

DOI: 10.26693/jmbs04.05.067

УДК 616.379-008.64:616.7]-092.9

Понирко А. О., Рябенко Т. В.

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СТАНУ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗА УМОВ ІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

Сумський державний університет, Медичний інститут,  
Україна

ponyrkoalina123@gmail.com

Дослідження останніх років показали, що хворі на цукровий діабет часто мають захворювання скелету. Тому характер змін у кістковій тканині під час гіперглікемії є важливим предметом досліджень на сьогоднішній день. Під час гіперглікемії відмічається зниження мінеральної щільності кісткової тканини, що може призвести до її перелому. Це можна пояснити тим фактором, що високі рівні глюкози в крові асоціюються зі збільшенням екскреції кальцію з сечею, що призводить до від'ємного його балансу.

У даній роботі на основі анатомічних, гістологічних, морфометричних та статистичних методів досліджень було встановлено виражені структурні зміни у щурів всіх вікових категорій.

Дослід проводили на 36 білих лабораторних щурах різного віку. За допомогою розчину алоксану моделювали гіперглікемію. В результаті розвитку гіперглікемії спостерігали зміну структурних показників довгих трубчастих кісток щурів різного віку. На 30 добу у епіфізарному хрящі щурів молодого віку було зафіксовано виражені структурні зміни. Відбувалося скорочення чисельності проліферативних колонок у зоні проліферації. У кортикальному шарі виявлено виражену резорбцію поверхні періосту з утворенням різного розміру та форм порожнин. Також зафіксовано виражену резорбцію періосту кортикального шару, що є суттєвим з точки зору виникнення переломів через втрату товщини кортексу. Зниження щільності кісткових трабекул можливо було викликане порушенням механізму гіпертрофії хондроцитів та наступною неможливістю мінералізації цих ділянок. Рівень глюкози в крові та сечі протягом всього експерименту був досить високий, що говорить про розвиток хронічної гіперглікемії. Результати та строки експерименту показують, що ступінь отриманих змін залежить від віку тварин та тривалості експерименту.

**Ключові слова:** алоксан, довгі трубчасті кістки, епіфіз, метафаз, мікроскопічна будова, гістоструктура органа.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження є фрагментом НДР «Морфофункціональні аспекти порушення гомеостазу організму», № державної реєстрації 0118U006611.

**Вступ.** У структурі захворюваності в економічно розвинутих країнах цукровий діабет (ЦД) займає одне з провідних місць. В світі 382 млн. людей мають це захворювання. І ця цифра з кожним роком тільки збільшується [1]. Значна поширеність дозволяє охарактеризувати цю хворобу як неінфекційну пандемію [2]. В останні роки були отримані докази того, що всі хворі знаходяться в групі підвищеного ризику переломів, що пов'язані у них з розвитком остеопенії та остеопорозу [3, 4] та при цьому має місце порушення репаративного остеогенезу.

Дослідження на експериментальних тваринах в умовах моделювання гіперглікемії дає можливість охарактеризувати рівень кількісних та якісних змін кісток на протязі тривалого часу. Також із наявними літературними даними необхідно детально дослідити часові характеристики морфологічної зміни кісток у щурів зі змодельованою гіперглікемією [4].

**Мета дослідження** – дослідити зміну морфологічних особливостей кісток щурів різних вікових груп за умов експериментальної гіперглікемії.

**Матеріал та методи дослідження.** Експеримент було проведено на 36 білих лабораторних щурах різного віку. Гіперглікемія моделювалася шляхом інтраперитонеального введення дигідрату алоксану одноразово у вигляді 0,9% нормального сольового розчину в дозі 150 мг/кг [5]. Матеріалом для дослідження були довгі трубчасті кістки скелету, а саме проксимальний та дистальний епіфізи стегнових кісток щурів.

Експеримент було проведено у відповідності до вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) та Закону України про гуманне відношення до піддослідних тварин [6, 7, 8].

Тварини були поділені на дві групи: перша – тварини групи контролю котрі були поділені на три підгрупи відповідно віку (молоді 1–7 міс., зрілі – 8–14 міс., старечі – 15–21 міс.); друга – експериментальна група (тварини з гіперглікемією). В свою чергу була поділена на 3 підгрупи відповідно віку (молоді 1–7 міс., зрілі – 8–14 міс., старечі – 15–21 міс.).

У роботі використовували гістологічні, морфометричні та статистичні методи досліджень. Забір матеріалу та аналіз здійснювали на 30 добу експерименту. Наявність гіперглікемії визначали за сукупністю показників: рівня глюкози в крові, рівня глюкози в сечі. Після введення розчину алоксану у піддослідних тварин ми спостерігали розвиток типових клінічних показників при гіперглікемії: полідипсія, поліурія з глюкозурією, поліфагія, зниження маси тіла, значне підвищення глюкози в крові та наявність глюкози в сечі.

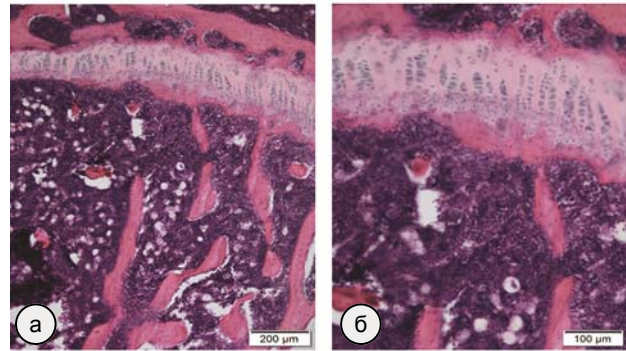
Стегнові кістки щурів різного віку видаляли, очищували від м'яких тканин та фіксували у 10% забуференому фосфатним буфером формаліні протягом доби. Декальцинували у 10% розчині мурашиної кислоти. Після цього дегідрували у серії етилових спиртів зростаючої концентрації (70°, I – 96°, II – 96°), просочували у ізопропілових спиртах та у трьох серіях парафіну, отриманий матеріал заливали у парафін. Виготовлені парафінові блоки різали на санному мікроскопі "Reichert" з отриманням зрізів (6–10 мкм). Гістологічний аналіз та фотографування зрізів проводили з використанням мікроскопа Olympus BX63 (Japan) при збільшенні 100, 200 та 400.

Морфометрію різних зон трубчастої кістки проводили за наступними параметрами: ширина кісткових трабекул, загальна ширина епіфізарного хряща, співвідношення клітинних елементів та міжклітинної речовини епіфізарного хряща.

Статистичний аналіз цифрових показників проводили на персональному комп'ютері з використанням програми Statistica. Достовірність отриманих змін поміж групами визначали по U-критерію Мана-Уїтні з достовірністю похибки 0,05.

**Результати дослідження та їх обговорення.**

Проведеними дослідженнями встановлено, що у епіфізарному хрящі щурів молодого віку на 30 добу після введення алоксану зафіксовано виражені структурні зміни (рис. 1 а). Поверхнева зона мала нехарактерну будову а саме замість сплосчених, розміщених перпендикулярно центральній осі клітин було встановлено утворення колонок з 2–3 клітин (рис. 1 б). Спостерігалось скорочення чисельності проліферативних колонок у зоні проліферації, які розміщувалися на відстані одне від одного. Деякі хондроцити у колонках мали пікнотичне



**Рис. 1.** Фрагмент метафізу дистального відділу стегнової кістки молодого щура на 30 добу після введення алоксану. Епіфізарний хрящ (а, б) з зоною первинної та вторинної спонгіози (а). Нерівномірність та висота проліферативних колонок. Відсутність трабекул у зоні первинної спонгіози. Збільшення:

а) 100; б) 200.Забарвл. гематоксилін та еозин

ядро, що свідчить про загибель клітин. Зона гіпертрофії на ділянках була відсутня, що може вказувати на порушення процесу гіпертрофії хондроцитів та перешкоджати утворенню кісткових трабекул.

Так, у зоні первинної спонгіози зафіксовано майже повну відсутність кісткових трабекул (рис. 1 б). Безпосередньо під зоною гіпертрофії та кальцифікації встановлено шар кісткового матриксу з остеоцитами у вигляді еозинофільно забарвленого пласту перпендикулярного центральній осі стегнової кістки. Він мав неоднакову ширину, а місцями був зовсім відсутній, як і кісткові трабекули. Поодинокі кісткові трабекули у цій зоні мали різну товщину, на ділянках, прилеглих до епіфізарного хряща потоншувалися. Дані трабекули не утворювали контактів одна з одною.

У зоні вторинної спонгіози виявлено малу кількість кісткових трабекул (рис. 1 а). Вони, як і у зоні первинної спонгіози не утворювали кісткову мережу, були нерівномірної товщини.

Кісткові порожнини були заповнені червоним кістковим мозком з осередками жовтого кісткового мозку, що вказує на зниження остеогенного потенціалу.

У кортикальному шарі виявлено виражену резорбцію поверхні періосту з утворенням різного розміру та форм порожнин. Внаслідок цього ширина кортексу суттєво потоншувалася на деяких ділянках. Встановлені зміни вказують на переважання утворення остеокластів з мезенхімальних клітин попередників, замість остеобластів.

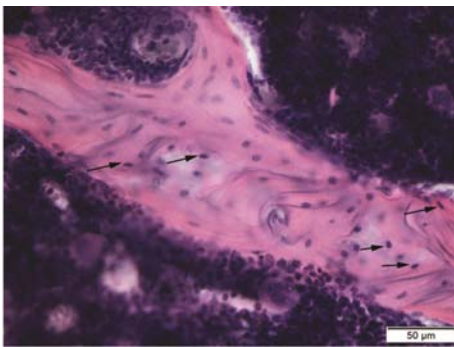
Поверхні кісткових трабекул була резорбована, виявлено утворення гаушипових лакун на їх поверхні, а також на поверхні ендосту поряд з такими трабекулами. Ширина кісткових трабекул зменшилася з  $80,45 \pm 2,19$  у нормі до  $77,26 \pm 2,69$  мкм. Крім того трабекули не з'єднувались з кортексом, це

може призводити до зниження міцнісних якостей кістки.

Рівень глюкози в крові становив 19,3 ммоль/л, в сечі 55 ммоль/л., що свідчило про розвиток гіперглікемії тяжкого ступеню.

У щурів зрілого віку на 30 добу після введення алоксану відбувалося зниження щільності проліферативних колонок та їх висоти. Так само, як і у молодих щурів в деяких ділянках зони гіпертрофії були відсутні, що можливо пояснює майже повну відсутність трабекул у зоні первинної спонгіози. У зоні первинної спонгіози також, як і у молодих щурів встановлено суттєве зниження кількості трабекул, які не утворювали трабекулярної мережі. Ширина кісткових трабекул зменшилася з  $68,28 \pm 4,29$  у нормі до  $65,01 \pm 2,73$ .

У зоні вторинної спонгіози кількість трабекул також була невеликою, кістковий матрикс містив велику кількість ліній склеювання, розміщених хаотично (рис. 2), що свідчить про активні процеси



**Рис. 2.** Кісткова трабекула у зоні вторинної спонгіози щура середнього віку на 30 добу після введення алоксану. Хаотичне розташування ліній склеювання. Osteоцити з каріоліпнозом (стрілки). Зб. 400. Забарвл. гематоксилін та еозин

перебудови губчастої кісткової тканини. Osteоцити розміщувались нерівномірно, в окремих ділянках траплялися загиблі клітини з каріоліпнозом.

У кортикальному шарі стегнової кістки також встановлено ознаки резорбції періосту, як у молодих щурів, однак менш виражені. У матриксі кортекса на рівні вторинної спонгіози виявлено немінералізовані ділянки, виконані хрящовою тканиною, що є порушенням структури, враховуючи віддаленість від епіфізарного хряща та свідчить про втрату міцнісних якостей кістки. Також зафіксовано майже повну відсутність контактів трабекул з кортикальним шаром.

Рівень глюкози в крові становив 14,8 ммоль/л, в сечі 55 ммоль/л., що підтверджує наявність гіперглікемії тяжкого ступеню.

У щурів старечого віку на відміну від тварин молодого та середнього на цей термін спостереження було виявлено незначні структурні зміни у дистальному метафізі стегнової кістки. Ширина епіфізарного хряща зменшилася з  $240,79 \pm 3,82$  мкм. у нормі до  $221,26 \pm 2,47$  мкм.

У зоні первинної спонгіози розташовувалася велика кількість кісткових трабекул, деякі з них мали сліпі закінчення та не утворювали з'єднань з іншими трабекулами, розташованими нижче. У зоні вторинної спонгіози спостерігали відсутність контакту між трабекулами, але їх кількість була значно більшою порівняно з групами щурів іншого віку.

Рівень глюкози в крові становив 22,7 ммоль/л, в сечі 55 ммоль/л., що також підтверджує наявність гіперглікемії тяжкого ступеню.

Таким чином, отримані результати підтверджують дані літературних джерел про вплив гіперглікемії на кісткову тканину, а саме пригнічення формування губчастої кісткової тканини та стоншення кортексу, що відбувається внаслідок резорбції [1, 6], особливо у щурів молодого віку. Це може бути причиною формування низького піку кісткової маси та підвищувати ризик виникнення остеопорозу та переломів у майбутньому [3, 4, 5].

**Висновки.** Отже на 30 добу спостережень встановлено виражені структурні зміни у всіх вікових групах щурів. Це виражалось у порушенні зональності епіфізарного хряща (відсутність зони гіпертрофії на ділянках) та скороченні щільності кісткових трабекул. Також зафіксовано виражену резорбцію періосту кортикального шару молодих щурів, що є суттєвим з точки зору виникнення переломів через втрату товщини кортекса. У щурів старечого віку були зафіксовані незначні структурні порушення у кістковій тканині та епіфізарному хрящі. Встановлені зміни у щурів всіх вікових груп можуть свідчити про те, що зниження щільності кісткових трабекул можливо викликане порушенням механізму гіпертрофії хондроцитів та наступною неможливістю мінералізації цих ділянок.

Протягом всього експерименту рівень глюкози в крові та сечі був збільшений у декілька раз, що свідчить про розвиток гіперглікемії тяжкого ступеню.

**Перспективи подальших досліджень.** Наступним етапом наших досліджень стане дослідження структурних змін довгих трубчастих кісток у більш пізні строки гіперглікемії.

## References

1. Jackuliak P, Killinger Z, Payer JJ. Bone quality in diabetes mellitus type 2. Presented at *Bone Abstracts European Calcified Tissue Society Congress*. 2014: 215. doi: 10.1530/boneabs.3.PP215

- Zimmet PZ. The growing pandemic of type 2 diabetes a crucial need for prevention and improved detection. *Medico-grafia*. 2011; 33(106): 15-21.
- Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Current osteoporosis reports*. 2015; 13(5): 327-35. PMID: 26254939. PMCID: PMC4692363. DOI: 10.1007/s11914-015-0286-8
- Raisingani M, Preneet B, Kohn B, Yakar S. Skeletal growth and bone mineral acquisition in type 1 diabetic children; abnormalities of the GH/IGF-1 axis. *Growth Hormone & IGF Research*. 2017; 34: 13-21. PMID: 28482269. PMCID: PMC5516798. DOI: 10.1016/j.ghir.2017.04.003
- Rubin MR. Bone cells and bone turnover in diabetes mellitus. *Current osteoporosis reports*. 2015; 13(3): 186-91. PMID: 25740570. DOI: 10.1007/s11914-015-0265-0
- Dedukh NV, Sykal AA. Regeneratsiya kosti pri sakharnom diabete 2 tipa (Eksperimentalnoe issledovanie) [Bone regeneration in type 2 diabetes mellitus (Experimental study)]. *Problemi osteologiyi*. 2015; 18(14): 12-7. [Russian]
- Yevropeyska konventsiya pro zakhyst khrebetnykh tvaryn, shcho vykorystovuyutsya dlya doslidnykh ta inshykh naukovykh tsiley [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes]. Strasburh, 18 bereznya 1986 roku: ofitsiynyi pereklad [Tekst]. Verkhovna rada Ukrainy. Ofits vebsayt. (Mizhnarodnyi dokument Rady Yevropy). Available from: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137) [Ukrainian]
- Zakon Ukrainy № 3447-IV vid 21.02.2006 «Pro zakhyst tvaryn vid zhorstkoho povodzhennya»* [On the Protection of Animals from Cruelty]. Stattya 26. [Ukrainian]

УДК 616.379-008.64:616.7]-092.9

### **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТОЯНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС РАЗНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП В УСЛОВИЯХ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ**

**Поньрко А. А., Рябенко Т. В.**

**Резюме.** Исследования последних лет показали, что больные сахарным диабетом часто имеют заболевания скелета. Во время гипергликемии отмечается снижение минеральной плотности костной ткани, что может привести к ее перелому. Это можно объяснить тем фактором, что высокие уровни глюкозы в крови ассоциируются с увеличением экскреции кальция с мочой, что приводит к его отрицательному балансу.

В данной работе на основе анатомических, гистологических, морфометрических и статистических методов исследований были установлены выраженные структурные изменения у крыс всех возрастных категорий.

Опыт проводили на 36 белых лабораторных крысах разного возраста. С помощью раствора аллоксана моделировали гипергликемию. В результате развития гипергликемии наблюдали смену структурных показателей длинных трубчатых костей крыс разного возраста. На 30 сутки в эпифизарном хряще крыс молодого возраста было зафиксировано выраженные структурные изменения, происходило сокращение численности пролиферативных колонок в зоне пролиферации. В кортикальном слое обнаружено выраженную резорбцию поверхности периоста с образованием разного размера и форм полостей. Также зафиксировано выраженную резорбцию периоста кортикального слоя, что является существенным с точки зрения возникновения переломов из-за потери толщины кортекса. Снижение плотности костных трабекул возможно было вызвано нарушением механизма гипертрофии хондроцитов и последующей невозможностью минерализации этих участков. Уровень глюкозы в крови и моче в течение всего эксперимента был достаточно высок, что говорит о развитии хронической гипергликемии. Результаты и сроки эксперимента показывают, что степень полученных изменений зависит от возраста животных и продолжительности эксперимента.

**Ключевые слова:** аллоксан, длинные трубчатые кости, метафиз, микроскопическое строение, гистоструктуры органа.

UDC 616.379-008.64:616.7]-092.9

### **Comparative Characteristics of the State of Bone Tissue in Rats of Different Age Groups in Conditions of Induced Hyperglycemia**

**Ponyrko A. O., Riabenko T. V.**

**Abstract.** Recent studies have shown that diabetic patients often have skeletal diseases. Therefore, the nature of changes in bone tissue during hyperglycemia is an important subject of research today. During hyperglycemia, a decrease in bone mineral density is observed, which can lead to its fracture. This can be explained by the fact that high blood glucose levels are associated with an increase in urinary calcium excretion, which leads to its negative balance.

*The purpose of the study* was to establish pronounced structural changes in rats of all ages on the basis of anatomical, histological, morphometric, and statistical research methods.

*Material and methods.* The experiment was performed on 36 white laboratory rats of different ages. Hyperglycemia was modeled using a solution of alloxan.

*Results and discussion.* As a result of the development of hyperglycemia, a change in the structural indicators of the long tubular bones of rats of different ages was observed. On the 30<sup>th</sup> day we recorded pronounced structural changes in the epiphyseal cartilage of young rats, the number of proliferative columns in the proliferation zone decreased. In the cortical layer, we found pronounced resorption of the surface of the periosteum with the formation of different size and shape of cavities. There was also a pronounced resorption of the periosteum of the cortical layer, which is significant in terms of the occurrence of fractures due to the loss of cortex thickness. The decrease in the density of bone trabeculae was probably caused by a violation of the mechanism of hypertrophy of chondrocytes and the subsequent impossibility of mineralization of these areas.

*Conclusion.* The diaphysis revealed a change in the diameter of the osteons and their channels. The level of glucose in the blood and urine throughout the experiment was quite high, which indicates the development of chronic hyperglycemia. The results and timing of the experiment showed that the degree of the obtained changes depended on the age of the animals and the duration of the experiment.

**Keywords:** alloxan, long tubular bones, metaphysis, microscopic structure, organ histostructures.

*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 14.06.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування