з імобілізованими кістками або скелетом, або для скелетів з дефіцитом мінеральних речовин, за умови забезпечення адекватного додаткового введення кальцію та вітаміну D.

Приклад 3. Підвищення міцності та густини кісток та зменшення кількості випадків переломів в разі введення rhPTH(1-34) людям

Кількість суб'єктів:	RhPTH(1-34): 1093 на початку, 848 у кінці. Плацебо: 544 на початку, 447 у кінці.
Критерії діагностування та включення:	Жінки віком від 30 до 85 років, постклімактеричні впродовж як мінімум 5 років з як мінімум одним середньої тяжкості або двома легкими атравматичними переломами хребців.
Дозування та введення:	Експериментальний продукт (сліпий метод) RhPTH(1-34): 20мкг/день, підшкірно rhPTH(1-34): 40мкг/день, підшкірно Еталонна терапія (сліпий метод) Експериментальний матеріал (плацебо) для впорскування.
Тривалість лікування:	rhPTH(1-34): 17-23 місяці (за виключенням 6-місячного припинення лікування) Плацебо: 17-23 місяці (за виключенням 6-місячного припинення лікування)
Критерії оцінки:	Рентгенографія хребтного стовпа; біологічні маркери сироватки (кальцій,

	кістковоспецифічна лужна фосфатаза, проколаген I, карбоксикінцевий пропептид); маркери сечі (кальцій, N-телопептид, вільний деоксипіридинолін); 1,25-дигідроксिवітамін D; мінеральна густина кісткової тканини; хребетний стовп, тазостегновий суглоб, зап'ястя та тіло у цілому; зріст; популяційна фармакокінетика; біопсія кісток (вибрані ділянки).
--	---

#### Характеристики пацієнтів

	Плацебо (N=544)	PTH-20 (N=541)	PTH-40 (N=552)	Значення p
Білі	98,9%	98,9%	98,4%	0,672
Вік	69,0±7,0	69,5±7,1	69,9±6,8	0,099
Кількість постклімактеричних років	20,9±8,5	21,5±8,7	21,8±8,2	0,273
Гістеректомізовані	23,8%	23,1%	21,6%	0,682
Матка+0 або 1 яєчник	57	51	58	
Матка+2 яєчники	61	57	51	
Невідомо	11	17	10	
Попереднє застосування ліків проти остеопорозу	14,9%	15,5%	13,0%	0,479
Вихідна BMD хребетного стовпа	0,82±0,17	0,82±0,17	0,82±0,17	>0,990
Вихідна кількість переломів хребців				
0	54 (10,4%)	45 (8,8%)	54 (10,1%)	
1	144 (27,8%)	159 (31,1%)	169 (31,6%)	
2	128 (24,7%)	128 (25,0%)	125 (23,4%)	
3	75 (14,5%)	67 (13,1%)	81 (15,1%)	
4	59 (11,4%)	49 (9,6%)	45 (8,4%)	
5	28 (5,4%)	31 (6,1%)	21 (3,9%)	
6	13 (2,5%)	20 (3,9%)	25 (4,7%)	
7	6 (1,2%)	7 (1,4%)	10 (1,9%)	
8	9 (1,7%)	5 (1,0%)	3 (0,6%)	
9	1 (0,2%)	0	2 (0,4%)	
10	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0	
Не визначено	26	29	17	

#### Результати

Під час проведення клінічних випробувань, у яких у цілому приймало участь 1637 жінок, яких лікували людським паратиреоїдним гормоном (1-34), rhPTH(1-34) у дозі 0мкг/день, 20мкг/день або 40мкг/день та які додатково одержували вітамін D та кальцій, було одержано результати, які наведено у Таблицях 15-19.

У Таблиці 15 наведено дані, які показують зниження кількості та тяжкості переломів хребців після лікування PTH. Порівняння усіх результатів, які було одержано на пацієнтах, яких лікували за допомогою PTH, з результатами, які було одержано на пацієнтах, яким вводили плацебо, показало, що загальне зниження кількості пацієнтів з вертебральними переломами становило 67% ( $p<0,001$ ), з 65% зниженням ( $p<0,001$ ) у разі лікування за допомогою PTH у дозі 20мкг/день, порівняно до плацебо, та 69% зниженням у разі лікування за допомогою PTH у дозі 40мкг/день, порівняно до плацебо (Таблиця 15). Порівняння усіх результатів, які було одержано на пацієнтах, яких лікували за допомогою PTH, з результатами, які було одержано на пацієнтах, яким вводили плацебо, показало, що загальне зниження кількості пацієнтів з множинними вертебральними переломами становило 81% ( $p<0,001$ ), з 77% зниженням ( $p<0,001$ ) у разі лікування за допомогою PTH у дозі 20мкг/день, порівняно до плацебо, та 86% зниженням у разі лікування за допомогою PTH у дозі 40мкг/день, порівняно до плацебо. Порівняння усіх результатів, які було одержано на пацієнтах, яких лікували за допомогою PTH, з результатами, які було одержано на пацієнтах, яким вводили плацебо, показало, що загальне зниження кількості пацієнтів з вертебральними переломами з тяжкістю від помірної до тяжкої становило 84% ( $p<0,001$ ), з 90% зниженням ( $p<0,001$ ) у разі лікування за допомогою PTH у дозі 20мкг/день, порівняно до плацебо, та 78% зниженням у разі лікування за допомогою PTH у дозі 40мкг/день, порівняно до плацебо (Таблиця 15).

Таблиця 15

#### Вплив лікування за допомогою PTH на кількість випадків та тяжкість вертебральних переломів

	Плацебо (n*=448)	20мкг/день PTH(n=444)	40мкг/день PTH(n=434)
Кількість та відсоток пацієнтів з новими вертебральними переломами	64 (14,3%)	22 (5,0%)	19 (4,4%)
Кількість та відсоток пацієнтів з 2 або більше новими вертебральними переломами	22 (4,9%)	5 (1,1%)	3 (0,7%)
Кількість та відсоток пацієнтів з новими переломами від помірних до тяжких**	42 (9,4%)	4 (0,9%)	9 (2,1%)

\*n=кількість пацієнтів з початковими та кінцевими рентгенограмами;

\*\* Наслідком перелому помірної тяжкості є втрата висоти (або еквівалентний параметр) хребця, яка

перевищує 25%. Наслідком тяжкого перелому є втрата висоти (або еквівалентний параметр) хребця, яка перевищує 40%. Переломи відповідають опису, який було наведено у роботі Дженана (Genant) та інших, (1993), Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique; J. Bone&Min. Res., 81137-1148.

Таблиця 16 ілюструє вплив лікування за допомогою РТН на кількість випадків переломів різноманітних неverteбральних кісток у всьому тілі. Кількість випадків переломів (тазостегновий суглоб, променеві кістки, гомілковостопний суглоб, плечові кістки, ребра, стопа, таз та інші ділянки) явно зменшилась (Таблиця 16). Згадане зменшення є статистично значущим, якщо воно розглядається як зниження загальної кількості переломів серед пацієнтів, які одержували лікування за допомогою РТН, порівняно до пацієнтів, які одержували плацебо. Згадане зниження стає ще більш значущим, коли розглядається як зниження загальної кількості випадків переломів тазостегнового суглобу, променевої кістки, гомілковостопного суглобу, плечової кістки, ребер, стоп та тазу серед пацієнтів, які одержували лікування за допомогою РТН, порівняно до пацієнтів, які одержували плацебо (Таблиця 16).

Таблиця 16

Вплив лікування за допомогою РТН на кількість випадків неverteбральних переломів

	Плацебо (N=544)	РТН-20 (N=541)	РТН-40 (N=552)	Значення р			
				Разом	РТН- плацебо*	20- плацебо	40- плацебо
Ребро	4	2	3	0,718	0,474	0,417	0,690
Променева кістка	13	7	10	0,404	0,236	0,180	0,504
Гомілковостопний суглоб	4	2	2	0,601	0,313	0,417	0,403
Плечова кістка	5	4	3	0,767	0,534	0,744	0,465
Ребра	10	5	5	0,277	0,109	0,197	0,184
Стопа	4	1	4	0,374	0,474	0,181	0,983
Таз	3	1	0	0,171	0,076	0,319	0,081
Інше	16	14	9	0,338	0,296	0,723	0,146
Разом	53	34	32	0,024	0,007	0,036	0,015
Разом, за виключенням "інше"	41	21	24	0,013	0,003	0,010	0,025

\* Плацебо

Вплив РТН на вміст мінеральних речовин кісткової тканини (ВМС), мінеральну густину кісткової тканини (BMD) та площу кістки визначали за допомогою подвійної енергетичної абсорбціометри (DEXA); одержані результати наведено у Таблицях 17-19. Введення РТН викликало явне підвищення ВМС у поперековому відділі хребетного стовпа, стегновій кістці та тазостегновому суглобі, зап'ясті та у всьому тілі пацієнта (Таблиця 17). Лікування за допомогою РТН викликало значне підвищення BMD у поперековому відділі хребетного стовпа, стегновій кістці та тазостегновому суглобі пацієнта (Таблиця 18). Підвищення у поперековому відділі хребетного стовпа, стегновій кістці та тазостегновому суглобі пацієнта було статистично значущим з  $p < 0,001$  (Таблиця 18). Лікування за допомогою РТН викликало значне підвищення площі кісток поперекового відділі хребетного стовпа, стегновій кістці та тазостегновому суглобі пацієнта (Таблиця 19). Згадане підвищення було статистично значущим для поперекового відділу хребетного стовпа та шийки тазостегнового суглобу (Таблиця 19).

Особливо значним є вплив РТН на тіло у цілому, кількісні та якісні параметри кісток та ВМС. Згаданий вплив на тіло у цілому вказує на те, що об'єм кісток у тілі пацієнта зростає. Наслідком лікування за допомогою РТН є не просто переміщення кісткової маси з однієї частини тіла пацієнта до іншої. Навпаки, лікування за допомогою РТН підвищує об'єм та якість кісток у тілі пацієнта.

Фігури 9 та 10 ілюструють підвищення з часом BMD поперекового відділу хребетного стовпа та BMD шийки стегнової кістки/тазостегнового суглобу, відповідно, у пацієнтів, які одержують лікування за допомогою РТН, та контрольних пацієнтів, які одержують плацебо. BMD поперекового відділу хребетного стовпа пацієнту постійно зростає впродовж як мінімум приблизно 18 місяців з подальшою відсутністю або менш значним зростанням впродовж подальших місяців. BMD стегнової кістки/тазостегнового суглобу пацієнта явно зростає впродовж як мінімум 18 місяців і може зростати у разі подальшого лікування за допомогою РТН.

Таблиця 17

Вплив РТН на вміст мінеральних речовин кісткової тканини,  
який виражено як кінцеву % різницю (середнє квадратичне відхилення) з вихідним рівнем

	Плацебо	РТН-20	РТН-40	Значення р
Поперековий відділ хребетного стовпа	1,60 (6,92)	11,85 (8,83)	16,62(11,1)	<0,001
Стегнова кістка/ тазостегновий суглоб				
Разом	-0,38 (5,18)	3,50 (6,26)	4,78 (6,70)	<0,001
Шийка	-0,51 (7,06)	2,99 (7,26)	5,80 (8,71)	<0,001
Вертелюг стегнової кістки	0,98 (14,97)	5,68 (15,58)	6,53 (15,33)	<0,001
Міжвертелюжний	-0,23 (6,28)	3,59 (7,32)	4,99 (7,79)	<0,001
Трикутник Уорда	0,01 (14,75)	5,36 (14,78)	8,86 (17,02)	<0,001

Зап'ястя				
Ультрадистальний відділ	-1,67 (7,44)	-0,25 (6,53)	-1,88 (7,97)	0,184
1/3 променевої кістки	-1,19 (6,12)	-1,37 (4,51)	-3,04 (6,09)	0,025
Тіло у цілому	-0,74 (4,76)	1,30 (4,48)	2,28 (5,44)	<0,001

Таблиця 18

Вплив РТН на мінеральну густину кісткової тканини,  
яку виражено як кінцеву % різницю (середнє квадратичне відхилення) з вихідним рівнем

	Плацебо	РТН-20	РТН-40	Значення р
Поперековий відділ хребетного стовпа	1,13 (5,47)	9,70 (7,41)	13,7 (9,69)	<0,001
Стегнова кістка/ тазостегновий суглоб				
Разом	-1,01 (4,25)	2,58 (4,88)	3,60 (5,42)	<0,001
Шийка	-0,69 (5,39)	2,79 (5,72)	5,06 (6,73)	<0,001
Вертелюг стегнової кістки	-0,21 (6,30)	3,50 (6,81)	4,40 (7,45)	<0,001
Міжвертелюжний	-1,29 (4,53)	2,62 (5,52)	3,98 (5,96)	<0,001
Трикутник Уорда	-0,80 (11,73)	4,19 (11,93)	7,85 (13,24)	<0,001
Зап'ястя				
Ультрадистальний відділ	-1,89 (7,98)	-0,05 (7,14)	-1,76 (7,20)	0,108
1/3 променевої кістки	-1,22 (3,37)	-1,94 (4,07)	-3,17 (4,62)	0,001

Таблиця 19

Вплив РТН на площу кістки, яку виражено  
як кінцеву % різницю (середнє квадратичне відхилення) з вихідним рівнем

	Плацебо	РТН-20	РТН-40	Значення р
Поперековий відділ хребетного стовпа	0,46 (2,97)	2,52 (3,52)	3,34 (3,72)	<0,001
Стегнова кістка/ тазостегновий суглоб				
Разом	0,54 (3,02)	0,84 (3,16)	1,05 (2,98)	0,144
Шийка	0,04 (4,60)	0,27 (4,91)	0,81 (5,56)	0,035
Вертелюг стегнової кістки	0,95 (12,75)	1,99 (12,16)	1,92 (11,30)	0,197
Міжвертелюжний	1,01 (5,17)	1,01 (4,99)	1,01 (4,89)	0,964
Трикутник Уорда	0,44 (7,60)	1,13 (7,34)	0,99 (8,06)	0,309
Зап'ястя				
Ультрадистальний відділ	0,25 (6,40)	-0,25 (6,00)	-0,39 (4,80)	0,653
1/3 променевої кістки	-0,02 (5,73)	0,52 (3,40)	0,01 (4,42)	0,586

Узагальнено, дані, які було наведено перед тим, вказують, що пацієнт, який лікується за допомогою РТН, має зменшену кількість випадків перелому. Зокрема, лікування за допомогою РТН знизило більше ніж на 66% кількість пацієнтів з попередніми вертебральними переломами, які постраждали від нових вертебральних переломів. Лікування за допомогою РТН знизило також більше ніж на 78% кількість пацієнтів з попередніми вертебральними переломами, які постраждали від нових, множинних вертебральних переломів. На додаток до цього, РТН знижує тяжкість вертебральних переломів зі значним зниженням на 78% кількості пацієнтів з помірними або тяжкими переломами. Пацієнти, які одержують РТН, мають вигоду унаслідок значного зменшення кількості випадків усіх невертебральних переломів (у тому числі переломів тазостегнового суглобу, променевої кістки, зап'ястя, тазу, стопи, плечової кістки, ребер або гомілковостопного суглобу) зі значущістю на рівні  $p < 0,007$ . Підвищується також якість кісток. Пацієнти з попереднім переломом мають вигоду унаслідок значного підвищення вмісту мінеральних речовин кісткової тканини тазостегнового суглобу, хребетного стовпа та тіла у цілому. Це підвищення вказує на те, що зниження кількості випадків перелому на цих ділянках може мати місце уже через 12 місяців лікування.

Ці дані по переломам є першими даними по зниженню кількості випадків переломів за допомогою РТН у людей. Ці дані демонструють поліпшення якості та міцності кісток, як і передклінічні дані, які було наведено перед тим. Ці результати показують також вигоду підвищення якості та міцності кісток на невертебральних ділянках. Показники зменшення кількості випадків переломів, які підтримуються впродовж 18-23-місячного періоду лікування, раніше у клінічних або передклінічних дослідженнях не спостерігались.

До спроби перевірки на людях, чи забезпечує РТН самостійно підвищення твердості та міцності кісток з підвищенням стійкості до переломів, раніше не вдавались. У опублікованих літературних джерелах постійно вказується на те, що РТН повинен вводитись у комбінації з протирезорбційним засобом або естрогеном. До опублікованих клінічних іспитів раніше залучали надто малу кількість людей для визначення значного зниження кількості випадків переломів. Під час одного з досліджень переваги РТН не можна було оцінити, оскільки були відсутні плацебо-контролі. Під час другого дослідження, у якому було використано загальноприйняте визначення перелому, зменшення кількості випадків переломів не спостерігали.

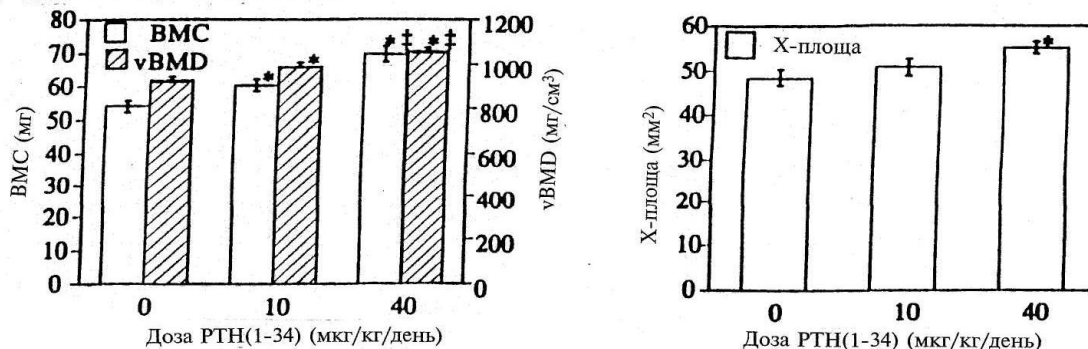
Показники зменшення кількості випадків переломів на комбінованих невертебральних ділянках є особливо неочікуваними, приймаючи до уваги розповсюджену думку про те, що РТН негативно впливає на такі ділянки. Суть розповсюдженої догми полягає у тому, що РТН підвищує пористість кортикального шару кістки, унаслідок чого ослабляє кістку, особливо на початковому етапі лікування. На додаток до цього ця догма стверджує, що ділянки кортикального шару кістки піддаються підвищеному ризику перелому і що РТН не забезпечує

зниження кількості випадків переломів на невертебральних ділянках. Та ж сама догма стверджує також, що РТН самостійно навряд чи може бути ефективним і потребує одночасної протирезорбційної терапії для блокування негативного впливу на кортикальний шар кістки. Одержані дані демонструють переваги РТН, які раніше не спостерігались, у разі введення його пацієнту, який додатково одержує вітамін D та кальцій. Неочікувано, РТН зміцнює кістки зі зниженням кількості випадків нових переломів у пацієнта, який знаходиться у стані ризику виникнення множинних переломів хребетного стовпа, у стані ризику виникнення додаткових невертебральних переломів, у стані ризику виникнення від помірних до тяжких додаткових переломів хребетного стовпа тощо.

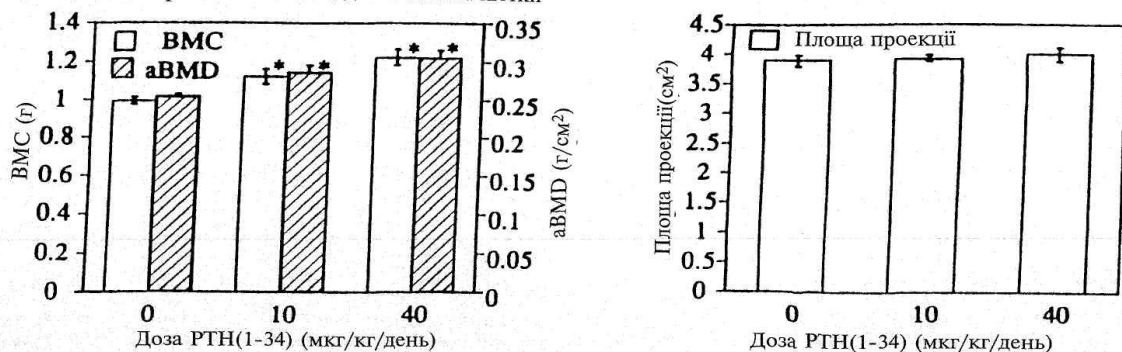
Результати клінічного дослідження на постклімактеричних жінках показали особливу вигоду лікування пацієнтів малими дозами (20мкг/день), оскільки дозу РТН (який у великих дозах може мати побічні ефекти у деяких пацієнтів) було знижено, зі збереженням однак здатності до запобігання переломів та зниження кількості випадків переломів; подібний ефект спостерігається і у разі застосування високої дози (40мкг/день). Дані, які було одержано на мавпах за допомогою поляризаційного інфрачервоного електронного мікроскопу з перетворенням Фур'є, надали можливе, однак не обмежувальне, механістичне пояснення. Результати дослідження на мавпах показують, що РТН у малих дозах підвищує утворення кристалів та прискорює мінералізацію кортикального шару кісток. На додаток до цього, мавпи, які одержували малі дози, мали додаткову вигоду після припинення введення РТН, оскільки останній підвищує вміст мінеральних речовин кісткової тканини. Одержані дані демонструють нову вигоду, яка полягає у тому, що введення малих доз РТН пацієнтам, які додатково одержують вітамін D та кальцій, забезпечує ефективне запобігання як вертебральних, так і невертебральних переломів. У протилежність розповсюдженій думці, РТН зміцнює кістки на невертебральних ділянках з запобіганням нових переломів або знижує тяжкість переломів, ймовірно шляхом підвищення мінералізації та вмісту мінеральних речовин кісткової тканини.

Опис цього винаходу було наведено з посилання на різні специфічні та переважні варіанти втілення та методики. Слід зрозуміти, однак, що можливо здійснити численні варіанти та модифікації, та залишитись у межах духу та обсягу цього винаходу. Усі публікації та заявки на патенти у цьому описі свідчать про рівень пересічного професіоналізму у тій галузі, до якої належить цей винахід.

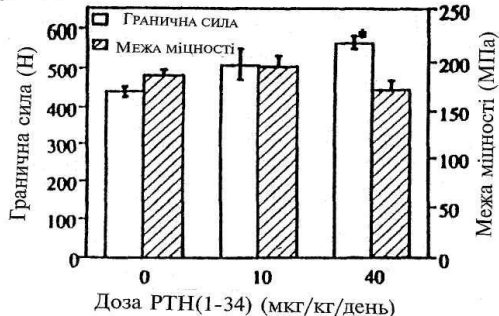
ФІГ. 1А А. Діафіз стегнової кістки



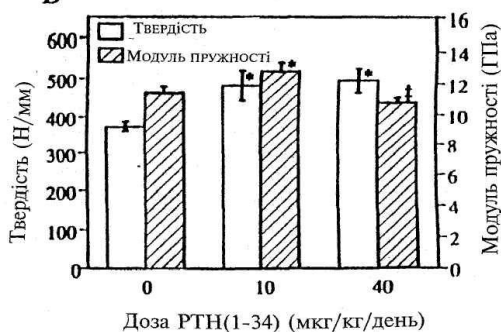
ФІГ. 1В В. Проксимальний відділ стегнової кістки



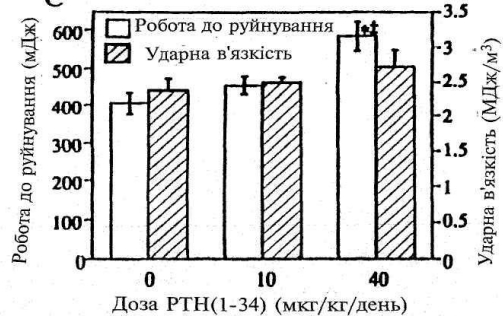
ФІГ. 2А А



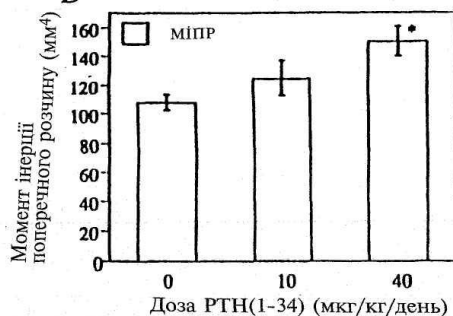
ФІГ. 2В В



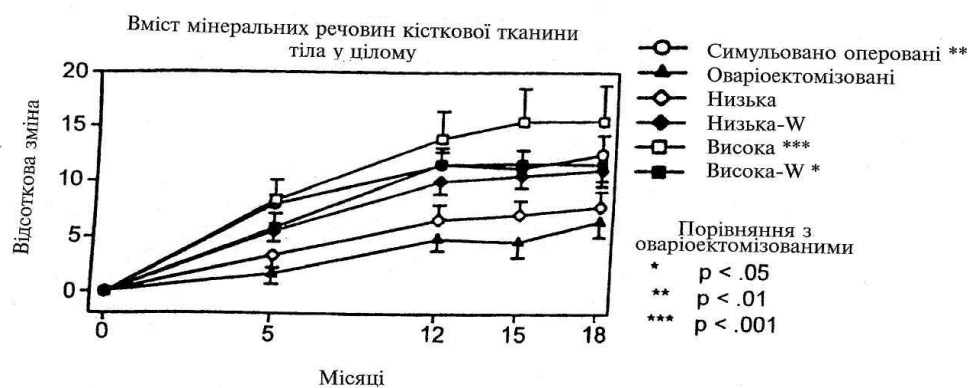
ФІГ. 2С с



ФІГ. 2D D



ФІГ. 3



ФІГ. 4A

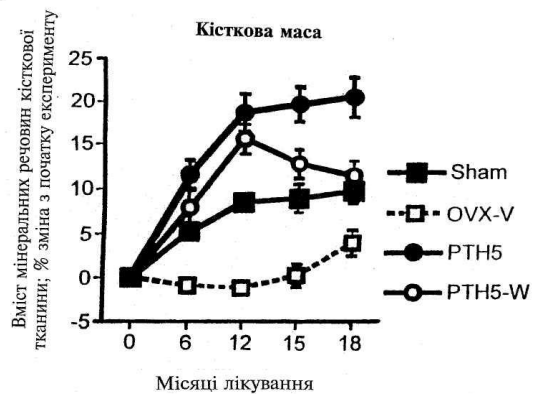


ФІГ. 4B

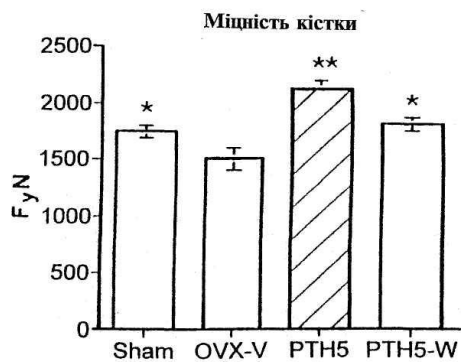




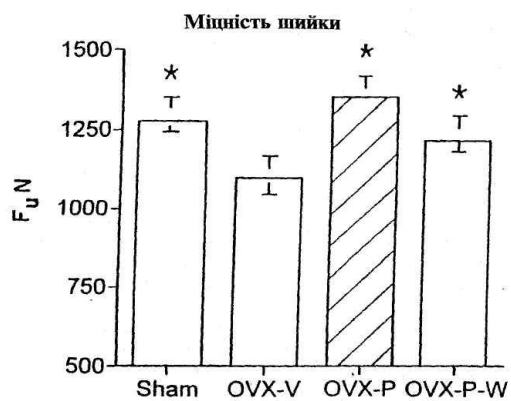
ФІГ. 4С



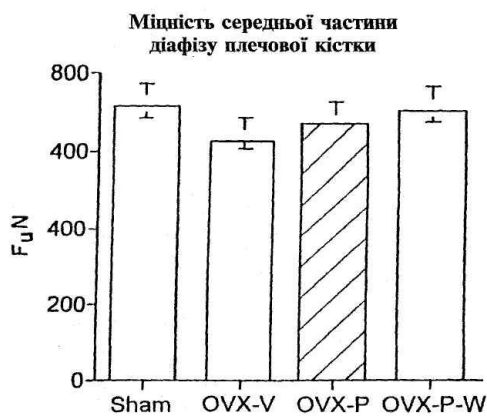
ФІГ. 5A



ФІГ. 5B



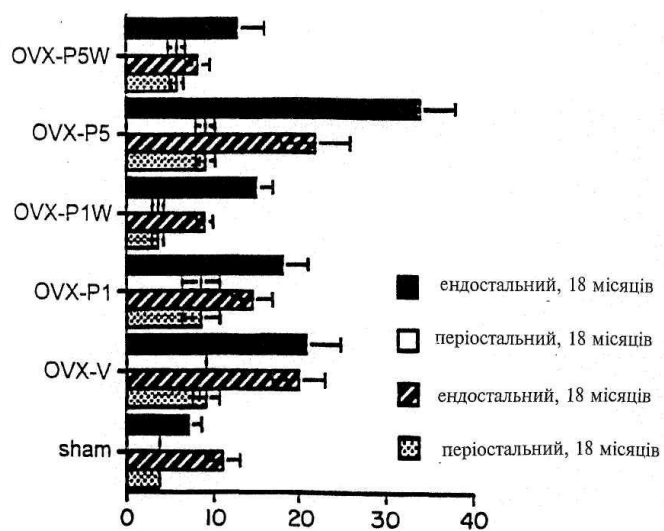
ФІГ. 6A



ФІГ. 6В

ФІГ. 7

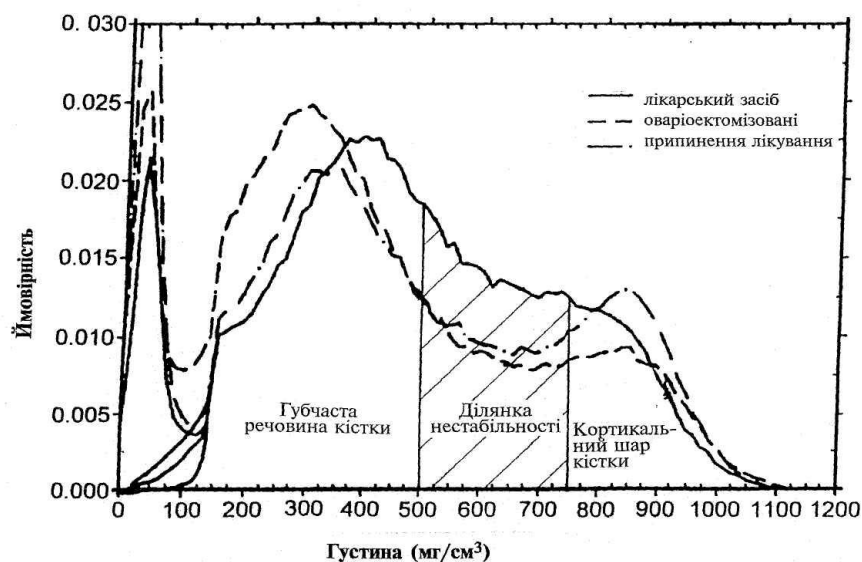
Утворення поверхні кортикального шару кістки: діафіз плечової кістки



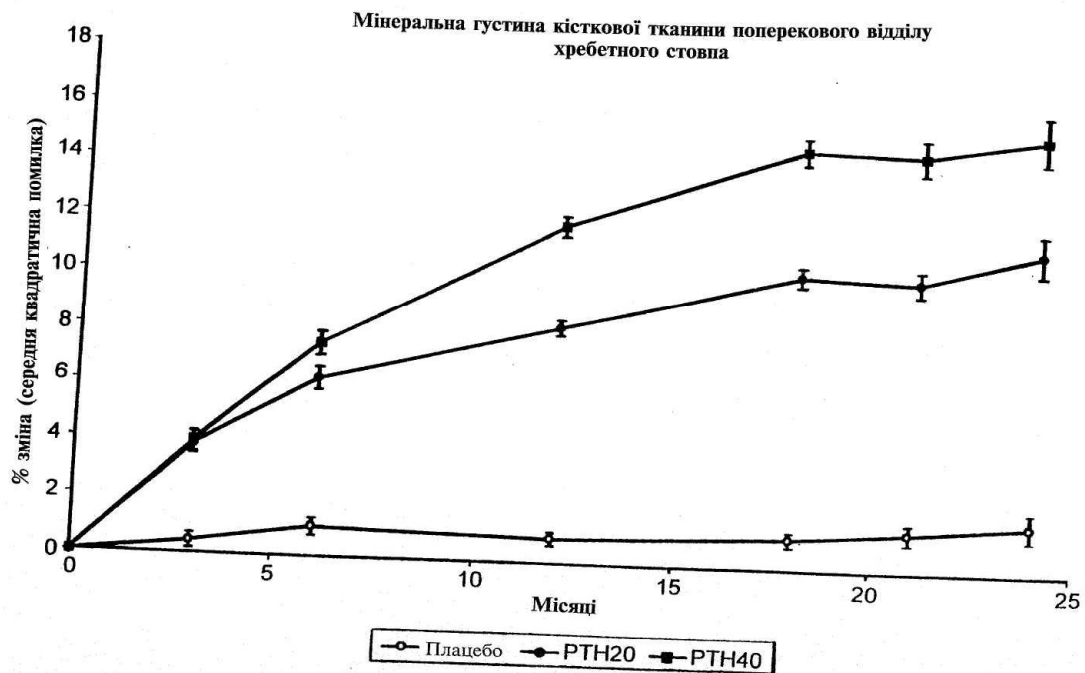
Швидкість остеогенезу, BFR/BS

ФІГ. 8

Об'єднані гістограми



ФІГ. 9



ФІГ. 10

