

DOI: 10.26693/jmbs05.01.045

УДК 616.718-003.93:616.379-008.64]-092.9

*Дудченко Є. С., Ткач Г. Ф., Муравський Д. В.,
Максимова О. С., Даниленко М. І.*

ГІСТОЛОГІЧНА СТРУКТУРА РЕГЕНЕРАТУ ДОВГИХ ТРУБЧАСТИХ КІСТОК СКЕЛЕТА ЗА УМОВ ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ ХРОНІЧНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

Сумський державний університет, Україна

yevheniidudchenko@ukr.net

Проблема регенерації кісткової тканини після пошкодження є однією з центральних у медико-біологічній науці. Незважаючи на численні дослідження, вона залишається складною й до кінця не розв'язаною і до сьогодні зберігає свою актуальність. Численні ситуації в клініці, що приводять до необхідності виконувати реконструкцію дефектів кісток, спричинених травмою на фоні ендокринних порушень, вимагають глибокого розуміння та дослідження процесу регенерації кісткової тканини. Тому метою дослідження стало вивчення гістологічних та гістоморфометричних особливостей репаративного остеогенезу за умов хронічної гіперглікемії організму. Дослідження проведено на 50 білих щурах-самцях зрілого віку (контрольна група – 20 щурів, група тварин із хронічною гіперглікемією організму – 20 щурів, група контролю гіперглікемії – 10 щурів). Хронічну гіперглікемію моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг). За допомогою портативної зуботехнічної бормашини бором у середній третині діафіза великогомілкової кістки формували отвір. Дослідження проводили на 3-тю та 7-му доби після завдання травми. Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопа Olympus BH-2 (Японія), морфометричний аналіз – за допомогою програми «Digitizer». Статистичне опрацювання здійснювали за допомогою пакета програм SPSS-17. На 7-му добу репаративного остеогенезу в щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією організму площа сполучної тканини в регенераті була меншою на 38,27% ($p < 0,001$), а площа запального інфільтрату та грануляційної тканини – більшою на 30,51% ($p < 0,001$) та 7,76% ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи. Так, ранні стадії репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією організму характеризувалися послабленням процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затриманням розвитку грануляційної тканини.

Ключові слова: репаративний остеогенез, хронічна гіперглікемія організму, морфометрія.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Представлена робота є складовою частиною науково-дослідної теми з держбюджетним фінансування «Молекулярно-генетичні та морфологічні особливості регенерації тканин нижньої кінцівки за умов хронічної гіперглікемії», № державної реєстрації 0117U003926.

Вступ. Проблема регенерації кісткової тканини після пошкодження є однією з центральних у медико-біологічній науці. Незважаючи на численні дослідження, вона залишається складною й до кінця не розв'язаною і до сьогодні зберігає свою актуальність у зв'язку з тим, що частота переломів довгих кісток скелета перебуває на високому рівні та становить 400 осіб на 100 тис. населення, що значно впливає на якість життя людей [1, 2].

Цукровий діабет - одне з найпоширеніших захворювань, що займає провідне місце в структурі ендокринних хвороб [3, 4]. Нині в усьому світі одна з одинадцяти дорослих осіб страждає на цукровий діабет. За інформацією Міжнародної федерації діабету, поширеність цієї хвороби на сьогодні становить 425 млн випадків, а в Україні кількість хворих щорічно зростає на 5-7% [5].

Незадовільні наслідки порушень регенерації кісткової тканини негативно впливають на функцію опорно-рухового апарату, їх висока поширеність і труднощі під час відповідного лікування, численні ситуації в клініці, що викликають необхідність виконувати реконструкцію дефектів кісток, спричинених травмою на фоні ендокринних порушень, вимагають глибокого розуміння й дослідження процесу регенерації кісткової тканини [6, 7].

Мета дослідження – вивчення гістологічних та гістоморфометричних особливостей репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією організму.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальне дослідження проведено на 50 білих

лабораторних щурах-самцях зрілого віку – 7–9 місяців, які були поділені на такі групи: I – контрольна група для проведення коректного порівняльного аналізу одержаних даних процесу остеорепарації (20 щурів); II – група для оцінювання стану глюкозного гомеостазу і підтвердження змодельованої хронічної гіперглікемії (10 щурів); III група – тварини з хронічною гіперглікемією організму та посттравматичним дефектом кісток (20 щурів).

Перед початком експерименту всі тварини були оглянуті на предмет їх рухової активності та стану зовнішніх покривів. Після цього щури підлягали двотижневій карантинізації. Піддослідних тварин доглядали відповідно до загальноприйнятих рекомендацій, вимог та положень щодо догляду за лабораторними тваринами («Правила проведення робіт із використанням експериментальних тварин», додаток 4, затверджений Наказом Міністерства охорони здоров'я № 755 від 12 серпня 1997 р.; «Про заходи щодо подальшого вдосконалення організаційних форм роботи з використанням експериментальних тварин»; «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах», ухвалені Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001 р.); Гельсінська декларація Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000 р.); Положення «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.). Під час проведення дослідних робіт норми етики та моралі не були порушені. Щури перебували в кімнаті віварію за умов сталої температури (24–25 °C), вологості (60 ± 5)% та умов 12-годинного циклу зміни темряви й освітлення. Поточне прибирання кліток виконували щоденно.

У тварин II та III груп моделювали хронічну гіперглікемію (ХГ) таким чином: упродовж 2 тижнів замість питної води щури вживали 10% водний розчин фруктози. Після цього кожному щуру одноразово було виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину (Streptozocin «Sigma-Aldrich») (40 мг/кг) та ніотинової кислоти (1 мг/кг). Щурам I (контрольної) групи була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буфера. Після введення стрептозотоцину тварини перебували у звичайних умовах віварію на звичайному харчовому та питному раціоні впродовж 60 діб. На 60-ту добу після відтворення моделі (ХГ) у тварин II групи в плазмі крові визначали показники вмісту глюкози натще, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду, на основі яких підтверджували наявність гіперглікемії організму.

Щурам I та III груп був змодельований у великогомілкових кістках дефект із метою можливого

подальшого дослідження процесу зрощення відламків кісток на мікроструктурному рівні. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах під кетаміновим наркозом. За 30 хвилин до початку операції тваринам внутрішньом'язово вводили профілактичну дозу ампіциліну (7,5 мг/кг), ксилазин (3 мг/кг) та кетамін (8 мг/кг). Передопераційну підготовку операційного поля проводили шляхом виголювання шерстяного покриву в ділянці передньої поверхні голілки та тричі обробляли 3% спиртовим розчином йоду. Робили розріз завдовжки 0,8-1,5 см по лінії *margo anterior tibiae*. За допомогою портативної зуботехнічної бормашини стерильним бором (d 1,6 мм) при малих обертах з охолодженням у середній третині діафіза великогомілкової кістки формували отвір до кістково-мозкового каналу. Операційну рану закривали шкірним швом, який обробляли 3% спиртовим розчином йоду. Впродовж наступних 3 діб після операції для профілактики гнійних ускладнень післяопераційний шов обробляли 3% спиртовим розчином йоду, а для знеболювання внутрішньом'язово вводили кеторолак дозою 0,2 мг двічі на добу. Кістковий дефект залишали загоюватися під кров'яним згустком. Тварин із I та III груп з експерименту виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4 мг/100 г маси тіла) на 3-тю та 7-му доби після завдання травми.

Для вивчення мікроскопічної будови відпрепаровану ділянку великогомілкових кісток із дефектом фіксували у 10% розчині формаліну з подальшою демінералізацією в 5% водному розчині Трилону Б. Дегідратацію проводили в спиртах зростаючої концентрації та здійснювали заливання в парафін. Готували з отриманих препаратів зрізи товщиною 4–6 мкм. Фарбування проводили гематоксилін-еозином, а світлову мікроскопію – з використанням мікроскопа Olympus BH-2 (Японія). Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою мікросітки, мікролінійки та з використанням обчислювальної програми «Digimizer». Вимірювали такі параметри: площу запального інфільтрату (мм²), площу грануляційної тканини (мм²), площу сполучної тканини (мм²), площу грубоволокнистої кісткової тканини (мм²), площу хрящової тканини (мм²).

Статистичне оброблення всіх одержаних числових даних проводили з використанням електронного пакета програм SPSS-17. Перевірку величин на нормальність розподілу реалізовували із застосуванням критерію Колмогорова–Смирнова. Дані наведені у вигляді середньої арифметичної (M) та середнього квадратичного відхилення (SD). Визначення достовірності відмінностей між двома вибірками проводили з використанням параметричного критерію Стьюдента (t). Відмінність вважали

достовірною, якщо ймовірність випадкової різниці (P) не перевищувала 0,05 ($p < 0,05$).

Результати дослідження. Ділянка дефекту на 3-тю добу дослідження в контрольній групі тварин була заповнена фібрином, еритроцитами, нейтрофільними гранулоцитами, макрофагами, лімфоцитами, дрібним кістковим детритом та поодинокими фібробластами. Причому в лейкоцитарно-лімфоцитарному інфільтраті переважали лімфоцити. Поряд із цим спостерігалось утворення грануляційної тканини (рис. 1 А, Б).

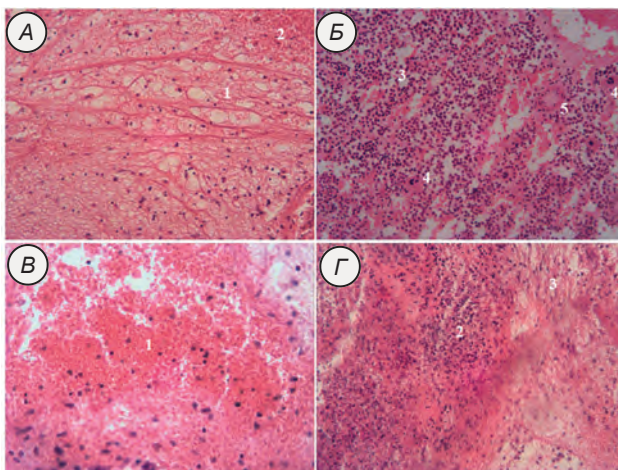


Рис. 1. А, Б – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 3-тю добу репаративного остеогенезу: 1 – фібрин; 2 – еритроцити; 3 – лімфоцити; 4 – нейтрофільний гранулоцит; 5 – капіляр.
В, Г – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура з ХГ організму на 3-тю добу репаративного остеогенезу: 1 – еритроцити; 2 – лейкоцитарно-лімфоцитарний інфільтрат; 3 – фібрин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. А, Б, Г – Зб. $\times 200$. В – Зб. $\times 400$

На 3-тю добу дослідження в групі тварин із змодельованою хронічною гіперглікемією організму ділянка дефекту також була заповнена запальним інфільтратом, що складався з фібрину, поодиноких фібробластів, великих скупчень еритроцитів, нейтрофільних гранулоцитів, поодиноких лімфоцитів, дрібного кісткового детриту. Але на відміну від контрольної групи в запальному інфільтраті переважали нейтрофільні гранулоцити, а також спостерігалися некротичні залишки кісткового мозку (рис. 1 В, Г).

На 7-му добу дослідження у тварин контрольної групи більша половина площі регенерату була очищеною від запального інфільтрату. Біля материнської кістки формувалася щільна неоформлена сполучна тканина – спостерігалися численні фібробласти в оточенні сполучнотканинного матриксу. Центральна зона регенерату залишалася заповненою фібрином, але більш ущільненою із поодинокими лімфоцитами та макрофагами (рис. 2 А, Б).

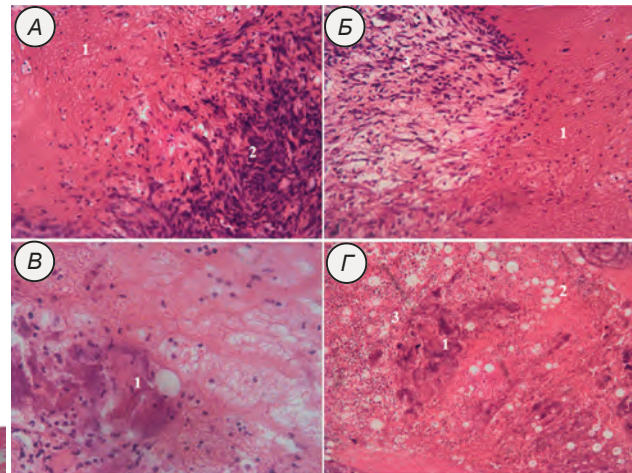


Рис. 2. А, Б – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура контрольної групи на 7-му добу репаративного остеогенезу: 1 – фібрин; 2 – пучки колагенових волокон; 3 – фібробласти.
В, Г – ділянки дефекту великогомілкової кістки щура зі змодельованою ХГ організму на 7-му добу репаративного остеогенезу: 1 – некротичний кістковий детрит; 2 – жирові клітини; 3 – лейкоцитарно-лімфоцитарний інфільтрат. Забарвлення гематоксиліном та еозином. А, В – Зб. $\times 400$. Б, Г – Зб. $\times 200$

У тварин із ХГ організму на 7-му добу експерименту більша частина ділянки дефекту залишалася заповненою некротичним кістковим детритом, фібрином, нейтрофільними гранулоцитами та жировою тканиною. Розвиток грануляційної тканини на даному терміні дослідження в цій групі був дуже слабким (рис. 2 В, Г).

За результатами морфометричного аналізу на 3-тю добу експерименту ділянка дефекту в обох групах була заповнена запальним інфільтратом та грануляційною тканиною. У групі зі змодельованою хронічною гіперглікемією організму площа запального інфільтрату була більшою на 12,44% ($p < 0,001$), а площа грануляційної тканини – в 1,72 раза ($p < 0,001$) меншою від контрольного показника (рис. 3, 4). На 7-му добу репаративного остеогенезу в щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією організму площа сполучної тканини в регенераті була меншою на 38,27% ($p < 0,001$),



Рис. 3. Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефектах великогомілкових кісток контрольної групи тварин

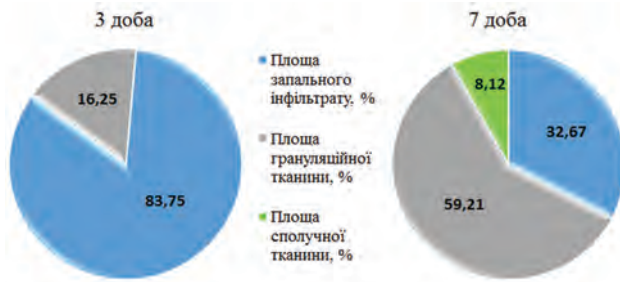


Рис. 4. Площі тканинспецифічних структур регенерату у дефектах великогомілкових кісток групи тварин з ХГ

а площа запального інфільтрату та грануляційної тканини – більшою на 30,51% ($p < 0,001$) та 7,76% ($p < 0,001$) відповідно контрольної групи (рис. 3, 4).

Обговорення отриманих результатів. На думку Carlos Marin та співавторів, при хронічній гіперглікемії організму порушується узгоджена дія сигнальних молекул та регуляторів транскрипції репаративного остеогенезу, що призводить до зниження функціонування остеобластів, збільшення кількості жирової тканини в складі регенерату та істотного гальмування процесу консолідації переломів [8]. Під час аналізу ранніх стадій процесу остеорепарації ми виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із хронічною гіперглікемією організму, як наслідок, на 7-му добу більша частина ділянки дефекту залишалася заповненою некротичним кістковим детритом, фібрином, нейтрофільними гранулоцитами та жировою тканиною.

У тварин із хронічною гіперглікемією організму репаративний остеогенез є тривалішим за часом,

ніж у тварин із нормальними показниками глюкози в крові. На фоні хронічної гіперглікемії організму порушуються нео- та ангіогенез, посилюються механізми запалення, що перешкоджають правильному розподілу остеогенних клітин, кисню та поживних речовин у зоні регенерації. Спостерігається порушення катаболізму тканинних структур та проліферації клітинних елементів, які диференціюються в бік адипогенної лінії, збільшуючи вміст жирової тканини в мозолі перелому, а це призводить до процесів гальмування консолідації відламків кісток [8, 9].

Висновок. Морфологічна картина репаративного остеогенезу на 3-тю та 7-му доби в щурів контрольної групи відповідала результатам досліджень низки вітчизняних і закордонних учених. Ранні стадії репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією організму характеризувалися послабленням процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затриманням розвитку грануляційної тканини. На 7-му добу репаративного остеогенезу в щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією організму площа запального інфільтрату та грануляційної тканини в регенераті була більшою на 30,51% ($p < 0,001$) та 7,76% відповідно контрольної групи.

Перспективи подальших досліджень. Наші подальші дослідження спрямовані на вивчення ультраструктурних особливостей репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією організму.

References

1. Redfern R, Roberts CA. Trauma. *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. 2019; 3: 211–84. DOI: org/10.1016/B978-0-12-809738-0.00009-0
2. Merkulov VN, Dorokhyn AY, Bukhtyn KM. *Detskaya travmatologiya* [Pediatric Traumatology]. Moskva: GEOTAR-Medya; 2019. 256 p. [Russian]
3. Balabolkyn MY. *Dyabetologiya* [Diabetology]. M: Medytsyna; 2000. 672 p. [Russian]
4. Balabolkyn MY, Klebanova EM, Kremynskaya BM. *Lechenye sakharnogo dyabeta y ego oslozhnenyy* [Treatment of diabetes and its complications]. M: OAO «Yzdatelstvo «Medytsyna»; 2005. 242 p. [Russian]
5. Ferrari SL, Abrahamsen B, Napoli N, Akesson K, Chandran M, Eastell R, et al. Diagnosis and management of bone fragility in diabetes: an emerging challenge. *Osteoporos Int*. 2018; 29(12): 2585–96. PMID: 30066131. PMCID: PMC6267152. DOI: 10.1007/s00198-018-4650-2
6. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future direction. *BMC Medicine*. 2011; 9(1): 66. PMID: 21627784. PMCID: PMC3123714. DOI: 10.1186/1741-7015-9-66
7. Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res*. 2011; 90(9): 1052–61. PMID: 21248364. PMCID: PMC3169879. DOI: 10.1177/0022034510393967
8. Marin C, Luyten FP, Van der Schueren B, Kerckhofs G, Vandamme K. The impact of type 2 diabetes on bone fracture healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9(6): 1–15. PMID: 29416527. PMCID: PMC5787540. DOI: org/10.3389/fendo.2018.00006
9. Mangialardi G, Ferland-McCollough D, Maselli D, Santopaolo M, Cordaro A, Spinetti G, et al. Bone marrow pericyte dysfunction in individuals with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2019; 62(7): 1275–90. PMID: 31001672. PMCID: PMC6560025. DOI: 10.1007/s00125-019-4865-6

УДК 616.718-003.93:616.379-008.64]-092.9

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РЕГЕНЕРАТА ДЛИННЫХ ТРУБЧАТЫХ КОСТЕЙ СКЕЛЕТА В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ НА ОРГАНИЗМ ХРОНИЧЕСКОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ**Дудченко Е. С., Ткач Г. Ф., Муравский Д. В., Максимова Е. С., Даниленко М. И.**

Резюме. Проблема регенерации костной ткани после повреждения является одной из центральных в медико-биологической науке. Несмотря на многочисленные исследования, она остается сложной и окончательно не решенной, и сегодня сохраняет свою актуальность. Многочисленные ситуации в клинике приводят к необходимости выполнять реконструкцию дефектов костей, вызванных травмой на фоне эндокринных нарушений, требуют глубокого понимания и исследования процесса регенерации костной ткани. Поэтому целью исследования явилось изучение гистологических и гистоморфометрических особенностей репаративного остеогенеза у крыс с хронической гипергликемией организма. Исследование проведено на 50 белых крысах-самцах зрелого возраста (контрольная группа – 20 крыс, группа животных с хронической гипергликемией организма – 20 крыс, группа контроля гипергликемии – 10 крыс). Хроническую гипергликемию моделировали путем однократного внутривентриального введения стрептозотоцина (40 мг/кг) и никотиновой кислоты (1 мг/кг). С помощью портативной зуботехнической бормашины бором в средней трети диафиза большеберцовой кости формировали дефект. Исследования проводились на 3-и и 7-ые сутки после нанесения травмы. Световую микроскопию проводили с использованием микроскопа Olympus BH-2 (Япония). Морфометрический анализ проводили с помощью программы «Digimizer». Статистическую обработку осуществляли с помощью пакета программ SPSS-17. На 7-е сутки репаративного остеогенеза у крыс с моделированной хронической гипергликемией организма площадь соединительной ткани в регенерате была меньше на 38,27% ($p < 0,001$), а площадь воспалительного инфильтрата и грануляционной ткани – больше на 30,51% ($p < 0,001$) и 7,76% ($p < 0,001$) соответственно контрольной группы. Так, ранние стадии репаративного остеогенеза у крыс с хронической гипергликемией организма характеризовались ослаблением процессов реорганизации некротического костного детрита и воспалительного инфильтрата, задержкой развития грануляционной ткани.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, хроническая гипергликемия организма, морфометрия.

UDC 616.718-003.93:616.379-008.64]-092.9

Histological Structure of the Regenerate of Long Tube Bones of the Skeleton under the Influence of Chronic Hyperglycemia**Dudchenko Y. S., Tkach G. F., Muravskiy D. V., Maksymova O. S., Danilenko M. I.**

Abstract. The problem of bone tissue regeneration after damage is one of the central issues in biomedical science. Despite the numerous studies, the issue is still unresolved and continues to be relevant. The numerous situations in the clinic necessitate the reconstruction of bone defects are caused by trauma on the background of endocrine disorders. They require a deep understanding and study of the bone tissue regeneration process.

The purpose of our research was to study the histological and histomorphometric features of reparative osteogenesis in the rats with chronic hyperglycemia of the body.

Material and methods. The study was conducted on 50 white laboratory rats: a control group (20 rats), a group of animals with chronic hyperglycemia of the body (20 rats), and a control group of hyperglycemia (10 rats).

Results and discussion. The chronic hyperglycemia was simulated by single intraperitoneal administration of streptozotocin (40 mg/kg) and nicotinic acid (1 mg/kg). After the administration of streptozotocin, the animals had the usual dietary intake for 60 days. On the 60th day after the model reproduction in animals of the control group and the group with chronic hyperglycemia of the body, the hole was formed using a portable dental sterile boron in the middle third of the tibia diaphysis. The studies were performed on the 3rd and 7th day after trauma. The sections were stained with hematoxylin-eosin. The light microscopy was performed using an Olympus BH-2 microscope (Japan). The morphometric analysis was performed using the morphometric program "Digimizer". The following parameters were measured: area of inflammatory infiltrate (mm²), area of granulation tissue (mm²), area of connective tissue (mm²), area of fibrous bone tissue (mm²), area of cartilaginous tissue (mm²). The statistical processing was performed using the SPSS-17 software package. On the 7th day of reparative osteogenesis in rats with the simulated chronic hyperglycemia of the body, the area of connective tissue in the regenerate was 38,27% less ($p < 0,001$), and the area of inflammatory infiltrate and granulation tissue was 30,51% more ($p < 0,001$) and 7,76% ($p < 0,001$), respectively, than that of the control group.

Conclusion. Thus, the early stages of reparative osteogenesis in rats with chronic hyperglycemia of the body were characterized by weakening of the reorganization processes of necrotic bone detritus and inflammatory infiltrate, and the development delay in granulation tissue.

Keywords: reparative osteogenesis, chronic body hyperglycemia, morphometry.

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

Стаття надійшла 26.07.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування