

## АНОТАЦІЯ

*Дудченко Є. С.* Морфофункціональні особливості репаративного остеогенеза за умов хронічної гіперглікемії (анатомо-експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина». – Сумський державний університет, Суми, 2021.

Сумський державний університет, Суми, 2021.

Дисертаційна робота присвячена визначенню морфологічних особливостей репаративного остеогенезу у щурів із хронічною гіперглікемією, а також з'ясуванню можливості застосування збагаченої тромбоцитами плазми крові для корекції процесу репаративної регенерації довгої кістки щурів за умов впливу хронічної гіперглікемії.

Експериментальне дослідження було проведено на 380 білих лабораторних щурах – самцях зрілого віку, які були розподілені на чотири групи: I група – контрольна (120 щурів) із модельованим дірчастим дефектом діяфіза великогомілкової кістки; II група – 120 щурів із хронічною гіперглікемією та змодельованим дефектом діяфіза великогомілкової кістки; III група – 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію, дірчастий дефект великогомілкової кістки та вводили у дефект збагачену тромбоцитами плазму; IV група – 20 тварин для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії, у яких визначали вміст глюкози натще, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду в плазмі крові.

Хронічну гіперглікемію у тварин моделювали шляхом двотижневого навантаження 10 % водним розчином фруктози, одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину на цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг). На 60-ту добу після підтвердження хронічної гіперглікемії тваринам був змодельований дірчастий дефект діяфіза великогомілкової кістки. Дослідження морфологічних особливостей остеогенезу проводили на 3-тю, 7-му,

14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми, а визначення макро- та мікроелементів регенерату проводили на 3-тю та 30-ту добу. Для цього використовували мікроскопічний, ультрамікроскопічний, морфометричний, хіміко-аналітичний та статистичний методи. Світлову мікроскопію проводили з використанням мікроскопу Olympus BH-2 (Японія). Ультрамікроскопічне дослідження виконували за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM-1230 (фірма JEOL, Японія) та растрового електронного мікроскопу «PEM 102» (Суми, Україна). Морфометричний аналіз здійснювали за допомогою мікросітки, мікролінійки та з використанням обчислювальної програми «Digitizer». Вимірювали площу запального інфільтрату ( $\text{мм}^2$ ), площу грануляційної тканини ( $\text{мм}^2$ ), площу фіброретикулярної тканини ( $\text{мм}^2$ ), площу ретикулофіброзної кісткової тканини ( $\text{мм}^2$ ), площу хрящової тканини ( $\text{мм}^2$ ). Хіміко-аналітичний аналіз проводили методами атомно-абсорбційної спектрометрії з електротермічною та полуменевою атомізацією. Статистичне опрацювання числових даних проводили за допомогою пакету програм SPSS (версія 17.0, США) та Microsoft Excel 2016.

Репаративний остеогенез у контрольних щурів характеризувався низкою послідовних стадій. На ранніх етапах процесу у регенераті відмічалися запальні зміни, формування посттравматичної гематоми, але вже на 14-ту добу дослідження їх не було виявлено. На 30-ту добу репаративного остеогенезу відбувалось інтенсивне ремоделювання ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту. Морфометричним аналізом було встановлено, що у кінці експерименту регенерат був утворений ретикулофіброзною та пластинчастою кістковою тканиною, площа яких склала  $(84,44 \pm 1,03)$  % від усієї зони остеорепарації. Для регенерату було характерне зменшення концентрації калію, натрію, заліза, магнію, цинку та міді, а для кальцію, навпаки, зростання вмісту в кінці експерименту, що пов'язано з утворенням морфологічно зрілої кісткової тканини.

Досліджено, що на ранніх стадіях репаративного остеогенезу хронічна гіперглікемія призводить до послаблення процесів реорганізації некротичного кісткового детриту та запального інфільтрату, затримання розвитку

грануляційної тканини. Затримка ліквідації запалення у місці кісткового дефекту призводить до зростання вмісту фіброретикулярної тканини та робить процес репаративного остеогенезу більш тривалішим. На пізніх стадіях остеорепації у тварин із хронічною гіперглікемією відзначалося порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату, внаслідок чого формування зрілої пластинчастої кістки у кінці експерименту не відбулося.

Морфометричним аналізом було виявлено, що кістковий регенерат на 21-шу добу у щурів із хронічною гіперглікемією ще містив  $(4,52 \pm 0,67)$  % запального інфільтрату, що підтверджує уповільнення процесу остеорепації. Лише на 30-ту добу ознак запалення у регенераті не було виявлено за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм. Окрім затримки регресії запального інфільтрату, на 21-шу добу остеорепації у кістковому регенераті тварин із хронічною гіперглікемією продовжувалася збільшуватися площа хрящової тканини (на 115,55 % ( $p < 0,001$ )) порівняно з попереднім терміном дослідження, але на 30-ту добу відбулося зменшення її площі, але лише на 40,66 % ( $p < 0,001$ ) порівняно із 21-ою добою. У кінці експерименту площа ретикулофіброзної кісткової тканини у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією була меншою на 50,72 % ( $p < 0,001$ ) відповідно контрольної групи.

На початку остеогенезу за умов впливу хронічної гіперглікемії, у регенераті спостерігалось збільшення концентрації натрію на 115,78 % ( $p < 0,001$ ), кальцію – на 46,42 % ( $p = 0,013$ ), заліза – на 93,71 % ( $p < 0,001$ ), цинку – на 62,99 % ( $p < 0,001$ ) та міді – на 128,36 % ( $p < 0,001$ ). У кінці експерименту спостерігалось зменшення концентрацій зазначених елементів, однак рівня контрольних показників вони не досягли. Вміст кальцію був менше на 17,92 % ( $p = 0,001$ ) відповідно контрольної групи.

Встановлено, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів із хронічною гіперглікемією на ранніх стадіях репаративного остеогенезу, не призводить до значного пришвидшення елімінації кісткового та запального детриту. Разом з тим, на 7-му добу збільшувалась кількість остеобластів та остеокластів, а грануляційна тканина реорганізовувалася у фіброретикулярну

сполучну тканину. Але все ж таки залишалися ознаки запалення. На 14-ту добу залишків кісткового детриту не було виявлено. Відбулось різке розростання фіброретикулярної тканини та її упорядкування й формування у остеїдні трабекули. Біля материнської кістки тяжі сполучної тканини були дифузно звапнілими по поверхні яких розміщувалися щільним пластом остеобласти та поодинокі остеокласти. У центрі дефекту утворення кісткових трабекул не спостерігалось, але відмічалася велика кількість капілярів синусоїдного типу. Хрящової тканини у регенераті на всіх термінах дослідження виявлено не було. Репаративний остеогенез проходив по типу остеобластичного диферону. Формування пластинчастої кістки з повноцінними остеонами було виявлено біля материнської кістки, у центрі регенерат складався з упорядкованої грубоволокнистої кісткової тканини.

Встановлено, що регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким у дефект вводили збагачену тромбоцитами плазму, у кінці експерименту складався із ретикулофіброзної кісткової тканини, площа якої була більшою на 16,89 % ( $p < 0,001$ ) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією та на 14,59 % ( $p < 0,001$ ) менше порівняно із щурами контрольної групи.

Вміст натрію, кальцію, заліза та міді у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму на 3-тю добу остеогенезу зменшився на 37,47 % ( $p < 0,001$ ), 22,21 % ( $p = 0,115$ ), 33,66 % ( $p < 0,001$ ) та 14,33 % ( $p = 0,136$ ) відповідно тварин із хронічною гіперглікемією без корекції. На 30-ту добу концентрація натрію була меншою на 25,98 % ( $p < 0,001$ ), а міді на 29,74 % ( $p = 0,001$ ) у регенераті тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму порівняно зі щурами із хронічною гіперглікемією без корекції. Достовірної різниці у показниках вмісту калію, кальцію та магнію у регенератах щурів контрольної групи та тварин із хронічною гіперглікемією, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму виявлено не було. Концентрація заліза у регенераті тварин із групи корекції була більше на 19,48 % ( $p = 0,005$ ) відповідно контрольного показника, однак достовірно не відрізнялася від групи щурів із хронічною гіперглікемією без застосування збагаченої тромбоцитами плазми.

Одержані результати показують, що за умов впливу хронічної гіперглікемії на організм відбувається затримання ліквідації першої фази запалення у ділянці кісткового дефекту, що подовжує процес репаративного остеогенезу. Відбувається порушення проліферації та диференціації клітин остеобластичного диферону з формуванням фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми дає можливість коригувати негативний вплив хронічної гіперглікемії на репаративний остеогенез, а також сприяє швидшому звільненню від запального інфільтрату з місця дефекту кістки, формуванню остеогенного диферону та ремоделюванню грубоволокнистої кісткової тканини у повноцінну пластинчасту кістку, нормалізації макро- та мікроелементного складу регенерату.

**Ключові слова:** щури, репаративний остеогенез, великогомілкова кістка, хронічна гіперглікемія, збагачена тромбоцитами плазма.

## ANNOTATION

Dudchenko Y.S. Morphofunctional features of reparative osteogenesis under conditions of chronic hyperglycemia (anatomical-experimental study). – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the doctor of philosophy on a specialty 222 – "Medicine". – Sumy State University, Sumy, 2021.

Sumy State University, Sumy, 2021.

The dissertation is devoted to the determination of morphological features of reparative osteogenesis in rats with chronic hyperglycemia, as well as to the possibility of using platelet-rich plasma to correct the process of reparative regeneration of long bone of rats under the influence of chronic hyperglycemia.

The experimental study was performed on 380 white laboratory male mature rats, which were divided into four groups: Group I – control (120 rats) with a simulated perforated defect of the tibia; Group II – 120 rats with chronic hyperglycemia and a simulated defect of the tibial diaphysis; Group III – 120 rats, which simulated chronic

hyperglycemia, perforated defect of the tibia and injected into the defect platelet-rich plasma; Group IV – 20 animals to assess the state of glucose homeostasis and confirm the presence of hyperglycemia, which determined the content of fasting glucose, insulin, glycosylated hemoglobin and C-peptide in blood plasma.

Chronic hyperglycemia in animals was simulated by two weeks of watering with 10% aqueous fructose solution, a single intraperitoneal injection of streptozotocin on citrate buffer (buffer pH 4.5; dose of streptozotocin 40 mg / kg) and nicotinic acid (1 mg / kg). On the 60th day after confirmation of chronic hyperglycemia, the animals were simulated perforated defect of the tibia. Studies of morphological features of osteogenesis were performed on the 3rd, 7th, 14th, 21st and 30th days after injury, and the determination of macro- and microelements of the regenerate was performed on the 3rd and 30th days. Microscopic, ultramicroscopic, morphometric, chemical-analytical and statistical methods were used for this purpose. Light microscopy was performed using an Olympus BH-2 microscope (Japan). Ultramicroscopic examination was performed using a transmission electron microscope JEM-1230 (JEOL, Japan) and a scanning electron microscope «REM 102» (Sumy, Ukraine). Morphometric analysis was performed using a microgrid, a microline and using the computer program "Digimizer". The area of inflammatory infiltrate (mm<sup>2</sup>), the area of granulation tissue (mm<sup>2</sup>), the area of fibroreticular tissue (mm<sup>2</sup>), the area of reticulofibrous bone tissue (mm<sup>2</sup>), the area of cartilage tissue (mm<sup>2</sup>) were measured. Chemical-analytical analysis was performed by atomic absorption spectrometry with electrothermal and flame atomization. Statistical processing of numerical data was performed using the software package SPSS (version 17.0, USA) and Microsoft Excel 2016.

It was found that reparative osteogenesis in rats without chronic hyperglycemia was characterized by timely change of all phases of regeneration. In the early stages of the process, inflammatory changes were observed in the regenerate, but on the 14th day of the study they were not detected. On the 30th day of reparative osteogenesis, intensive remodeling of reticulofibrous bone tissue into lamellar tissue took place. Morphometric analysis revealed that at the end of the experiment the regenerate was formed by reticulofibrous and lamellar bone tissue, the area of which was (84.44 ± 1.03) % of the entire area of osteoreparation.

It is investigated that in the early stages of reparative osteogenesis chronic hyperglycemia leads to a weakening of the reorganization of necrotic bone detritus and inflammatory infiltrate, delaying the development of granulation tissue. Delayed elimination of inflammation at the site of the bone defect leads to an increase in the content of fibroreticular tissue and makes the process of reparative osteogenesis longer. In the late stages of osteoreparation in animals with chronic hyperglycemia, there was a violation of the proliferation and differentiation of osteoblastic diferon towards the formation of fibrocartilage regenerate, resulting in the formation of mature lamellar bone at the end of the experiment did not occur.

It was studied that the early stages of reparative osteogenesis in rats with chronic hyperglycemia were characterized by a weakening of the reorganization of necrotic bone detritus and inflammatory infiltrate, delayed development of granulation tissue. There was a delay in the elimination of inflammation at the site of the bone defect, which makes the process of reparative osteogenesis longer. In the later stages of osteoreparation in animals with chronic hyperglycemia, there was a violation of the proliferation and differentiation of osteoblastic diferon in the direction of the formation of fibrocartilage regenerate. The formation of mature lamellar bone did not occur at the end of the experiment.

Morphometric analysis revealed that bone regenerate on the 21st day in rats with chronic hyperglycemia contained  $(4.52 \pm 0.67)$  mm<sup>2</sup> inflammatory infiltrate, on the 30th day in rats with chronic hyperglycemia no signs of inflammatory reaction in the regenerate . On the 21st day of the process of osteoperation in the bone regenerate of animals with chronic hyperglycemia, the area of cartilage increased by 115.55 % ( $p < 0.001$ ) compared with the previous study period, but on the 30th day – decreased by 40.66 % ( $p < 0.001$ ) compared with the 21st day. The area of reticulofibrous bone tissue in the regeneration of rats with chronic hyperglycemia was lower by 50.72 % ( $p < 0.001$ ), respectively, the control group. Morphometric analysis revealed that bone regenerate on the 21st day in rats with chronic hyperglycemia still contained  $(4.52 \pm 0.67)$ % of inflammatory infiltrate, which confirms the slowing of the osteoreparation process. Only on the 30th day, no signs of inflammation in the regenerate were detected under the influence of chronic hyperglycemia on the body. In addition to delayed regression of inflammatory infiltrate, on the 21st day of osteoreparation in the bone regenerate of animals with chronic hyperglycemia continued to increase the area of

cartilage (by 115.55% ( $p < 0.001$ )) compared with the previous study period, but on the 30th day there was a decrease area, but only by 40.66% ( $p < 0.001$ ) compared with the 21st day. At the end of the experiment, the area of reticulofibrous bone tissue in the regenerate of rats with chronic hyperglycemia was less by 50.72% ( $p < 0.001$ ), respectively, the control group.

At the beginning of osteogenesis under the influence of chronic hyperglycemia, in the regenerate there was an increase in sodium concentration by 115.78 % ( $p < 0.001$ ), calcium – by 46.42 % ( $p = 0.013$ ), iron – by 93.71 % ( $p < 0.001$ ), zinc – by 62.99 % ( $p < 0.001$ ) and copper – by 128.36 % ( $p < 0.001$ ). At the end of the experiment, a decrease in the concentrations of these elements was observed, but they did not reach the level of control indicators. The calcium content was less by 17.92 % ( $p = 0.001$ ), respectively, the control group.

It was found that the use of platelet-rich plasma in rats with chronic hyperglycemia in the early stages of reparative osteogenesis does not significantly accelerate the elimination of bone and inflammatory detritus. At the same time, there was an increase in osteoblasts and osteoclasts, and the granulation tissue was reorganized into fibroreticular connective tissue. On the 14th day, no bone detritus residues were detected. There was a sharp growth of fibroreticular tissue and its ordering and formation into osteoid trabeculae. Near the maternal bone, the connective tissue strands were diffusely calcified on the surface of which osteoblasts and single osteoclasts were placed in a dense layer. No bone trabeculae formation was observed at the center of the defect, but a large number of sinusoidal capillaries were observed. Cartilage tissue in the regenerate at all stages of the study was not detected. Reparative osteogenesis was of the osteoblastic diferon type. The formation of lamellar bone with full osteons was found near the maternal bone, in the center of the regenerate consisted of ordered coarse fibrous bone tissue.

It was found that the regenerate in rats with chronic hyperglycemia, which was introduced into the defect platelet-rich plasma, at the end of the experiment consisted of reticulofibrous bone tissue, the area of which was greater by 16.89 % ( $p < 0.001$ ), respectively, animals with chronic hyperglycemia and 14.59 % ( $p < 0.001$ ) less compared to control rats.

The content of sodium, calcium, iron and copper in the regenerate of rats with chronic hyperglycemia, which was injected with platelet-rich plasma on the 3rd day of



osteogenesis decreased by 37.47 % ( $p < 0.001$ ), 22.21 % ( $p = 0.115$ ), 33, 66 % ( $p < 0.001$ ) and 14.33% ( $p = 0.136$ ), respectively, of animals with chronic hyperglycemia without correction. On the 30th day, the concentration of sodium was lower by 25.98% ( $p < 0.001$ ) and copper by 29.74% ( $p = 0.001$ ) in the regenerate of animals with chronic hyperglycemia, which was injected with platelet-enriched plasma compared to rats with chronic hyperglycemia without correction. There was no significant difference in potassium, calcium and magnesium levels in the regenerates of control rats and animals with chronic hyperglycemia treated with platelet-rich plasma. The concentration of iron in the regenerate of animals from the correction group was higher by 19.48% ( $p = 0.005$ ) according to the control indicator, but did not differ significantly from the group of rats with chronic hyperglycemia without the use of platelet-rich plasma.

The obtained results show that under the influence of chronic hyperglycemia on the body there is a delay in the elimination of the first phase of inflammation in the area of the bone defect, which prolongs the process of reparative osteogenesis. There is a violation of proliferation and differentiation of osteoblastic diferon cells with the formation of fibrocartilage regenerate. The use of platelet-enriched plasma makes it possible to correct the negative impact of chronic hyperglycemia on reparative osteogenesis, and also promotes faster release of inflammatory infiltrate from the site of the bone defect.

**Key words:** rats, reparative osteogenesis, tibia, chronic hyperglycemia, platelet-rich plasma.

### **Список публікацій здобувача**

1. Dudchenko Y.S., Maksymova O.S., Pikaliuk V.S., Muravskiy D.V., Kyptenko L.I., Tkach G.F. Morphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. Analytical Cellular Pathology. Volume 2020, Article ID 5472841, 7 pages, <https://doi.org/10.1155/2020/5472841>. (IF – 2,052). (обліковується наукометричними базами Scopus та Web of Science) (здобувач провів

*моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку).*

2. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Тимошенко О.О., Дейнеко О.С. Спосіб комплексного визначення вмісту макро- і мікроелементів в органах лабораторних щурів у нормі і при патологічних процесах. Патент на корисну модель № 141361. МПК 2020.01. №u 2019 08297; заявл. 2019-07-16; опубл. 2020-04-10, Бюл. № 7 *(здобувач провів експеримент, аналіз результатів, написання та оформлення патенту).*

3. Ілляшенко В.Ю., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Ткаченко А.С., Дудченко Є.С., Муравський Д.В., Дейнеко О.С. Препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент на корисну модель № 145726. МПК 2021.01. № u 2020 05430; заявл. 2020-08-21; опубл. 2020-12-28, Бюл. № 24 *(здобувач провів експеримент, аналіз результатів, написання та оформлення патенту).*

4. 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. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№1(23):45-49. doi: 10.26693/jmbs05.01.045 *(здобувач провів моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку).*

5. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерації довгих кісток у щурів із експериментальною хронічною гіперглікемією. Буковинський медичний вісник. 2020;Т.24,№2(94):34-40. doi: 10.24061/2413-0737 *(здобувач провів моделювання хронічної гіперглікемії, механічної травми, статистично обробив і проаналізував матеріал, підготував статтю до друку).*

6. Дудченко Є.С. Особливості структурної організації регенерату довгих трубчастих кісток скелета за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Український журнал медицини, біології та спорту. 2020;Т.5,№4(26):79-85. doi: 10.26693/jmbs05.04.079.

7. Tkach G., Maksymova O., Dudchenko Y., Iliashenko V., Tymoshenko A. The posttraumatic regeneration of long bone diaphysis in animals with chronic

hyperglycemia. XXVI International Symposium on Morphological Sciences, Prague, July 5-7 2018. – P. 73-74.

8. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Максимова О.С., Годовас Д.В., Даниленко М.І. Хімічний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали другої всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро. 10-12 жовтня 2018 року. С. 58-59.

9. Дудченко Є.С., Ткач Г.Ф., Ілляшенко В.Ю., Максимова О.С. Макро- та мікроелементний склад кісткового регенерату за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання сучасної мікроелементології» присвяченій пам'яті академіка Ю. І. Кундієва, м.Київ, 4-5 жовтня 2018 року. С. 31-32.

10. Дудченко Є.С., Пастухова К.О., Сухонос О.В., Даниленко М.І., Літовченко Б.М. Особливості макро- та мікроелементного складу тканин скелетном'язової системи задньої кінцівки щурів зрілого віку у нормі. Матеріали II міжнародної науковопрактичної конференції «Сучасні наукові інновації», м. Київ, 24-25 лютого 2018 року (частина I). С. 41-42.

11. Dudchenko Y., Tkach G., Tymoshenko A., Tkachenko A., Maksymova O. Scanning electron microscopy analyses of bone posttraumatic regeneration in animals with chronic hyperglycemia. Матеріали тез доповідей VII конгресу наукового товариства анатомів, гістологів, ембріологів, топографоанатомів України, м. Одеса, 2-4 жовтня 2019 року. С. 200.

12. Дудченко Є.С., Сікора В.З., Ткач Г.Ф. Структурні особливості регенерата довгих трубчастих кісток скелета при хронічній гіперглікемії організму та спрямованій остеотропній терапії збагаченої тромбоцитами плазми. Наукова-практична конференція «Актуальні питання сучасної морфології» присвячена 100-річчю з дня народження професора Олександра Гавриловича Яхницьі та 65-річчю з дня народження професора Миколи Анатолійовича Волошина, м. Запоріжжя, 3-4 жовтня 2020 року. С. 55-56