

УДК 616/618; 616-091-092  
УКПП  
№ держреєстрації 0118U006611  
Інв. №

**Міністерство освіти і науки України**  
Сумський державний університет (СумДУ)  
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
тел. (0542) 64 04 99

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Проректор з наукової роботи  
д-р фіз.-мат. наук, професор  
\_\_\_\_\_ А.М. Черноус

ЗВІТ  
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ  
**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ АСПЕКТИ ПОРУШЕННЯ  
ГОМЕОСТАЗУ ОРГАНІЗМУ**

(остаточний)

Керівник НДР  
д-р мед. наук, професор

\_\_\_\_\_

В. І. Бумейстер

2022

Рукопис закінчено 30 червня 2022 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол від \_\_. \_\_ 2022 р. № \_\_

## СПИСОК АВТОРІВ

**Керівник НДР**

Професор кафедри морфології,  
д-р мед. наук, професор

---

15.09.2022

В.І. Бумейстер  
(реферат, вступ,  
висновки)

**Виконавці:**

Доцент кафедри морфології,  
д-р мед. наук

---

15.09.2022

О.В. Кореньков  
(вступ, розділи 1, 2)

Доцент кафедри морфології,  
канд. біол. наук

---

15.09.2022

С.М. Дмитрук  
(розділи 1, 2)

Доцент кафедри морфології,  
канд. мед. наук

---

15.09.2022

О.С. Ярмоленко  
(розділи 1, 2)

Доцент кафедри морфології,  
канд. біол. наук

---

15.09.2022

Л.І. Кіптенко  
(розділи 1, 2)

Асистент кафедри морфології,  
канд. мед. наук

---

15.09.2022

Т.П. Теслик  
(розділи 1, 2)

Асистент кафедри морфології

---

15.09.2022

А.О. Понирко  
(розділи 1, 2)

Аспірант кафедри морфології

---

15.09.2022

О.С. Максимова  
(розділи 1, 2)

Асистент кафедри морфології

---

15.09.2022

Т.В. Рябенко  
(розділи 1, 2)

Асистент кафедри морфології

---

15.09.2022

М.С. Пернаков  
(розділи 1, 2)

Аспірант кафедри морфології

---

15.09.2022

Д.В. Муравський  
(розділи 1, 2)

Асистент кафедри морфології,  
канд. біол. наук

---

15.09.2022

І.В. Хоменко  
(розділи 1, 2)

## РЕФЕРАТ

Звіт про НДР 178 с., 56 рис., 122 джерела.

ГІПЕРГЛІКЕМІЯ, ЕПІФІЗАРНИЙ ХРЯЩ, КІСТКОВА ТКАНИНА, ЛЕГЕНІ, ПРОТИПУХЛИННІ ХІМІОПРЕПАРАТИ, РЕПАРАТИВНИЙ ОСТЕОГЕНЕЗ, ШКІРА

Об'єкт дослідження – легені, регенерація шкіри, кісткова тканина, епіфізарний хрящ, репаративна регенерація довгих трубчастих кісток.

Мета дослідження – встановлення структурних змін органів і можливості їх корекції за умов порушення гомеостазу організму.

Методи дослідження: органометрія, гістоморфометрія, планіметрія, імуногістохімія, трансмісійна і растрова електронна мікроскопія, рентгенівська енергодисперсійна спектроскопія, рентгенографія, комп'ютерна томографія, статичне мікроіндентування, біохімічний аналіз крові, спектрофотометрія, біомеханічні і статистичні методи.

Одержані результати дослідження впроваджені у навчальний та науковий процес морфологічних кафедр України: кафедри анатомії людини, оперативної хірургії та топографічної анатомії Запорізького державного медичного університету; кафедри клінічної анатомії та оперативної хірургії Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; кафедри нормальної та патологічної клінічної анатомії Одеського національного медичного університету; кафедри анатомії людини, клінічної анатомії та оперативної хірургії Дніпровського державного медичного університету; кафедри патологічної анатомії з секційним курсом Полтавського державного медичного університету; кафедри анатомії, клінічної анатомії та оперативної хірургії Буковинського державного медичного університету; кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, кафедри анатомії людини імені М.Г. Туркевича Буковинського державного медичного університету; кафедри медико-біологічних дисциплін Національного

університету фізичного виховання і спорту України м. Київ; кафедри анатомії, клінічної анатомії, оперативної хірургії, патоморфології та судової медицини Чорноморського національного університету ім. Петра Могили м. Миколаїв; кафедри анатомії людини Харківського національного медичного університету.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	7
1 МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	11
1.1 Характеристика експериментальної моделі і розподіл тварин.....	11
1.1.1 Моделювання експериментального дефекту діафізу стегнової кістки і введення протипухлинних хіміопрепаратів.....	11
1.1.2 Моделювання експериментального дефекту шкіри, стрептозоцинової гіперглікемії, готування та введення збагаченої тромбоцитами плазми .....	12
1.1.3 Моделювання експериментального дефекту діафізу великогомілкової кістки, стрептозоцинової гіперглікемії, готування і введення збагаченої тромбоцитами плазми.....	14
1.1.4 Моделювання алоксанової гіперглікемії з метою встановлення її впливу на морфологію легень і введення кверцетину.....	18
1.1.5 Моделювання алоксанової гіперглікемії з метою встановлення її впливу на ріст та формування стегнових і плечових кісток.....	19
1.1.6 Моделювання порушень водно-сольового обміну організму з метою встановлення його впливу на зміни структурних показників щитоподібної залози.....	20
1.2 Методи дослідження.....	22
2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	24
2.1 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діафізу стегнових кісток за умов впливу на організм протипухлинних хіміопрепаратів.....	24
2.2 Структурні особливості регенерації шкіри за умов хронічної гіперглікемії та при застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми.....	49
2.3 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза діафізу великогомілкової кістки за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми.....	72

2.4 Морфологічна характеристика легень за умови експериментальної алоксанової гіперглікемії та на тлі вживання кверцетину.....	85
2.5 Ріст та формування стегнових і плечових кісток за умов експериментальної гіперглікемії.....	118
2.6 Морфологічна характеристика щитоподібної залози під час експериментальної дегідратації організму.....	139
ВИСНОВКИ.....	153
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ.....	165

## ВСТУП

Однією з причин порушення гомеостазу організму є цукровий діабет, який залишається глобальною проблемою сьогодення, що призводить до інвалідизації, втрати працездатності й смерті. Інтерес до цукрового діабету не згасає та спонукає науковців до пошуків нових шляхів діагностики й лікування як самої патології так і її ускладнень. Цукровий діабет займає третє місце після серцево-судинних та онкологічних захворювань. За різними джерелами, у світі налічується від 120 до 180 мільйонів хворих діабетом, що становить 2-3 % від усього населення планети. За сьгоднішніми прогнозами, кожні 15 років очікується двократне збільшення кількості хворих. За офіційними даними Міністерства охорони здоров'я України цукровий діабет (усіх типів) діагностовано у 2,67 % населення [1].

Актуальність проблеми порушення гомеостазу організму внаслідок цукрового діабету зумовлена гіперглікемією, як підґрунтя для розвитку складних супутніх захворювань та ускладнень, основа яких – діабетичні мікроангіопатії та нейропатії.

У хворих на діабет спостерігається значний ризик розвитку атеросклерозу та ішемічної хвороби серця. Більше ніж 40 % ампутацій нижніх кінцівок є наслідком синдрому діабетичної стопи. Гіперглікемія як один із головних проявів цукрового діабету є також найчастішою причиною сліпоти [2]. Водночас жодна з хронічних патологій не чинить такого несприятливого впливу на проходження вагітності та стан плода, як цукровий діабет [3]. Загалом проблему гіперглікемії внаслідок цукрового діабету вивчали десятиліттями і з цього приводу існує багато наукових праць як вітчизняних, так і зарубіжних учених [4]. Однак незважаючи на це, багато особливостей про механізми регенерації шкіри саме за умов хронічної гіперглікемії залишаються невідомими [5]. Також останніми роками існує потреба у доступних та ефективних методах лікування ран. Результати кількох недавніх досліджень показали ефективність застосування збагаченої

тромбоцитами плазми для лікування виразок у хворих із синдромом діабетичної стопи [6]. У зв'язку з вищевикладеним, існує потреба у більш детальному вивченні регенерації шкіри на мікро- та ультраструктурному рівнях за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії та при застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми у віковому аспекті, що доповнить та поглибить знання про закономірності цього процесу.

Також у науковій літературі є поодинокі праці присвячені дослідженням впливу гіперглікемії на судини малого кола кровообігу та органи респіраторної системи. Не приділяється увага динаміці змін у легенях у віковому аспекті на мікро- та ультрамікроскопічному рівнях із визначенням хімічного складу легеневої тканини. Відсутні дані про реактивні зміни в периферійних органах імунної системи органів грудної клітки на тлі гіперглікемії. З огляду літературних джерел не було знайдено робіт, які досліджували впливу гіперглікемії на синтез регуляторних білків остеогенними клітинами у віковому аспекті на мікро- та ультрамікроскопічному рівнях з визначенням хімічного складу кісткової тканини, епіфізарного хряща та проведенням імуногістохімічних методів дослідження. Також треба зазначити про незадовільні наслідки регенерації кісток, їх високу поширеність та труднощі під час відповідного лікування, особливо у людей із хронічною гіперглікемією. Останнє вимагає глибокого розуміння процесів остеогенезу та подальшого пошуку ефективних, доступних способів його корекції.

Окремо хотілось наголосити про те, що у зв'язку із значним зростанням на сьогодні рівня онкологічних захворювань відмічається збільшення відсотка виникнення переломів саме серед пацієнтів цієї групи. Розвиток злоякісних новоутворень спричиняє зміни кісткового метаболізму у онкологічних пацієнтів у вигляді остеопорозу, метастатичного ураження кісток та патологічних переломів [7]. Ще до початку лікування раку онкологічні хворі мають підвищений ризик прискореної втрати кісткової тканини, про що свідчить зниження мінеральної щільності кісткової тканини у хворих на рак,



незалежно від його типу. Особливо часто виникнення переломів кісток зустрічається при раку молочної, передміхурової, щитоподібної залози, нирок та легенів [8]. Втрата кісткової маси у пацієнтів із злоякісними новоутвореннями відображає як наслідки самого раку, так і скелетну відповідь на терапію, яка в даний час використовується для його лікування, включаючи широкий спектр таких хімотерапевтичних засобів, як глюкокортикоїди, інгібітори ароматази та стероїдні антиандрогени [9]. Одним з основних методів лікування раку на сьогодні є протипухлинна хімотерапія. Особливістю її проведення є призначення протипухлинних хіміопрепаратів курсами, на тривалий проміжок часу. Враховуючи тривалий період загоєння переломів кісток, процеси репаративної регенерації в онкологічних пацієнтів часто протікають на фоні застосування протипухлинних хіміопрепаратів [10]. Переломи кісток спричиняють зниження якості життя пацієнтів, призводять до тривалої та значної втрати працездатності, а, зокрема, в онкологічних хворих впливають на прогноз онкологічного захворювання через вимушену необхідність відтермінування або навіть припинення лікування первинного захворювання [11]. На сьогодні проведено велику кількість досліджень щодо вивчення впливу різних груп протипухлинних хіміопрепаратів на процеси фізіологічної регенерації кісткової тканини [12]. Проте, слід зазначити, відсутність досліджень саме щодо особливостей процесів репаративної регенерації за умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів.

Таким чином, проблема етіотропної терапії цукрового діабету і дії протипухлинних хіміопрепаратів на репаративний остеогенез довгих кісток скелета на сьогодні залишається відкритою. Тому детальне та різнобічне дослідження закономірностей перебудови внутрішніх органів живих істот різних вікових категорій за умов гіперглікемії, а також дослідження репаративної регенерації кістки при застосуванні протипухлинної хімотерапії може визначити оптимальні терміни коригування ускладнень, зменшити ступінь їх тяжкості, розробити відповідні ефективні профілактичні та лікувальні заходи щодо повноцінного швидкого відновлення цілісності кісток

в онкологічних хворих, що покращить якість життя пацієнтів із злоякісними новоутвореннями.

**Мета дослідження.** Установлення структурних змін органів і можливості їх корекції за умов порушення гомеостазу організму (вплив на організм гіперглікемії, протипухлинних хіміопрепаратів, дегідратації).

## **1 МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

### **1.1 Характеристика експериментальної моделі і розподіл тварин**

Дослідження проведене на 480 білих нелінійних лабораторних щурах самцях віком 7 місяців на момент початку експерименту (середня вага  $220,0 \pm 10,0$  г). Тварин утримували в умовах віварію Навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету на стандартному харчовому раціоні та питному режимі. Експеримент виконано з дотриманням вимог біологічної етики відповідно до Європейської конвенції захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою метою (Страсбург, 1985), Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Гельсінської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінки, 2000) та принципів проведення науково-дослідних робіт, визначених комісією з питань дотримання біоетики під час проведення експериментальних і клінічних досліджень навчально-наукового медичного інституту Сумського державного університету (протокол № 1/05 від 10 травня 2022 р.).

#### **1.1.1 Моделювання експериментального дефекту діяфізу стегнової кістки і введення протипухлинних хіміопрепаратів**

Піддослідні тварини були поділені на контрольну ( $n = 24$ ) та три експериментальні (група I, II, III,  $n = 72$ ) групи методом випадкової вибірки. Усім тваринам в умовах стерильної операційної під внутрішньовенним кетаміновим наркозом (50 мг/кг) в ділянці середини діяфіза стегнової кістки наносився дірчастий дефект діаметром 2 мм кулеподібною фрезою стоматологічного бору на глибину до кістковомозкового каналу під охолодженням. Нанесений дефект не призводив до повного перелому кістки, тому сама процедура була малотравматичною для прилеглих м'яких тканин. 61 Тварини експериментальної групи методом випадкової вибірки були

поділені на три групи. Тваринам I-ї групи (n = 24) відразу після нанесення травми вводили внутрішньовенно фармацевтичний препарат доксорубіцин на фізіологічному розчині об'ємом 1,5 мл в дозі 60 мг/м<sup>2</sup>, тваринам II-ї групи (n = 24) – 5-фторурацил на фізіологічному розчині об'ємом 1,0 мл в дозі 600 мг/м<sup>2</sup>, тваринам III-ї групи (n = 24) – метотрексат на фізіологічному розчині об'ємом 1,0 мл в дозі 40 мг/м<sup>2</sup>. Повторне введення зазначених хіміопрепаратів відповідним групам піддослідних тварин здійснювали в тих же дозах на 21-шу та 42-гу добу після нанесення травми. Тваринам контрольної групи вводили внутрішньовенно аналогічний об'єм (1,0-1,5 мл) фізіологічного розчину за тією самою схемою.

Тварин виводили з експерименту на 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після нанесення травми шляхом декапітації під внутрішньовенним кетаміновим наркозом (100 мг/кг) з подальшим вилученням травмованих довгих трубчастих кісток.

### **1.1.2 Моделювання експериментального дефекту шкіри, стрептозоцинової гіперглікемії і готування збагаченої тромбоцитами плазми**

Використали три групи білих лабораторних щурів-самців. Тварин кожної групи було поділено на підгрупи за різними віковими ознаками (молодого віку 4-6 місяців, зрілого віку – 7-9 місяців та старечого віку – 20-22 місяців). Першу групу склали щури із механічною травмою шкіри, які слугували контролем для коректного порівняння із експериментальними групами. Другу групу склали тварини, яким моделювали хронічну гіперглікемію та механічну травму шкіри. Тваринам третьої групи моделювали хронічну гіперглікемію, механічну травму шкіри та вводили збагачену тромбоцитами плазму. Хронічну гіперглікемію моделювали наступним чином: протягом двох тижнів щури замість питної води вживали 10% водний розчин фруктози. Після цього кожній тварині було одноразово виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину на цитратному

буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) (Sigma-Aldrich, USA) та нікотинової кислоти (1 мг/кг) (ФК «Здоров'я», Україна). Щурам контрольної групи була зроблена одноразова внутрішньочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу. У перший день, після введення стрептозотоцину, вживали 5% розчин глюкози (для попередження розвитку гіпоглікемічної коми внаслідок підвищення концентрації інсуліну у крові). Після цього тварин утримували у нормальних умовах віварію з нормальною дієтою (їжа і вода *ad libitum*) 60 днів. Після 60 днів, для дослідження були відібрані щури, які протягом 3 днів поспіль мали рівень глюкози у крові вище 12 ммоль/л. Травму шкіри моделювали тваринам усіх груп. Перед операцією в асептичних умовах операційної тваринам внутрішньом'язово вводили спочатку ксилазин (3 мг/кг) (Алфасан (Нідерланди)), а через 5 хвилин – кетамін (8 мг/кг) (ПАТ «Фармак», Україна). Потім проводили гоління шкіри у міжлопатковій ділянці спини та обробляли її 3% спиртовим розчином йоду. Рану наносили шляхом вирізання 47 клапотя шкіри у міжлопатковій ділянці спини діаметром 1,5 см з використанням трафарету з круглим отвором. У тварин першої та другої груп рана залишалася гоїтися під згустком крові.

Щурам третьої групи вводили у краї ран плазму збагачену тромбоцитами. Для цього у залежності від віку тварин збирали від 0,4 до 0,8 мл крові з бічної хвостової вени у вакуумні контейнери із розчином 48 цитрату натрію. Втрачений об'єм крові негайно відновлювали за допомогою стерильної сольової інфузії. Кров центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 2000 об/хв. Потім відбирали верхню фракцію та переносили в іншу пробірку. Отриманий матеріал центрифугували 15 хв. зі швидкістю 2000 об/хв. Вміст нижньої фракції (яка містила найбільшу кількість тромбоцитів) переносили у стерильну пробірку та активували 10% розчином хлориду кальцію. Отриманий розчин вводили у краї рани. Кожна тварина отримувала власну (аутологічну) плазму.

Вивчення морфологічних та планіметричних особливостей регенерації шкіри проводили на 7-му, 14-ту та 21-шу добу після нанесення травми. Тварин

із експерименту виводили по 10 осіб із групи у кожний термін шляхом передозування тіопенталового наркозу (4 мг/100 г маси тіла) (корпорація «Артеріум», Україна) використовуючи препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин, на який отримано патент на корисну модель [13].

### **1.1.3 Моделювання експериментального дефекту діафізу великогомілкової кістки, стрептозоцинової гіперглікемії і готування збагаченої тромбоцитами плазми**

Досліджених тварин було поділено на чотири групи. До складу першої (I) групи (контрольна група) входило 120 щурів, які утримувались в умовах нормального харчового та питного раціону. Тваринам цієї групи моделювали дефект діафіза великогомілкової кістки. Оперативне втручання проводили в асептичних умовах і під кетаміновим наркозом. Перед операцією тваринам внутрішньом'язово вводили спочатку ксилазин (3 мг/кг) (Алфасан (Нідерланди)), а через 5 хвилин – кетамін (8 мг/кг) (ПАТ «Фармак», Україна). Передопераційну підготовку операційного поля проводили шляхом виголювання шерстяного покриву в ділянці передньої поверхні гомілки 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 діаметром (d 1,6 мм) при малих обертах з охолодженням у середній третині діафіза лівої великогомілкової кістки формували отвір до кістковомозкового каналу. Операційну рану закривали шкірним швом, який обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. Упродовж наступних 3 діб після операції для профілактики гнійних ускладнень післяопераційний шов обробляли 3 % спиртовим розчином йоду. У тварин даної групи кістковий дефект залишали загоюватися під кров'яним згустком, а для знеболювання внутрішньом'язово вводили кетанов (кеторолак) дозою 0,2 мг двічі на добу. Тварин з експерименту виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4 мг/100 г маси тіла) (Корпорація «Артеріум»,

Україна): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу 45 використовуючи препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин, на який отримано патент на корисну модель [13]. До складу другої (II) групи (група з хронічною гіперглікемією) входило 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію. Для цього протягом двох тижнів піддослідні щури замість питної води вживали 10 % водний розчин фруктози. Після цього кожному щуру було одноразово виконане внутрішньоочеревинне введення стрептозотоцину («Sigma-Aldrich», США) на цитратному буфері (рН буфера – 4,5; доза стрептозотоцину – 40 мг/кг) та нікотинової кислоти (1 мг/кг) (ФК «Здоров'я», Україна).

З метою дотримання «чистоти» експерименту щурам контрольної групи була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу. Після введення стрептозотоцину тварини знаходились у звичайних умовах віварію на звичайному харчовому та питному раціоні протягом 60 діб. Після досягнення цього терміну, тваринам даної групи моделювали дефект лівої великогомілкової кістки аналогічно контрольної 46 групи. Виводили тварин шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг / 100 г маси тіла): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу, використовуючи препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. До третьої (III) групи (група з хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП) входило 120 щурів, яким моделювали хронічну гіперглікемію та дірчастий дефект лівої великогомілкової кістки аналогічно попереднім групам, але з метою можливої корекції негативного впливу ХГ на процеси репаративного остеогенезу перед накладанням шкірного шва у дефект було введено збагачену тромбоцитами плазму крові (доза – 0,25 мл). Із цією метою попередньо у тварин із латеральної хвостової вени проводили забір 1 мл крові

у вакутайнери із розчином натрію цитрату. Втрачений об'єм крові негайно відновлювали інфузією стерильного фізіологічного розчину. Відібрану кров центрифугували протягом 20 хв зі швидкістю 2000 об/хв. У результаті у пробірці спостерігались дві фракції компонентів крові: нижня фракція темно-червоного кольору (клітинні компоненти) та верхня фракція солом'яно-жовтого кольору (компоненти сироватки). Після цього піпетували увесь вміст верхньої фракції та верхньої частини нижньої фракції і переносили їх в іншу пробірку. Отриманий матеріал центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 2000 об/хв при температурі 21-23°C, що призводило до утворення двох фракцій: нижньої – збагаченої тромбоцитами плазми, верхньої – бідної тромбоцитами плазми. Вміст нижньої фракції переносили у стерильну пробірку та доводили об'єм до 1 мл за допомогою 10 % розчину кальцію хлориду. Отриманий розчин вводили тваринам у рану. З експерименту тварин виводили шляхом передозування тіопенталового наркозу (4мг / 100 г маси тіла): на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після нанесення травми по 20 щурів для гістологічного та ультрамікроскопічного дослідження; по 10 щурів із групи на 3-тю та 30-ту добу для хіміко-аналітичного аналізу. 47 У нашій роботі ми використали стрептозотоцин індуковану модель хронічної гіперглікемії з попереднім введенням нікотинової кислоти. Механізм дії стрептозотоцину пов'язаний з наявністю в його хімічній структурі сахарозного залишку (гексози), за рахунок якого, через транспортну систему GLUT-2, він вибірково включається  $\beta$ -клітинами острівців Лангерганса в обмінні процеси замість глюкози. Ураження  $\beta$ -клітин стрептозотоцином обумовлено алкілуванням ДНК з наступною активацією полі-АДФрибозосинтетази, виснаженням клітинного пулу  $\text{NAD}^+$ , що призводить у кінцевому підсумку до загибелі клітин. Руйнування  $\beta$ -клітин викликає зниження синтезу та секреції у кров інсуліну, в результаті чого у тварин розвивається гіперглікемія [14]. Нікотинова кислота та нікотинамід знижує цитотоксичну дію СТЗ. Вони захищають  $\beta$ -клітини за допомогою зв'язування безкисневих радикалів та  $\text{NO}$ , проявляючи антиоксидантну здатність, забезпечують клітину  $\text{NAD}^+$ ,



пригнічують апоптоз  $\beta$ -клітин. Крім того, вони діють як акцептори метильних груп, що знижує метилювання ДНК. Попереднє введення нікотинової кислоти або нікотинаміду призводить до зниження діабетогенної дії стрептозотоцину [15]. Крім того, залежно від введеної дози стрептозотоцину (в нашому експерименті 40 мг/кг) та шляху введення (внутрішньоочеревинно), можливо моделювати різної тяжкості порушення вуглеводного обміну, які відповідають певним клінічним типам цукрового діабету ((ЦД 1 або 2 типу). Тому, ми вибрали внутрішньоочеревинне введення стрептозотицину дозою 40 мг/кг із попереднім введенням нікотинової кислоти, що дозволило нам змодельовати хронічну гіперглікемію у щурів, подібну такої, яка розвивається при ЦД 2 типу та, яка не потребує корекції інсуліном. Також, нами було проведено підтвердження ефективності обраної моделі хронічної гіперглікемії шляхом визначення низки показників біохімічного аналізу крові щурів. Для проведення даного аналізу потрібно здійснити забір не менше, ніж 3-ох мл крові від тварини, що становить 48 приблизно 25-30 % від загального об'єму крові, що може призводити до шокового стану та патологічних наслідків у тварин, сприяти неправильному трактуванню отриманих результатів [16]. Тому, забір крові для біохімічного аналізу від щурів основних досліджуваних груп (I, II, III) було неможливим. Тому для оцінки стану глюкозного гомеостазу та підтвердження наявності гіперглікемії, нами була введена IV група (група контролю гіперглікемії) до якої входило 20 щурів (10 щурів із ХГ та 10 інтактних тварин, для коректного порівняння отриманих даних). 10 тваринам цієї групи було проведено моделювання ХГ за вище описаною методикою та на 60 добу після відтворення моделі у тварин визначали показники вмісту глюкози натще, інсуліну, глікозильованого гемоглобіну та С-пептиду в плазмі крові тварин. Інтактним тваринам була зроблена одноразова внутрішньоочеревинна ін'єкція стерильного цитратного буферу та через 60 діб визначені дані показники.

### **1.1.4 Моделювання алоксанової гіперглікемії з метою встановлення її впливу на морфологію легень і введення кверцетину**

Для експериментального моделювання гіперглікемії, що обумовлюється абсолютною недостатністю інсуліну в організмі, ми використовували хімічну сполуку алоксану моногідрат – продукт розпаду сечової кислоти, який при парентеральному способі введення спричиняє вибірковий некроз острівців підшлункової залози шляхом взаємодії з тіоловими групами глюкокінази ферменту  $\beta$ -клітин, внаслідок чого знижуються окиснення глюкози, генерація АТФ та секреція інсуліну. Після 24-годинного голодування на тлі нормальних показників крові тваринам вводили одноразово підшкірно розчин алоксану моногідрату з розрахунку 20 мг на 100 г ваги тіла щура, який готували шляхом розчинення кристалічного субстрату Alloxan Monohydrate фірми «HLR – ООО Хімлаборреактив» (Україна) в стерильному фізіологічному розчині (Баранов В.Г. (1983)). Піддослідні тварини були поділені на три серії: 1) експериментальну, 2) контрольну (вводили підшкірно 0,9% розчин NaCl від 0,35 до 0,8 мл в залежності від маси тварин) та 3) інтактну, кожна з яких була також поділена на три групи залежно від віку щурів: молоді (1–7 місяців), зрілі (8–14 місяців) та старечі (20–26 місяців). В ході експерименту достовірної різниці показників інтактною та контрольної групи не було виявлено, тому ми використовували результати інтактних щурів. Кожна експериментальна група була поділена на шість підгруп (по 6 тварин) залежно від терміну експериментального дослідження: перша – з терміном гіперглікемії 30 діб, друга – з терміном гіперглікемії 60 діб, третя – з терміном гіперглікемії 90 діб, четверта – з терміном гіперглікемії 120 діб, п'ята – з терміном гіперглікемії 150 діб, шоста – з терміном гіперглікемії 180 діб. Відповідно до серії тварин з експериментальною гіперглікемією з терміном тривалості від 30 до 180 діб проводили забій інтактних щурів відповідного віку. Кількість інтактних тварин у групі молодого, зрілого та старечого віку становила по 36 особин відповідно. Умовно виділяли 3 ступеня важкості гіперглікемії: 1 – легкий (рівень глюкози в крові до 10 ммоль/л); 2 –

середній (рівень глюкози в крові в межах 10 – 15 ммоль/л); 3 – важкий (рівень глюкози в крові більше 15 ммоль/л). З метою корекції змін у легенях на тлі хронічної гіперглікемії тваринам молодого віку, які виявилися найбільш уразливою групою, вводили перорально щоденно кверцетин у вигляді 6 гранул. Дозу розраховували згідно з рекомендаціями Ю. Р. Риболовлева та співавторів (1979). Абсолютна доза для щура вагою 106 г – 0,02 г. Відносна доза – 181,6 мг/кг маси тіла щура. Кверцетин має антиоксидантні, імуномодулюючі властивості, запобігає гіперагрегації тромбоцитів, відновлює регіонарний кровообіг і мікроциркуляцію, збільшує реактивність мікросудин. Забій щурів кожної вікової групи проводили кожні 30 днів під внутрішньоочеревинним тіопентал-натрієвим наркозом. Після розтину грудної порожнини проводили огляд її органів, перев'язували трахею з метою запобігання виникненню ателектазу легень із подальшим вилученням органокomплексу.

### **1.1.5 Моделювання алоксанової гіперглікемії з метою встановлення її впливу ріст та формування стегнової і плечової кісток**

Піддослідні тварини методом випадкової вибірки були поділені на дві серії: експериментальну (n = 108) та контрольну (n = 108). Кожна з цих груп була розділена на три групи залежно від віку: молоді щури (2–7 міс.), зрілі (9–14 міс.), старечі (20–26 міс.), кожна з яких була поділена шість підгруп в залежності від терміну експериментального дослідження. Щурів експериментальної серії після 10-годинного голодування вводили у стан хронічної гіперглікемії за допомогою одноразової інтраперитонеальної ін'єкції розчину дигідрату алоксану в дозі 150 мг/кг маси тіла на 0,9 % розчині хлориду натрію (за методикою Н. А. Пальчикової). Розчин алоксану готували шляхом розчинення кристалічного субстрату алоксану фірми LaChema (Чехія) в стерильній дистильованій воді. Після розчинення кристалів речовини, стерильність розчину досягали шляхом пропускання його через мембрану

«Millex-GV» з фільтром 0,22 мм фірми «MILLIPORE» (Франція) та поміщали в стерильні закупорені флакони.

Експериментальна серія була поділена на 3 групи: молоді, зрілі та старечі відповідно до віку, кожна група за тривалістю хронічної гіперглікемії була поділена на 6 підгруп (по 6 тварин у кожній підгрупі): підгрупа 1 – щури з терміном хронічної гіперглікемії 30 діб, підгрупа 2 – 60 діб, підгрупа 3 – 90 діб, підгрупа 4 – 120 діб, підгрупа 5 – 150 діб, підгрупа 6 – 180 діб. Для врахування вікових особливостей вуглеводного обміну та росту скелета щурів контрольної серії також було поділено на 3 групи та 6 підгруп відповідно до поділу тварин експериментальної серії.

Тварин виводили з експерименту відповідно до заданої тривалості хронічної гіперглікемії на кожен 30-ту добу по 6 особин з кожної підгрупи шляхом декапітації під легким тіопентал-натрієвим наркозом. Для дослідження вилучали обидві стегнові та плечові кістки.

#### **1.1.6 Моделювання порушень водно-сольового обміну організму з метою встановлення його впливу на зміни структурних показників щитоподібної залози**

Для постановки експерименту в основу було покладено класифікацію В.Ф. Жалко-Титаренко, у якій за показником водного дефіциту розділяють три ступені дегідратації: легкий, або перший ступінь, коли дефіцит води сягає 2-5% від маси тіла; середній, або другий – дефіцит води становить 5-10% від маси тіла; тяжкий, або третій ступінь – дефіцит води становить понад 10% від маси тіла.

Використовували класифікацію порушень водного гомеостазу, яку застосовували на кафедрі реаніматології І МОЛМІ ім. І. Сеченова (1979) і також професор Сікора В.З. і, відповідно до якої, поділяють дегідратацію на загальну, клітинну та позаклітинну.

Тварини були поділені на серії, групи та підгрупи. І СЕРІЯ – контрольна серія тварин (інтактна). Тварини перебували на загальному раціоні віварію та

впродовж усього терміну експерименту отримували звичайну питну воду в необмеженій кількості. II СЕРІЯ – загальна дегідратація. Експериментальним щурам моделювали загальну дегідратацію за методикою А. Д. Соболевої шляхом утримання тварин на повністю безводній дієті, харчування містило сухий гранульований комбікорм. Серія була поділена на три групи: перша група – моделювання легкого ступеня зневоднення, яка досягалася за три дні; друга група – середній ступінь, що досягався на шостий день; третя група – тяжкий, або сублетальний ступінь зневоднення, досягався на 10 добу. III СЕРІЯ – клітинна дегідратація. Експериментальним щурам моделювали клітинне зневоднення. У своєму раціоні вони отримували сухий гранульований комбікорм. Як пиття використовували гіпертонічний розчин NaCl 1,5 % по 3 мл 3 рази на добу. Тварини зазначеної серії також були розподілені на три групи: відповідно до легкого, середнього та важкого ступенів дегідратації, які наступали через 10, 20, 30 діб відповідно. IV СЕРІЯ – позаклітинна дегідратація. Експериментальним щурам моделювали позаклітинне зневоднення. Тварини були також розподілені на три групи. У першій групі моделювався легкий ступінь зневоднення, який наступав за 30 днів; у другій – середній ступінь, що наступав за 60 діб; у третій – позаклітинне зневоднення важкого ступеня, яке досягалось протягом 90 днів експерименту. Тварини знаходилися на знесоленій дієті, їхній харчовий раціон складався з вивареної, знесоленої їжі з додаванням білкових продуктів, а як пиття використовувалася бідистильована вода. Упродовж зазначеного експерименту щурам внутрішньоочеревинно (Каркищенко Н.Н., 2010) вводили препарат Фуросемід дозою 0,00036 г. Це простий препарат сульфамідів, Код АТС С03С А01, що входить до фармакотерапевтичної групи високоактивних діуретиків. Зареєстрований в Україні від 30.08.2011 р., No UA/5153/01/01. Для нашого експерименту ми використовували формулу Р.С. та Ю.Р. Риболовлевих (1979) для розрахунку необхідної дози для експериментальних тварин. V СЕРІЯ – реадаптація. Період відновлення тварин після всіх видів дегідратації тяжкого ступеня. Щурів переводили на звичайне годування й необмежене пиття та

виводили з експерименту через 15 та 30 діб після закінчення експерименту з дегідратацією. Таким чином, серію було поділено на 2 групи, кожна з яких містила 3 підгрупи залежно від виду зневоднення. Виведення тварин з експерименту здійснювали шляхом декапітації під кетаміновим наркозом (75 мг/кг внутрішньоочеревинно).

## **1.2 Методи дослідження**

Структурні зміни органів за умов порушення гомеостазу організму і можливості їх корекції досліджували за допомогою таких методів:

- біохімічний аналіз крові – для визначення кількісних змін рівня глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові;
- органометричний – для визначення маси тварин, абсолютної маси легень, об'єму відносної маси легень, відносного об'єму легень, щільності тканини легень, зовнішньої будови щитоподібної залози;
- остеометрія – для вивчення темпів росту та формування кісток скелета;
- планіметричний – для обчислення площі ранової поверхні (мм<sup>2</sup>) і швидкості загоєння ран шкіри;
- гістоморфометрія – вивчення якісних та кількісних показників структури досліджуваних тканин на світлооптичному рівні;
- імуногістохімічне дослідження – визначення наявності та локалізації клітинних і тканинних компонентів (антигенів) у мікропрепаратах;
- трансмісійна електронна мікроскопія – визначення функціонального стану ультраструктури досліджуваних органів;
- растрова електронна мікроскопія з рентгенівською енергодисперсійною спектроскопією – для визначення структури та макроеlementного складу травмованих кісток;
- рентгенологічний – для оцінки змін лімфатичних вузлів верхнього та нижнього середостіння;

- комп'ютерна томографія – рентгенологічний метод дослідження динаміки загоєння травмованих кісток із денситометрією (вимірювання оптичної щільності кісток);
- біомеханічний метод – визначення міцності діафіза травмованих довгих трубчастих кісток скелета;
- статичне мікроіндентування – для встановлення твердості кісткової тканини регенерату;
- спектрофотометрія – для визначення біоелементного складу досліджуваних органів;
- статистичний – для об'єктивного визначення відмінностей одержаних кількісних показників і оцінки їх взаємозв'язків.

## **2 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**

### **2.1 Морфологічна характеристика репаративної регенерації діяфізу стегнових кісток за умов впливу на організм протипухлинних хіміопрепаратів**

На сьогодні проблема репаративної регенерації залишається найбільш актуальною проблемою ортопедії й травматології. Зокрема, в наш час зростає частота появи переломів кісток саме серед пацієнтів з онкологічними захворюваннями.

Відомо, що злоякісні новоутворення призводять до метастатичного ураження кісток і розвитку остеопорозу. Зменшення маси кісткової тканини та її мінералізації підвищує ризик виникнення переломів кісток в онкологічних хворих. Однак необхідно зазначити, що специфічне ураження кісткової тканини в пацієнтів із злоякісними новоутвореннями може бути наслідком не лише негативного впливу на організм пухлини, але й протипухлинної хіміотерапії. Остання є одним із основних методів лікування раку, призначається курсами впродовж тривалого часу. Таким чином, можна зробити висновок, що загоєння переломів кісток в онкологічних хворих часто відбувається в умовах застосування протипухлинних хіміопрепаратів.

Проблема репаративної регенерації кістки в онкологічних пацієнтів має важливе значення, оскільки швидке й повноцінне відновлення цілісності кісткової тканини впливає на можливість проведення подальшого багатокомпонентного тривалого лікування онкологічних хворих. Значна кількість сучасних наукових досліджень спрямована на вивчення особливостей фізіологічної регенерації кісткової тканини в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів, проте питання репаративного остеогенезу при застосуванні хіміотерапії є маловивченим у наш час. Зважаючи на вищезазначене, метою нашого дослідження стало вивчення морфологічних особливостей репаративної регенерації кісткової тканини саме в умовах



впливу протипухлинних хіміопрепаратів при виключенні впливу самого онкологічного захворювання.

У представленому дослідженні застосовували ті хіміопрепарати, які найчастіше використовують у схемах протипухлинної хіміотерапії для лікування онкологічних пацієнтів із кістковими ускладненнями з застосуванням дози зазначених ліків, необхідної для проведення курсу цієї терапії, а саме доксорубіцин ( $60 \text{ мг/м}^2$ ), 5-фторурацил ( $600 \text{ мг/м}^2$ ) та метотрексат ( $40 \text{ мг/м}^2$ ).

Вивчення морфологічних особливостей репаративного остеогенезу проводили в усіх щурів контрольної (без застосування протипухлинних хіміопрепаратів) та трьох експериментальних групах на 15-ту, 30-ту, 45-ту, 60-ту добу після моделювання дефекту в середній третині діяфіза стегнових кісток. Тваринам I групи застосовували доксорубіцин, II групи – 5-фторурацил, III групи – метотрексат. Відповідні протипухлинні хіміопрепарати вводили внутрішньовенно відразу після нанесення травми з подальшим повторним їх призначенням через кожну 21 добу експерименту (після травми, на 21-шу добу, на 42-гу добу).

Проводили вивчення гістологічних препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином з подальшою їх морфометрією, растрову електронну мікроскопію з методом рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії, імуногістохімічне дослідження, дослідження за допомогою комп'ютерної томографії та визначали біомеханічні властивості травмованих стегнових кісток.

У результаті проведеного експерименту при гістологічному дослідженні було встановлено, що у тварин усіх експериментальних груп на 15-ту добу експерименту в ділянці дефекту порівняно з контролем відмічалось збільшення площі сполучної та зменшення ретикулофіброзної тканини. Так, площа ретикулофіброзної кісткової тканини була нижчою від показників контролю в I групі на 15,42 % ( $p = 0,006$ ), у II – на 5,63 % ( $p = 0,33$ ), у III – на 8,29 % ( $p = 0,04$ ). Ретикулофіброзна тканина була представлена

дрібнопетлястими кістковими трабекулами, які порівняно з материнською кісткою були забарвлені нерівномірно та менш інтенсивно, що свідчить про початок осифікації. Міжтрабекулярний простір заповнений сполучною тканиною та кістковим мозком. Межа між краями дефекту й регенератом чітко візуалізована (рис. 1, 2, 3).

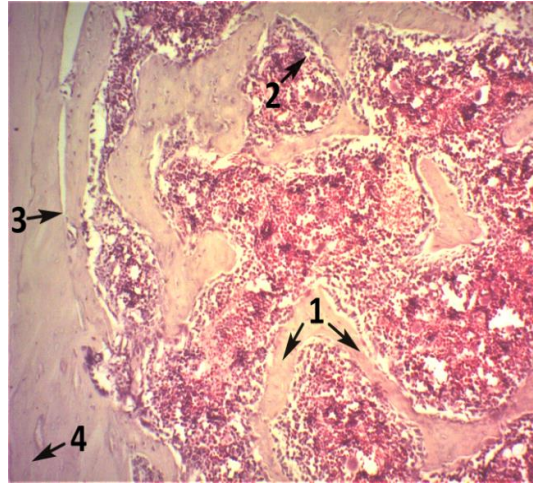


Рисунок 1 – Ділянка дефекту стегнової кістки щура I експериментальної групи на 15-ту добу після перелому: 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – межа материнської кістки та регенерату, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином



Рисунок 2 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи (5-фторурацил) на 15-ту добу після травми: 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

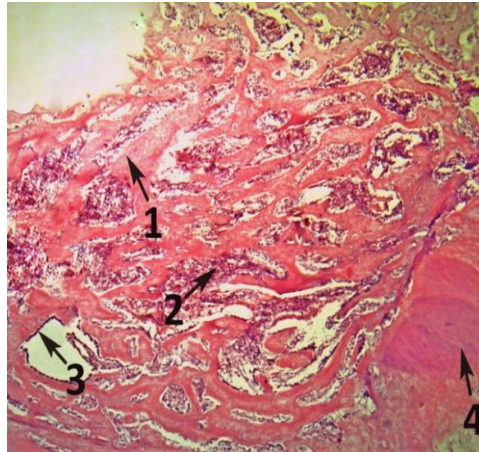


Рисунок 3 – Гістологічний зріз регенерату стегнової кістки щура III експериментальної групи на 15-ту добу після травми: 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – остеобласти, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. х40

На 30-ту добу дослідження в регенераті тварин експериментальних груп простежувалася подальша тенденція до збільшення площі сполучної тканини та зменшення площі новоутвореної ретикулофіброзної тканини порівняно з контролем. Так, у I групі ретикулофіброзна тканина займала в дефекті  $19,50 \pm 3,99$  %, в II групі –  $20,17 \pm 3,19$  %, в III –  $25,67 \pm 4,13$  %, що на 32,36 ( $p = 0,002$ ), 30,04 % ( $p = 0,75$ ) та 10,96 % ( $p = 0,21$ ) нижче від показників контрольної групи (рис. 6). Формування остенів на периферії регенерату свідчило про початок перебудови ретикулофіброзної кісткової тканини в пластинчасту, однак темпи ремоделювання в регенераті були сповільнені. Зменшення частки пластинчастої тканини у I групі становило 49,66 % ( $p = 0,0004$ ), у II групі – 26,25 % ( $p = 0,01$ ), у III – 38,30 % ( $p = 0,003$ ) порівняно з контролем. Між регенератом й материнською кісткою зберігався вільний простір на відміну від контрольної групи, де спостерігалось формування ліній склеювання між зазначеними структурами травмованої кістки (рис. 4).

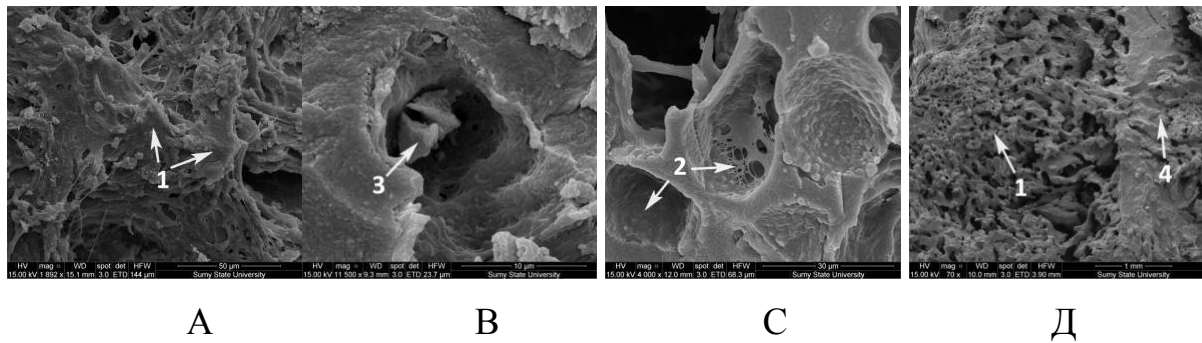


Рисунок 4 – Сканограми кісткового регенерату на 30-ту добу експерименту у контрольній (А) та експериментальних (В-І група, С-ІІ група, Д-ІІІ група) групах тварин: 1-кісткові балки ретикулофіброзної кісткової тканини, 2-кісткова лакуна, 3-остеобласт у кістковій лакуні, 4-материнська кістка

На 45-ту добу експерименту у тварин контрольної групи в ділянці регенерату відмічали подальше збільшення площі кісткової тканини в межах  $67,00 \pm 4,50$  %. Новоутворена кісткова тканина представлена була переважно пластинчастим типом ( $48,50 \pm 3,39$  %). Проте у тварин експериментальних груп встановлена затримка формування регенерату, що проявлялося порушенням тканинних співвідношень у зоні дефекту. Так, у І групі площа новоутвореної кісткової тканини становила  $47,50 \pm 3,63$  %, в ІІ групі –  $61,50 \pm 4,56$  %, в ІІІ –  $45,33 \pm 4,01$  %, що на 29,10 % ( $p = 0,05$ ), 8,21 % ( $p = 0,64$ ) та 32,34 % ( $p = 0,03$ ) нижче від показників контролю. Регенерат був представлений переважно дрібнопетлястими трабекулами з неоднорідно забарвленим матриксом. Більшість трабекул тонкі, зі щілинами й тріщинами, розміщені в хаотичному порядку без відповідності лініям навантаження. Відмічалася затримка формування пластинчастої тканини, розміщеної переважно на периферії регенерату і представленої остеонами різного ступеня зрілості. На межі регенерату і материнської кістки місцями простежувалася поява ліній з'єднань між ними, але їх формування є менш вираженим, ніж у контрольній групі (рис. 5).

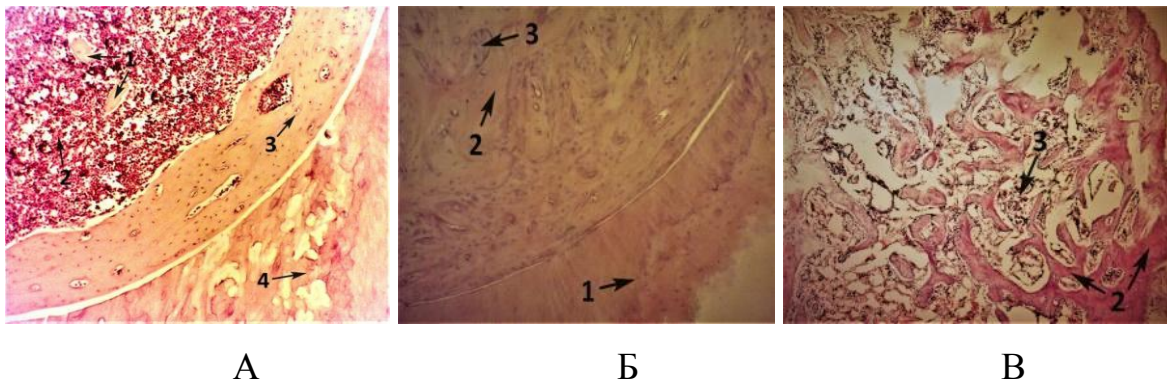


Рисунок 5 – Ділянка дефекту стегнової кістки тварин на 45-ту добу експерименту при дії: А-доксорубіцину, Б-5-фторурацилу, В-метотрексату:

А – 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка. Б, В – 1-материнська кістка, 2-кісткові балки, 3-сполучна тканина.

Забарвлення гематоксилін–еозином. Зб. x100

60-та доба експерименту у тварин контрольної групи характеризувалася формуванням повноцінного кісткового регенерату, представленого кістковою тканиною площею  $92,5 \pm 4,53$  %. Вона на  $81,33 \pm 4,17$  % складалася з пластинчастої кісткової тканини з остеонами різного ступеня зрілості й на  $11,17 \pm 4,17$  % з ретикулофіброзної кісткової тканини. В експериментальних групах тварин у ділянці дефекту відмічалася збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканин поряд із повільним формуванням пластинчастої кісткової тканини, розміщеної переважно на периферії дефекту. Так, у I групі новоутворена кісткова тканина займала  $71,50 \pm 4,52$  % площі регенерату, в II групі –  $87,00 \pm 4,89$  %, в III –  $78,33 \pm 3,54$  %, що на 22,70 % ( $p = 0,34$ ), 5,94 % ( $p = 0,84$ ) та на 15,31 % ( $p = 0,57$ ) менше від показників контрольної групи. Водночас пластинчаста тканина становила в I групі  $41,00 \pm 3,46$  % площі дефекту, в II групі –  $72,33 \pm 4,63$  %, в III –  $59,50 \pm 3,27$  %, що на 49,59 % ( $p < 0,0001$ ), 11,07 % ( $p = 0,008$ ) та 26,84 % ( $p < 0,0001$ ) нижче показників контролю. Між регенератом та материнською кісткою місцями був помітний вільний простір з невеликою кількістю ділянок з'єднань між ними (рис. 6, 7, 8).



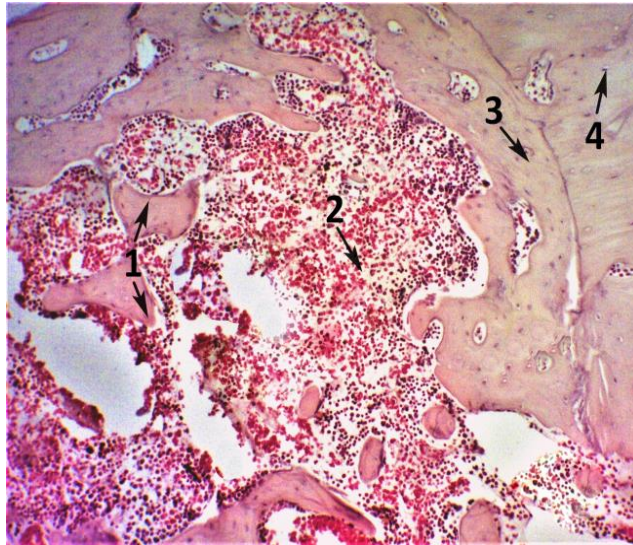


Рисунок 6 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки тварин I експериментальної групи на 60-ту добу після травми: 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

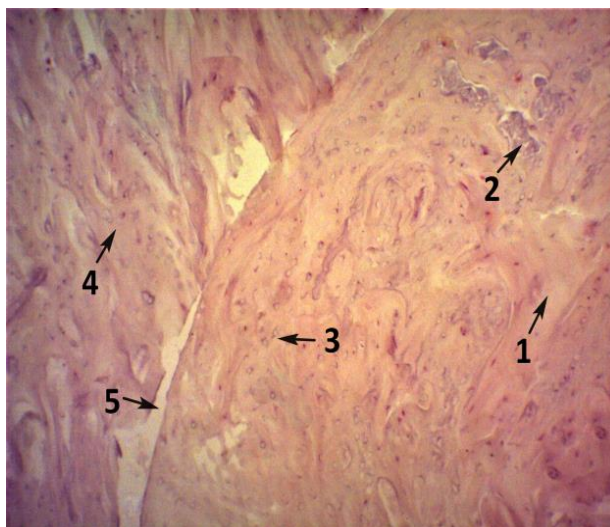


Рисунок 7 – Гістологічний зріз зони дефекту стегнової кістки щура II експериментальної групи на 60-ту добу після травми: 1 – ретикулофіброзна кісткова тканина, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – материнська кістка, 5 – межа регенерату й материнської кістки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100



Рисунок 8 – Гістологічний зріз ділянки дефекту стегнової кістки щура III експериментальної групи на 60-ту добу після травми: 1 – пластинчаста кісткова тканина, 2 – ділянка новоутвореного регенерату низької мінералізації, 3 – сполучна тканина. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x100

Таким чином, у результаті гістологічного аналізу встановлено, що застосування протипухлинних хіміопрепаратів викликає сповільнення темпів перебудови тканин у регенераті. Це проявляється на ранніх етапах репаративного остеогенезу збільшенням площі сполучної тканини в регенераті, сповільненим формуванням ретикулофіброзної кісткової тканини з подальшою затримкою її перебудови в пластинчасту тканину на пізніх етапах. Зокрема, найбільш негативний вплив на темпи перебудови серед усіх експериментальних груп відмічався при застосуванні доксорубіцину та 5-фторурацилу. При застосуванні усіх груп протипухлинних хіміопрепаратів спостерігали затримку формування міцних з'єднань між регенератом та материнською кісткою.

Отримані результати експерименту співпадають з висновками робіт Nadji P. (2015), яка дослідила, що протипухлинна хіміотерапія призводить до втрати кісткової маси, зумовленої нездатністю остеобластів утворювати достатню кількість кісткової тканини, щоб компенсувати посилену остеокластичну резорбцію кістки [17]. Зокрема, Rana T. та співавтори (2013) в експерименті на мишах установили, що лікування доксорубіцином викликає

зростання циркулюючого рівня трансформуючого фактору росту бета (TGFβ), який сприяє остеолітичному пошкодженню кісток [18]. Також Pountos I. та співавтори (2017) дослідили, що метотрексат у високих дозах, які призначають для лікування онкологічних захворювань, сповільнює загоєння перелому кісток, пригнічуючи проліферацію фібробластів та індукцію їх апоптозу. Він також знижує вироблення колагену й одночасно збільшує рівні матричних металопротеїназ, що беруть участь у розщепленні позаклітинного матриксу. Проте застосування низьких доз метотрексату при лікуванні ревматологічних та шкірних захворювань не виявляє інгібуючого впливу на процеси репаративної регенерації [19].

У нашому дослідженні для оцінки темпів та активності процесів репаративного остеогенезу ми використовували імуногістохімічні маркери кісткового метаболізму: маркер кісткової резорбції катепсин К та маркер кісткоутворення остеопонтин.

За результатами імуногістохімічного дослідження катепсину К встановлено, що у тварин експериментальних груп на 15-ту добу експерименту експресія цього маркера в I групі становила  $33,17 \pm 1,94$  % імуноактивних клітин, у II –  $32,67 \pm 1,63$  % клітин, у III –  $33,83 \pm 1,47$  % клітин, що на 7,00 % ( $p = 0,04$ ), 5,38 % ( $p = 0,07$ ) та 9,13 % ( $p = 0,005$ ) вище від показників контролю (рис. 14, 15). Інтенсивність забарвлення цитоплазми визначали як високу (+++). Це свідчить про високу проліферативну активність остеогенних клітин та активацію процесів резорбції в ділянці регенерату при дії протипухлинних хіміопрепаратів.

Однак активність маркера остеопонтину у тварин експериментальних груп в ділянці регенерату була слабовираженою порівняно з контролем ( $18,17 \pm 1,47$  %) і становила у I групі  $14,17 \pm 1,17$  %, у II групі –  $15,83 \pm 1,17$  %, у III –  $14,83 \pm 1,17$  %, що на 22,01 % ( $p = 0,0003$ ), 12,87 % ( $p = 0,01$ ) та 18,38 % ( $p = 0,001$ ) нижче показників контрольної групи (рис. 9). Інтенсивність забарвлення цитоплазми імунопозитивних клітин була низькою. Отже, протипухлинні хіміопрепарати сповільнюють темпи диференціювання



клітинних елементів у регенераті з подальшою затримкою формування ретикулофіброзної кісткової тканини.

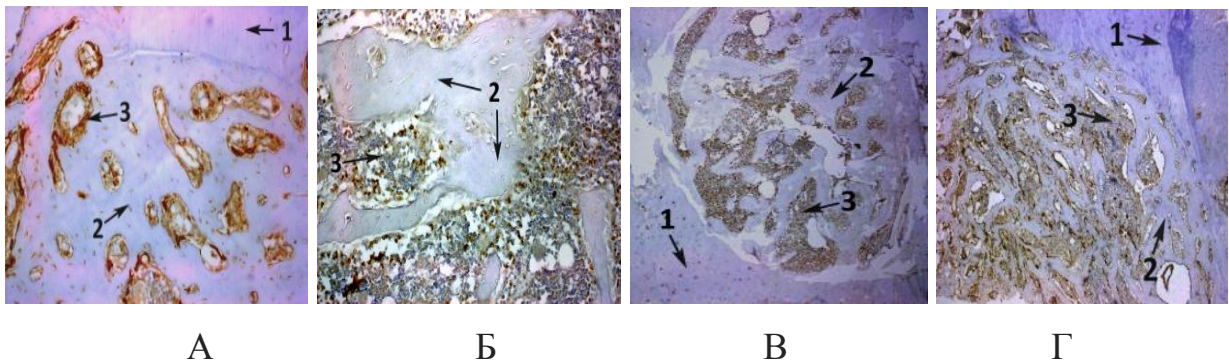


Рисунок 9 – Експресія катепсину К у кістковому регенераті на 15-ту добу експерименту: А-у контролі, Б - при дії доксорубіцину; В - 5-фторурацилу, Г- метотрексату. 1-материнська кістка, 2-кісткові балки, 3-сполучна тканина

На 30-ту добу дослідження в контрольній групі тварин у ділянці регенерату відмічалось зниження активності експресії катепсину К на 8,06 % ( $p = 0,02$ ) порівняно з попереднім терміном експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++) . Отримані дані вказують на зниження інтенсивності процесів резорбції в кістковому регенераті.

Однак при дії протипухлинних хіміопрепаратів відмічалось, навпаки, зростання рівня експресії катепсину К, про що свідчили його показники в I групі на рівні  $31,17 \pm 1,47$  %, в II –  $30,67 \pm 1,37$  %, в III –  $31,67 \pm 1,75$  %, що на 9,37 % ( $p = 0,02$ ), 7,61 % ( $p = 0,04$ ) та 11,12 % ( $p = 0,01$ ) вище за відповідні показники контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів залишалася високою (+++).

На 30-ту добу дослідження в контрольній групі спостерігалася подальша тенденція до зростання експресії остеопонтину в межах  $20,83 \pm 1,17$  % імуноактивних клітин. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була низькою (+). За нашими даними, це свідчить про початок мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в ділянці дефекту. Проте в усіх експериментальних групах лише окремі кісткові клітини, розміщені переважно на периферії

регенерату, виявляли імунореактивність. Водночас рівень експресії остеопонтину в ділянці регенерату становив у I групі  $17,33 \pm 1,21$  %, у II групі –  $18,50 \pm 1,05$  %, у III –  $17,50 \pm 1,05$  %, що на  $16,80$  % ( $p < 0,05$ ),  $11,19$  % ( $p < 0,05$ ) та  $15,98$  % ( $p < 0,05$ ) нижче від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення їх цитоплазми була низькою.

Отже, підвищення активності експресії катепсину K та зниження експресії остеопонтину свідчили про активацію процесів резорбції й зниження кісткоутворення в регенераті, що призводило до сповільненого формування ретикулофіброзної кісткової тканини в регенераті та подальшої її перебудови в пластинчасту кісткову тканину, а також низької мінералізації новоутвореного органічного матриксу.

На 45-ту добу експерименту в контрольній групі встановлене подальше зниження експресії катепсину K. Він виявлявся у  $25,17 \pm 1,47$  % імунопозитивних клітин, що на  $18,81$  % ( $p < 0,05$ ) менше, ніж на початку дослідження. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як низьку (+). Показник експресії остеопонтину виявляється у  $24,00 \pm 1,41$  % клітин, що на  $13,21$  % ( $p = 0,002$ ) більше за попередній термін експерименту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною. Одержані дані імуногістохімічного дослідження у вигляді зниження активності експресії катепсину K та, навпаки, зростання експресії остеопонтину свідчили про переваження процесів формування кісткової тканини в ділянці дефекту над процесами резорбції та зростання інтенсивності процесів мінералізації в регенераті.

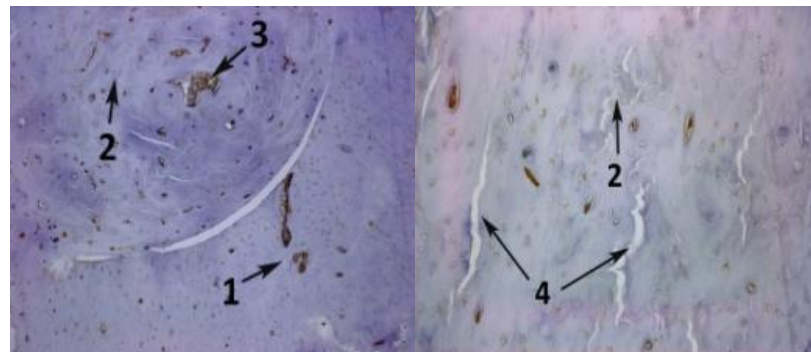
У тварин експериментальних груп на 45-ту добу експерименту маркер катепсину K виявлявся в I групі у  $29,50 \pm 1,87$  % клітин, у II групі – у  $28,50 \pm 1,05$  %, у III –  $29,83 \pm 1,47$  %, що на  $17,20$  % ( $p = 0,0012$ ),  $13,23$  % ( $p = 0,0011$ ) та  $18,50$  % ( $p = 0,0002$ ) вище від показників контролю. Інтенсивність забарвлення цитоплазми остеоцитів була помірною (++) . Водночас встановлене незначне збільшення показника експресії остеопонтину, який у I групі виявлявся у  $19,17 \pm 1,47$  % імуноактивних клітин, у II групі – у  $21,67 \pm$

1,21 %, у III – у  $19,33 \pm 1,63$  %, що на  $14,81$  % ( $p = 0,003$ ),  $13,74$  % ( $p = 0,002$ ) та  $12,93$  % ( $p = 0,019$ ) більше, ніж на 30-ту добу після перелому й на  $20,13$  % ( $p = 0,0001$ ),  $13,87$  % ( $p = 0,0001$ ) та  $19,46$  % ( $p = 0,0003$ ) менше, ніж у контрольній групі. Імунопозитивні клітини зосереджені переважно по краям кісткового дефекту. Інтенсивність забарвлення цитоплазми їх залишалася низькою. Таким чином, у тварин експериментальних груп відмічалася затримка формування кісткової мозолі та зниження її мінералізації.

На 60-ту добу експерименту у тварин контрольної групи експресія катепсину К відмічалася у  $22,67 \pm 1,63$  % клітин кісткового регенерату, що на  $9,93$  % менше ( $p = 0,02$ ) за попередній термін експерименту та на  $26,84$  % менше ( $p < 0,05$ ), ніж на 15-ту добу після перелому. Інтенсивність забарвлення цитоплазми клітин оцінювали як низьку (+). Це свідчило про активацію процесів проліферації в новоутвореному регенераті. Поряд із цим, спостерігалось подальше зростання експресії остеопонтину в регенераті на рівні  $26,67 \pm 1,21$  % клітин, що на  $11,12$  % ( $p = 0,006$ ) більше за попередній термін експерименту та на  $46,78$  % ( $p < 0,05$ ) більше, ніж на початку експерименту. Одержані дані є підтвердженням подальшої активної мінералізації органічного матриксу в кістковій мозолі.

У тварин експериментальних груп на 60-ту добу експерименту експресія катепсину К у I групі становила  $28,50 \pm 1,87$  % імунопозитивних клітин, у II групі –  $26,67 \pm 1,63$  %, у III –  $27,83 \pm 1,17$  %. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була помірною (++) . Відмічалось зниження активності цього маркера порівняно з попереднім терміном дослідження в усіх експериментальних групах, але його рівень експресії був вищим, ніж у контролі на  $25,72$  % ( $p < 0,05$ ),  $17,64$  % ( $p < 0,05$ ) та  $22,76$  % ( $p < 0,05$ ) відповідно, що свідчить про посилену резорбцію кісткової тканини в ділянці регенерату в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів. Також слід відзначити наявність великої кількості мікротріщин як на поверхні новоутвореного кісткового регенерату, так і в материнській кістці, що свідчить про негативний вплив протипухлинних хіміопрепаратів на кісткову

систему (рис. 10). Отримані результати відповідають даним Raghu Nadhanan R. та співавторів (2012), які дослідили, що лікування 5-фторурацилом спричиняє експресію цитокіну фактору некрозу пухлин-альфа ( $TNF\alpha$ ). Він активує рецептор маркера остеокластів ядерний фактор NF- $\kappa B$  і, отже, стимулює остеокластогенез, що призводить до посиленої втрати кісткової тканини під час проведення протипухлинної хіміотерапії [20].



А

Б

Рисунок 10 – Експресія катепсіну К у кістковому регенераті на 60-ту добу експерименту при застосуванні: А-5-фторурацилу (II група), Б-метотрексату (III група). Зб.  $\times 100$ . 1-материнська кістка, 2-кістковий регенерат, 3-сполучна тканина, мікротріщини

Поряд із цим встановлено зростання рівня експресії остеопонтину. Так, експресія остеопонтину в I групі становила  $21,17 \pm 1,47$  %, в II групі –  $22,17 \pm 1,47$  %, в III групі –  $20,83 \pm 1,17$  %. Проте це відповідно на  $20,62$  % ( $p < 0,05$ ),  $18,87$  % ( $p < 0,05$ ) та  $21,89$  % ( $p < 0,05$ ) нижче від показників контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми імуноактивних клітин визначали як помірну (рис. 11). Одержані дані підтверджують результати робіт Fan C., Georgiou K. R. (2017), в яких досліджено, що хіміотерапія доксорубіцином спричиняє зменшення утворення кісткової маси внаслідок пригнічення проліферації, диференціювання та мінералізації остеобластів і стимулює опосередковану остеокластами резорбцію кісткової тканини [21].

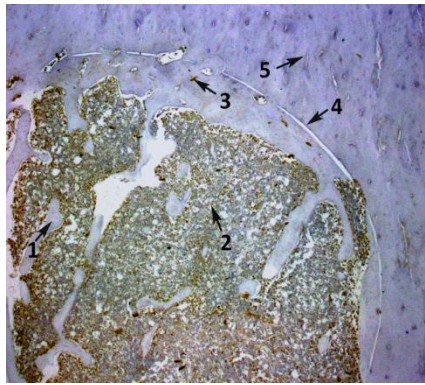


Рисунок 11 – Експресія остеопонтину в ділянці кісткового дефекту на 60-ту добу експерименту у тварин I експериментальної групи: 1 – кісткові балки, 2 – сполучна тканина, 3 – пластинчаста кісткова тканина, 4 – межа регенерату й материнської кістки, 5 – материнська кістка.  
Забарвлення гематоксиліном Майєра. Зб. x100

Отже, за результатами імуногістохімічного дослідження, застосування протипухлинних хіміопрепаратів призводить до посилення процесів резорбції кісткової тканини та зниження інтенсивності її формування та мінералізації. Зокрема, найбільш негативний вплив на стан кісткового метаболізму серед усіх експериментальних груп відмічався при застосуванні доксорубіцину та метотрексату. Застосування доксорубіцину призвело до затримки формування кісткових балок ретикулофіброзної кісткової тканини та значного сповільнення їх перебудови у пластинчасту тканину. Метотрексат спричиняв формування великої кількості мікротріщин та розривів у тонкостінних балках новоутвореної кісткової тканини.

У нашому дослідженні, за результатами растрової електронної мікроскопії, встановлений інгібуючий вплив протипухлинних хіміопрепаратів на процеси репаративного остеогенезу. Зокрема, аналіз сканограм на 15-ту добу експерименту свідчив про переважання в регенераті сполучної тканини, розташованої в центрі дефекту, наявність витончених новоутворених кісткових трабекул по краях регенерату з широкими міжбалковими просторами та відсутність тісних контактів між регенератом і материнською

кісткою. На 30-ту добу експерименту більша частина регенерату була представлена дрібнопетлястими, хаотично розташованими балками грубоволокнистої кісткової тканини з незначними ділянками пластинчастої кісткової тканини переважно на периферії. На 45-ту добу більша частина регенерату була представлена ретикулофіброзною кістковою тканиною, відмічалася затримка її перебудови в пластинчасту тканину, що розташована була переважно по краям дефекту. На 60-ту добу експерименту в регенераті спостерігали сповільнене формування пластинчастої тканини, наявність ділянок витончених кісткових балок та міжбалкових просторів, заповнених сполучною тканиною. Установлено відсутність тісних контактів між регенератом та материнською кісткою. Таким чином, застосування протипухлинних хіміопрепаратів спричиняє затримку утворення кісткової мозолі у вигляді зниження темпів диференціювання клітинних елементів у ділянці новоутвореного регенерату з подальшим сповільненим формуванням ретикулофіброзної кісткової тканини та затримкою її перебудовою в пластинчасту кісткову тканину. Зокрема, найбільший інгібуючий вплив на темпи перебудови серед усіх експериментальних груп встановлений при застосуванні доксорубіцину та метотрексату.

За допомогою зондового мікроаналізу встановлено, що у тварин контрольної групи впродовж експерименту відмічалася позитивна динаміка зростання рівнів Са й Р в ділянці новоутвореного регенерату, що свідчило про активні процеси мінералізації. Отримані дані експериментального дослідження підтверджують праці Hernandez-Veserra E. та співавторів, у яких на щурах лінії Вінстар, починаючи з 3-го тижня життя і до 7 місяців встановлене поступове зростання рівнів кальцію та фосфору, що корелює з поступовим зростанням рівня мінеральної щільності кісткової тканини, який визначався на рівні шийки стегнової кістки [22].

В експериментальних групах на 15-ту добу експерименту в ділянці новоутвореного регенерату рівні Са й Р були нижчими за показники контролю в I групі на 52,17 % ( $p < 0,05$ ) і 34,88 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, в II групі – на

17,24 % ( $p < 0,05$ ) і 3,48 % ( $p = 0,15$ ), в III групі – на 36,04 % ( $p < 0,05$ ) і 21,16 % ( $p < 0,05$ ). Також відмічалось зниження рівнів Са й Р порівняно з контролем на поверхні материнської кістки, що прилягала до регенерату: в I групі – на 14,79 % ( $p < 0,05$ ) та 24,52 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, в II групі – на 18,52 % ( $p < 0,05$ ) та 22,60 % ( $p < 0,05$ ), в III групі – на 22,24 % ( $p < 0,05$ ) та 13,64 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 10 А, Б). На межі регенерату й материнської кістки рівень цих макроелементів також був нижчим за показники контролю, що пов'язано, на нашу думку, з активацією процесів реорганізації в ділянці новоутвореного кісткового регенерату та використанням ендogenous Са для його осифікації. Таким чином, одержані дані мікроаналізу на 15-ту добу експерименту в усіх експериментальних групах свідчать про зниження інтенсивності мінералізації як у регенераті, так і в материнській кістці у відповідь на травму.

Упродовж усього експерименту встановлено поступове зростання рівнів Са й Р як на поверхні регенерату, так і в ділянках материнської кістки, що прилягала до нього, проте вони були меншими за аналогічні показники контрольної групи (рис. 12). Так, на 30-ту добу в ділянці дефекту показники Са й Р у I групі були нижчими на 53,90 % ( $p < 0,05$ ) та 37,91 % ( $p < 0,05$ ) відповідно за дані контролю, в II групі – на 21,78 % ( $p < 0,05$ ) та 10,62 % ( $p < 0,05$ ), у III – на 39,31 % ( $p < 0,05$ ) та 23,96 % ( $p < 0,05$ ).

Зберігалася тенденція до подальшого зниження рівня Са і Р в материнській кістці порівняно з попереднім терміном експерименту: у I групі – на 3,06 % ( $p < 0,005$ ) і 4,26 % ( $p < 0,05$ ), у II групі – на 3,86% ( $p < 0,005$ ) і 5,05 % ( $p < 0,05$ ), у III групі – на 3,87% ( $p < 0,05$ ) і 3,73 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

На 45-у добу зниження рівня Са й Р в ділянці дефекту порівняно з контролем становило в I групі 54,02 % ( $p < 0,05$ ) та 31,13% ( $p < 0,05$ ), в II групі – 24,11 % ( $p < 0,05$ ) та 6,60 % ( $p < 0,05$ ), в III групі – 40,63 % ( $p < 0,05$ ) та 21,87 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

На 60-у добу експерименту в регенераті відмічалось зростання вмісту Са й Р порівняно з попереднім терміном, проте одержані показники були нижчими, ніж у контролі: в I групі – на 45,68 % ( $p < 0,05$ ) та 21,46 % ( $p < 0,05$ ),

у II групі – на 26,03 % ( $p < 0,05$ ) та 17,07 % ( $p < 0,05$ ), у III групі – на 40,66 % ( $p < 0,05$ ) та 25,20 % ( $p < 0,05$ ). Також на відміну від попередніх термінів у материнській кістці та ділянках, прилеглих до регенерату, відмічалось поступове зростання рівня цих макроелементів у межах 1 – 2 % ( $p < 0,05$ ), але їх рівень був нижчим, ніж у контролі: в I групі – на 15,60 % ( $p < 0,05$ ) та 18,58 % ( $p < 0,05$ ), в II групі – на 20,45 % ( $p < 0,05$ ) та 17,33 % ( $p < 0,05$ ), в III групі – на 22,24 % ( $p < 0,05$ ) та 14,59 % ( $p < 0,05$ ) (рис. 12, 13). Таким чином, за умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів спостерігалось зниження інтенсивності процесів мінералізації в ділянці новоутвореного регенерату та ремоделюючої активності материнської кістки, прилеглої до нього як результат компенсаторної реакції у відповідь на травму.

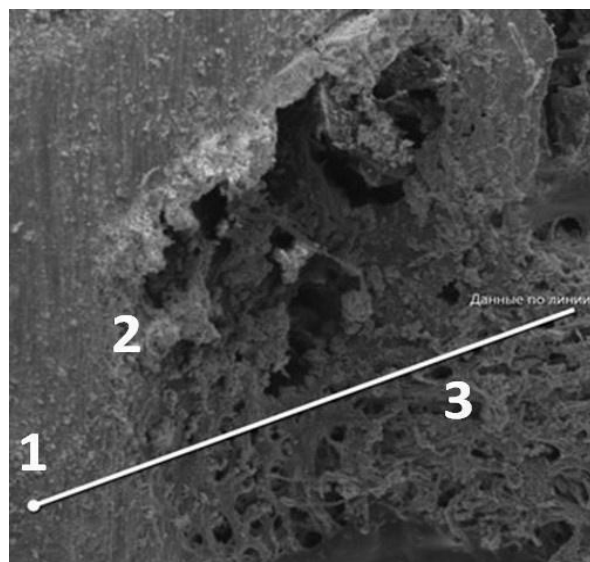
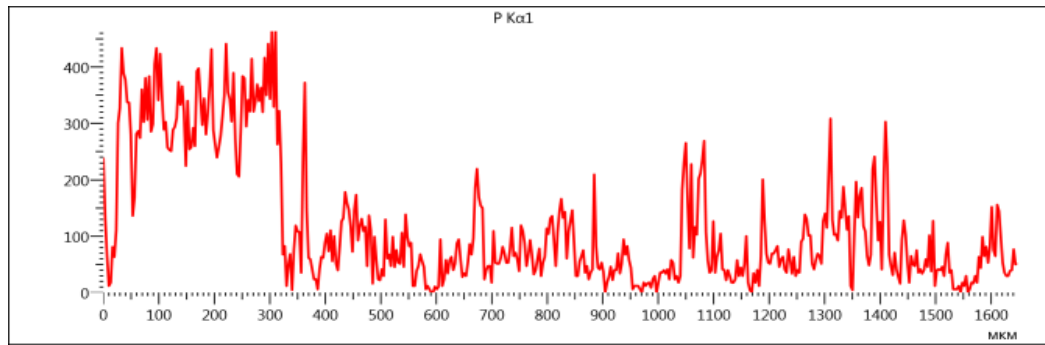
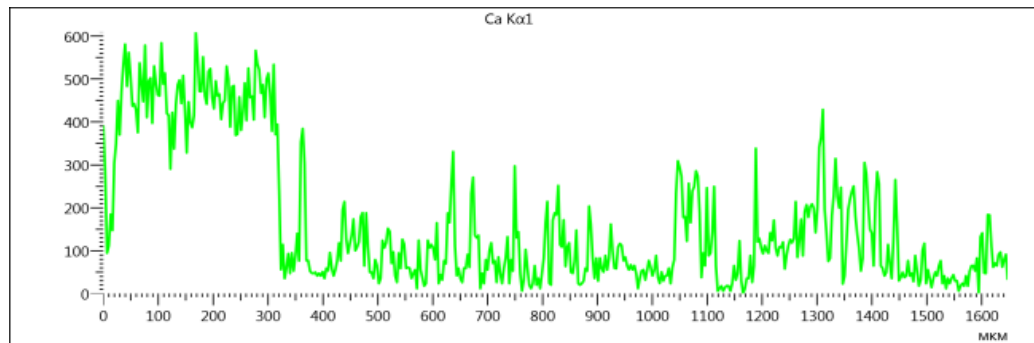


Рисунок 12 – Ділянка дефекту стегнової кістки на 60-ту добу після травми у тварин I експериментальної групи, яким вводили доксорубіцин:  
1 – материнська кістка, 2 – межа регенерату і материнської кістки, 3 – регенерат. Зб. х300





А



Б

Рисунок 13 – Розподіл рівня фосфору та кальцію на поверхні травмованої стегнової кістки (материнська кістка, межа її з регенератом, регенерат) при застосуванні доксорубіцину на 60-ту добу експерименту:

А – фосфор, Б – кальцій

Отримані нами результати підтверджують праці Calciolari E., Mardas N. та співавторів, які в експериментальному дослідженні на щурах установили, що зниження кальцію в новосформованій кістці через 30 діб у тварин призводить до зменшеного утворення кісткової тканини та до нижчої її якості, що виражалось зниженням дозрівання кісток [23].

Також, Robin F. та співавтори (2021) дослідили, що хіміотерапія метотрексатом негативно впливає на кістковий метаболізм, а саме спричиняє зниження мінеральної щільності кісткової тканини. Це зумовлено зменшенням кількості остеобластів, остеоцитів і хондроцитів у ростовій пластинці та збільшенням кількості й активності остеобластів [24].

За результатами КТ-дослідження у тварин контрольної групи терміни репаративної регенерації кісток не були порушені. У період із 45-ї до 60-ї доби, за даними КТ, візуально відмічалася повна консолидація переломів стегнових кісток. Кісткова мозоль з вираженими періостальними та ендостальними нашаруваннями повністю заповнювала дефект стегнової кістки. Проте, відмінність показників ОЩ регенерату та материнської кістки на 60-ту добу експерименту свідчить про незавершений процес перебудови кісткової тканини. Репаративний остеогенез не супроводжувався розвитком ускладнень.

В усіх експериментальних групах на фоні застосування протипухлинних хіміопрепаратів встановлено затримку формування кісткової мозолі. На 30-ту добу в ділянці травми візуалізувався дефект стегнової кістки без ознак консолидації. На 45-ту добу в ділянці перелому визначалася слабовиражена кісткова мозоль за рахунок ендостальних нашарувань (рис. 14). На 60-ту добу кісткова мозоль в ділянці дефекту була представлена помірно вираженими періостальними й ендостальними нашаруваннями, проте повної консолидації перелому не відмічалася (рис. 15).

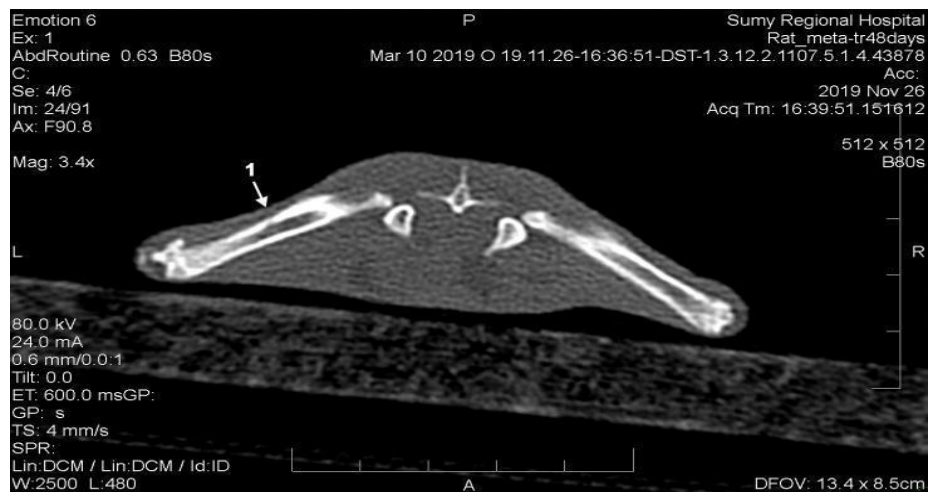


Рисунок 14 – Комп’ютерна томограма стегнових кісток щура на 45-ту добу експерименту в разі застосування метотрексату:

1 – дефект кортикального шару лівої стегнової кістки



Рисунок 15 – Комп’ютерна томограма лівої стегнової кістки щура на 60-ту добу експерименту в разі введення доксорубіцину (А), 5-фторурацилу (Б).

Дефект кортикального шару лівої стегнової кістки.

Сповільнення процесів загоєння дефекту в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів підтверджують низькі показники ОЩ регенерату й материнської кістки порівняно з контрольною групою. Так, на 15-ту добу з моменту травми ОЩ в ділянці регенерату у тварин I експериментальної групи становила  $444,30 \pm 31,94$  НУ, II групи –  $503,50 \pm 17,75$  НУ, III групи –  $398,00 \pm 30,58$  НУ, що на 45,51 % ( $p < 0,001$ ), 28,40 % ( $p < 0,001$ ) та 62,44 % ( $p < 0,001$ ) нижче за відповідні дані контрольної групи (рис. 4.8). У I групі ОЩ МК у дистальній частині становила  $1553,50 \pm 14,84$  НУ та  $2287,00 \pm 30,25$  НУ у проксимальній частині, в II групі:  $1378,50 \pm 21,18$  НУ у дистальній та  $2029,50 \pm 33,22$  НУ у проксимальній частинах; у III групі:  $1258,50 \pm 10,99$  НУ у дистальній, та  $1983,00 \pm 30,61$  НУ у проксимальній частинах. Одержані дані є нижчими за показники контрольної групи в дистальній частині МК на 19,04 % ( $p < 0,0001$ ), 34,15 % ( $p < 0,0001$ ) та 46,94 % ( $p < 0,0001$ ); у проксимальній частині МК – на 7,69 % ( $p < 0,0001$ ), 21,36 % ( $p < 0,0001$ ) та 24,21 % ( $p < 0,0001$ ). Упродовж експерименту відмічалось поступове збільшення ОЩ як у ділянці регенерату, так і в материнській кістці, проте спостерігалось достовірне зниження зазначених показників порівняно з контрольною групою тварин. Так, на 60-ту добу з моменту травми ОЩ у тварин I експериментальної групи в ділянці регенерату становила  $1353,00 \pm 25,18$  НУ, II групи –  $1655,00 \pm 32,69$  НУ, III групи –  $1551,00 \pm 21,33$  НУ, що на

37,08 % ( $p < 0,0001$ ), 23,02 % ( $p < 0,0001$ ) та 27,86 % ( $p < 0,0001$ ) нижче за відповідні дані контрольної групи. Також установлене у I, II, III групах зниження ОЩ в дистальній частині МК на 23,06 % ( $p < 0,0001$ ), 28,05 % ( $p < 0,0001$ ) та 22,75 % ( $p < 0,0001$ ) та в проксимальній: на 22,57 % ( $p < 0,0001$ ), 16,02 % ( $p < 0,0001$ ) та 21,91 % ( $p < 0,0001$ ) відповідно аналогічних показників контрольної групи.

Проведене КТ-дослідження свідчить про сповільнення процесів репаративної регенерації на фоні протипухлинної хіміотерапії.

Таким чином, в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів відмічалось сповільнення процесів консолідації при загоєнні кісткового дефекту стегнової кістки, що проявлялось утворенням слабовираженої кісткової мозолі порівняно з контрольною групою тварин. Повільне зростання ОЩ в регенераті та материнській кістці свідчило про зниження інтенсивності мінералізації в новоутвореній кістковій мозолі. Відмінність показників ОЩ в регенераті та материнській кістці вказує на незавершений репаративний остеогенез на 60-ту добу експерименту. Найбільш виражений негативний вплив на загоєння перелому мав доксорубіцин.

Під час дослідження механічних властивостей у контрольній групі тварин відмічалось поступове зростання межі міцності на стиск діалізу стегнових кісток впродовж експерименту. Так, на 60-ту добу після травми цей показник становив  $120,24 \pm 3,25$  МПа, що на 25,85 % ( $p < 0,0001$ ) більше, ніж на 15-ту добу експерименту. Швидкість ремоделювання дефекту стегнової кістки повністю відповідала термінам репаративної регенерації кісткової тканини [24].

За умов впливу протипухлинних хіміопрепаратів впродовж усього експерименту відмічалось поступове незначне зростання зазначеного показника. Так, на 60-ту добу після травми межа міцності на стиск діафізу стегнових кісток визначалась у I групі в межах  $87,17 \pm 4,89$  МПа, у II групі –  $98,02 \pm 4,82$  МПа, у III групі –  $91,92 \pm 2,91$  МПа, проте це на 37,94 % ( $p < 0,0001$ ),

22,67 % ( $p < 0,0001$ ) та 30,81 % ( $p < 0,0001$ ) є нижчим за показники контролю (рис. 31).

У експерименті встановлено зростання показника мікротвердості регенерату у тварин контрольної групи впродовж усього дослідження, що свідчить про активні процеси мінералізації в кістці та покращення її пружних властивостей. Так, на 60-ту добу експерименту зазначений показник становив  $532,33 \pm 18,18$  МПа, що на 9,57 % ( $p < 0,005$ ) більше, ніж на 15-у добу після травми.

Однак в усіх експериментальних групах на тлі поступового збільшення показника мікротвердості в регенераті з кожним наступним терміном репаративної регенерації відмічалось його зниження порівняно із контрольною групою. Так, на 60-ту добу після травми середнє значення показника мікротвердості у I групі становило  $418,67 \pm 12,44$  МПа, у II групі –  $468,83 \pm 18,57$  МПа, у III групі –  $446,50 \pm 24,54$  МПа, що на 37,94 % ( $p < 0,0001$ ), 22,67 % ( $p < 0,0001$ ) та 30,81 % ( $p < 0,0001$ ) менше за аналогічні показники контрольної групи (рис. 32).

Таким чином, в умовах впливу протипухлинних хіміопрепаратів встановлено зниження межі міцності на стиск діяфізу травмованих стегнових кісток, що негативно впливає на механічні властивості довгих кісток скелета в цілому, та зниження мікротвердості регенерату порівняно з контролем, що свідчить про уповільнене формування повноцінної кісткової мозолі в ділянці травми та затримку процесів мінералізації новоутвореного кісткового матриксу. Найбільш виражений негативний вплив мав доксорубіцин та метотрексат, найменший – 5-фторурацил.

Установлений у нашому дослідженні негативний вплив протипухлинних хіміопрепаратів на кістковий метаболізм підтверджують дослідження Handforth С., в яких доведено, що навіть одна доза цитотоксичної хіміотерапії призводить до значної та стійкої втрати кісткової тканини внаслідок посиленої резорбції кісток [25]. За результатами Quach J. та співавторів на 14-ту добу після одноразового введення протипухлинного

хіміопрепарата (5-фторурацилу, циклофосфаміду) відмічається тимчасове збільшення кісткового обміну. Це зумовлено розвитком запальної реакції, опосередкованої такими цитокінами, як фактор некрозу пухлини-альфа, інтерлейкін-6, моноцитарний хемоаттракуючий білок-1. Унаслідок їх дії відбувається активація остеокластів. Таким чином, втрата кісткової маси в разі застосування протипухлинної хіміотерапії спричинена посиленою остеокластичною резорбцією кістки [26].

Зокрема, Straszkowski L. та співавтори встановили, що лікування доксорубіцином індукує трансформуючий фактор росту- $\beta$  (TGF $\beta$ ), який збільшує диференціацію остеокластів і пригнічує диференціацію остеобластів. Це призводить до збільшення резорбції кісток та прискореної втрати кісткової тканини. Крім того, доксорубіцин безпосередньо впливає на вироблення кісткового матриксу остеобластами й зменшує об'єм остеїдів, що сповільнює мінералізацію кісткового регенерату остеобластами порівняно з контролем та зумовлює зниження межі міцності при його застосуванні [27].

Наші результати експериментального дослідження підтверджують праці Tagasi Rana, в яких зазначено, що застосування доксорубіцину в дитячому віці призводить до тривалого пошкодження кісток у вигляді підвищеного ризику переломів та затримки росту в дорослому віці. Автор зазначає, що в дослідженнях на тваринах експозиція доксорубіцину спричиняла 60 % зниження утворення кісток у щурів, що свідчить про зниження диференціації остеобластів. Також було встановлено, що доксорубіцин негативно впливав на мікроархітектуру, зменшуючи об'єм трабекулярної кістки та число трабекулярних тканин і збільшуючи поділ самих трабекул. Шкідливі наслідки лікування цим препаратом на мікроархітектуру трабекул були помітні як через 2, так і через 10 тижнів після останнього прийому. Це свідчить про те, що вплив доксорубіцину на трабекулярну кістку є тривалим [18].

У роботах Liu Y. та співавторів також встановлений негативний вплив хіміотерапії метотрексатом на кістки, що проявлявся пошкодженням

метаепіфізарної пластини росту кісток, зменшенням товщини первинної спонгіози та зменшенням об'єму метафізарної кістки [28].

Під час дослідження мікротвердості ми встановили його поступове зростання в щурів контрольної групи із кожним наступним терміном експерименту. Це свідчить про активні процеси мінералізації в кістці та покращення її пружних властивостей у процесі репаративної регенерації.

Проте, в усіх експериментальних групах відмічалось поступове достовірне зниження показників зниження мікротвердості регенерату, що свідчило про уповільнення формування повноцінної кісткової мозолі в ділянці травми та затримку процесів мінералізації новоутвореного кісткового матриксу в умовах застосування протипухлинних хіміопрепаратів. Зазначеним змінам біомеханічних характеристик відповідає поступове зниження процесу мінералізації кісток.

Наші результати підтверджують праці Fonseca H. та співавторів, у яких встановлено, що терапія доксорубіцином приводить до зменшення міцності кісток, що пов'язано з істотним зниженням активності мітохондрій, які у великій кількості містяться в остеобластах та остеокластах. Це порушує процеси кісткового ремоделювання, сповільнює утворення нової кісткової тканини та її мінералізацію, порушує трабекулярну мікроархітектуру й ріст кісток. Також встановлено, що доксорубіцин зменшує нормальне розширення окістя, що відіграє вирішальну роль у здатності діафіза переносити навантаження при згинанні та перекруті. Отже, доксорубіцин виявляє тривалий негативний вплив на стійкість кісток до переломів [29].

Показаний у нашому експерименті інгібуючий вплив 5-фторурацилу на кісткову систему підтверджується працями Fan C., Georgiou K. R. Автори зазначають, що застосування цього хіміопрепарату призводить до втрати кісткової тканини внаслідок посиленої активності резорбції кісток. Це пов'язано зі збільшенням кількості остеокластів у метафазі та кількості ядер в остеобластах, що свідчить про підвищений резорбтивний потенціал після лікування 5-фторурацилом, сприяючи зниженню трабекулярного об'єму

кістки. Установлено, що призначення 5-фторурацилу в дозі 150 мг/кг зменшує щільність остеобластів та преостеобластів, що значно знижує потенціал мінералізації кісткового матриксу. Зазначені зміни в регенерації кісткової тканини призводять до зниження мікротвердості кісток та сприяють виникненню переломів у пацієнтів під час проведення протипухлинної хіміотерапії [30].

Відзначений у нашому дослідженні негативний вплив метотрексату на механічні властивості кісток підтверджують праці Fan C. M., у яких встановлено, що тривале лікування високими дозами метотрексату пригнічує проліферацію остеобластів та преостеобластів, спричиняє зменшення їх щільності, що пов'язано з індукцією апоптозу остеобластів. Відомо, що саме кількість та активність остеобластів на поверхні трабекулярної кістки визначають і змінюють кількість, розмір та форму кісткових трабекул, впливаючи таким чином на кісткову масу й мікротвердість. Зокрема, при короткостроковому застосуванні метотрексату кісткові трабекули були меншими за кількістю і більше розділялися між собою, що відповідає результатам короткотермінового дослідження на щурах [31].

Результати досліджень Shandala T. показали, що лікування метотрексатом збільшує кількість остеокластів в 1,8 раза, що пов'язано з підвищеною експресією запальних цитокінів IL-6 (у 10 разів) та IL-11 (у 2 рази). Ці зміни призвели до активації остеокластогенезу з подальшою втратою близько 35 % трабекулярної кістки та зниженням мікротвердості кісткової тканини [32].

В іншому дослідженні, проведеному Georgiou K. R., King T. J. та співавторами, було встановлено, що інгібуючий вплив метотрексату зумовлений зниженням активації сигнального шляху Wnt/ $\beta$ -катеніну. Це також призводить до пригнічення гемопоетичної, остеогенної, адипогенної та остеокластогенної диференціації кісткового мозку. Отже, хіміотерапія раку часто спричиняє втрату кісткової маси, ожиріння мозку та дефекти кровотворення [33]. Gawade P.L. та співавтори у своїх працях зазначали, що



пацієнти, які перенесли рак у дитинстві, перебувають у групі ризику пізніх наслідків щодо лікування, пов'язаних зі скелетною системою. Щонайменше через 2 роки після завершення хіміотерапії раку в дітей, підлітків або молодих осіб були виявлені пізні скелетні ефекти у вигляді низької мінеральної щільності кісток, остеонекрозу, онкогенного рахіту та порушення росту кісток [34].

Застосування протипухлинних хіміопрепаратів (доксорубіцину, 5-фторурацилу, метотрексату) негативно впливає на механічні властивості довгих трубчастих кісток, що проявляється зниженням показників межі міцності на стиск та мікротвердості кісткової тканини і за відповідних умов може бути розцінене як фактор ризику виникнення переломів у пацієнтів під час проведення протипухлинної хіміотерапії.

## **2.2 Структурні особливості регенерації шкіри за умов хронічної гіперглікемії та при застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми**

Проблема репаративної регенерації органів та тканин на фоні хронічної гіперглікемії залишається однією з найбільш значущих та недостатньо вивчених у медицині та біології. Загоєння ран при хронічній гіперглікемії може носити тривалий, рецидивуючий характер та погано піддаватися лікуванню, особливо у людей старшого віку. Хронічна гіперглікемія часто ускладнює перебіг загоєння ран та збільшує ризик розвитку їх хронізації, що викликає серйозну стурбованість у всьому світі. На сьогодні відбувається збільшення кількості людей, які страждають на цукровий діабет, що вже цілком обґрунтовано трактується як неінфекційна пандемія [121].

Завдяки науковій, клінічній та економічній значимості, вивчення процесів загоєння ран стало метою багатьох досліджень. Крім того, сьогодні ведеться активний пошук економічно ефективних методів, які б сприяли покращенню та прискоренню регенерації ран шкіри [116].

Тому, нами було проведено дослідження по вивченню регенерації шкіри у тварин різних вікових груп із хронічною гіперглікемією та при введенні

збагаченої тромбоцитами плазми. У експерименті ми моделювали механічну травму шкіри та стрептозоточин індуковану хронічну гіперглікемію. Вивчення морфологічних особливостей регенерації шкіри у всіх щурів проводили на 7-му, 14-ту та 21-шу добу після моделювання рани.

Отже при вивченні літературних даних ми виявили, що Іванов Е. В. Та співавтори дослідили, що на 8-му добу дослідження регенерації шкіри у щурів групи контролю більша частина рани була закрита грануляційною тканиною, інтенсивно інфільтрованою нейтрофілами, макрофагами та лімфоцитами. Регенеруючий край епідермісу був потовщений з чітко вираженими базальним, шипуватим та зернистим шарами. На 16-ту добу спостерігалось згасання запального процесу та зникнення ознак гострого пошкодження. Під новим тонким епідермісом утворилася грубоволокниста сполучна тканина. У групі контролю до 24-ої доби експерименту рана повністю загоїлась у всіх тварин. Крім того, автори зазначають, що у деяких щурів контрольної групи репітелізація рани завершилася до 16-ї доби, а у всіх тварин групи контролю до 24-ої доби експерименту [115].

У нашому дослідженні у щурів усіх вікових груп на 7-му добу експерименту рана була заповнена грануляційною тканиною інфільтрованою клітинами макрофагально-фагоцитарного ряду. У тварин молодого віку зустрічалися поодинокі лімфоцити та ліпоцити. Також, у щурів молодого віку у регенераті шкіри ми спостерігали телоцити разом із фібробластами в оточенні колагенових волокон, що сприяло більш швидкому зменшенню площі рани. У тварин зрілого та старечого віку виявлялися кровоносні судини з невопноцінними стінками, у результаті чого спостерігалися периваскулярні крововиливи, і як наслідок недостатнього кровопостачання у регенератах шкіри утворювалася велика кількість ліпоцитів та відбувалося зменшення швидкості загоєння ран шкіри порівняно з тваринами молодого віку.

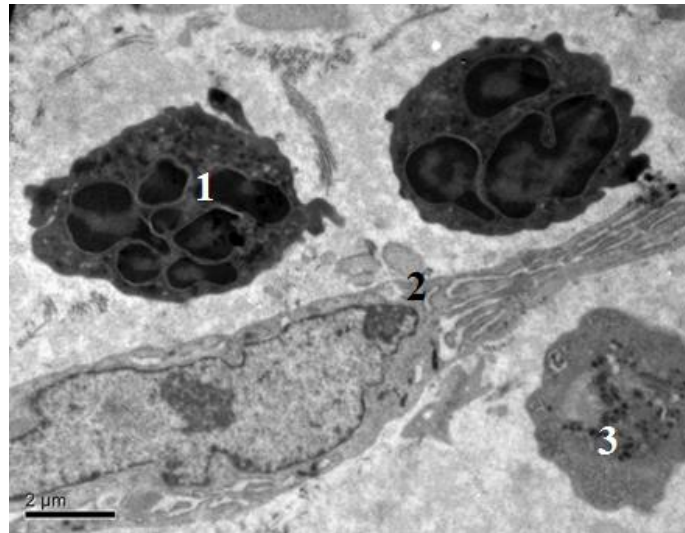


Рисунок 16 – Ділянка регенерата шкіри щура молодого віку контрольної групи на 7-му добу експерименту: 1 – нейтрофільний гранулоцит, 2 – телоцит, 3 – дегенеративно змінений нейтрофіл. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

На 21-шу добу експерименту у щурів молодого віку групи контролю місце дефекту було повністю заміщено новоутвореним епітелієм та дермою. Добре було видно фігури мітозу у базальному шарі. Разом з тим, між клітинами не завжди спостерігалось міцне сполучення, а у новоутвореній шкірі локально відмічався розвиток папіломатозу. Клітинний склад дерми окрім фібробластів, був представлений поодинокими макрофагами, клітинами Лангерганса та лімфоцитами. Спостерігалися волосяні цибулини в оточені сальних залоз, які мали досить великі розміри та розвинуті часточки. У дермі відмічалася розвинена сітка судин мікроциркуляторного русла.

У щурів зрілого віку контрольної групи на 21-шу добу експерименту епітелізація рани відбулась майже повністю. У базальному шарі епідерміса, як і у щурів молодого віку відмічалася велика кількість мітозів на різних стадіях. У новоутвореній дермі візуалізувалися сосочковий та сітчастий шари. Спостерігалися волосяні фолікули в оточені сальних залоз.

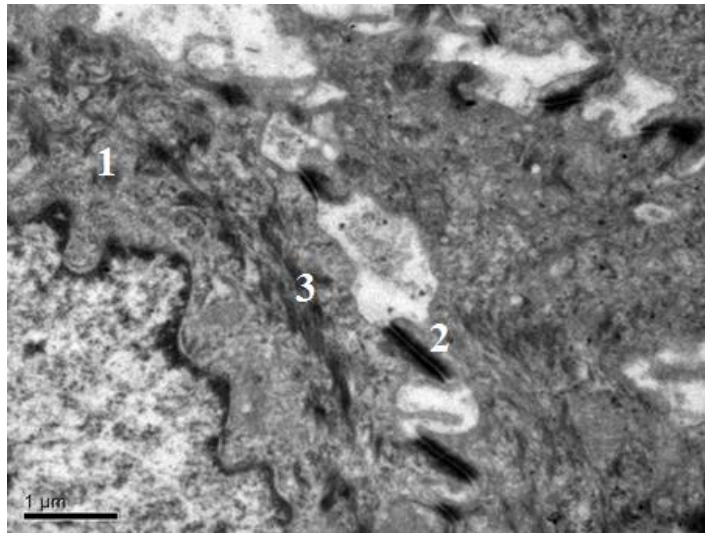


Рисунок 17 – Ділянка регенерату шкіри щура контрольної групи молодого віку на 21-шу добу експерименту: 1 – базаліоцит, 2 – десмосома, 3 – тонофіламенти.

Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

У тварин старечого віку у кінці експерименту місце дефекту не повністю було заповнено епітелієм. Кількість капілярів та інших судин мікроциркуляторного русла була меншою порівняно з тваринами молодого та зрілого віку, що можливо вплинуло на те, що місцями спостерігалось порушення кератинізації. Міцного сполучення між базальним шаром та нижче лежачою дермою не було, відбувалось проростання епітелію у дерму, що також може бути наслідком порушення процесів кератинізації та утворення базальної мембрани. У роговому шарі спостерігалися залишки зруйнованих клітин. Реорганізації сполучної тканини дерми у сосочковий та сітчастий шари ми не спостерігали.

При порівнянні площ ранової поверхні на 7-му добу дослідження найбільшого зменшення зазнала площа рани у щурів молодого віку, вона зменшилась на 56,74% ( $p < 0,001$ ) від площі рани на початку експерименту. У щурів зрілого віку площа рани зменшилася на 50,58% ( $p < 0,001$ ), а у тварин старечого віку – на 35,71% ( $p < 0,001$ ) від початку експерименту. На 21-шу добу дослідження площа рани зменшилася у щурів молодого та зрілого віку майже однаково. Так, у щурів молодого віку площа рани склала 0,46% ( $p < 0,001$ ) від

площі рани на початку експерименту, а у тварин зрілого віку 0,79% ( $p < 0,001$ ). У тварин старечого віку площа рани була на рівні 3,42% ( $p < 0,001$ ) від площі завданної рани.

Цікавим виявилось, що швидкість загоєння дефектів шкіри у групі контролю найбільшою була у тварин молодого та зрілого віку на 7-му та 14-ту добу дослідження та найменшою у кінці експерименту. У щурів старечого віку на початкових термінах дослідження швидкість регенерації ран була найменшою серед усіх тварин, а на 21-шу добу найбільшою.

Також, у щурів молодого та зрілого віку щільність судин на початку експерименту була майже однаковою. Далі на всіх термінах дослідження щільність судин у регенератах була достовірно найбільшою у тварин молодого віку.

Найбільш частим ускладненням у пацієнтів з цукровим діабетом є порушення процесу загоєння ран шкіри, що приводить до таких ускладнень, як виразки діабетичної стопи, які викликають серйозну стривоженість у всьому світі через різні клінічні та соціально-економічні проблеми [115]. Дослідження показують, що загоєння ран сповільнюється через гіперглікемію під час ЦД [117].

Рановий процес на фоні цукрового діабету має певні особливості, що характеризуються різко вираженими мікроциркуляторними розладами, наявністю мікротромбів, формуванням сладж-феноменів, дистрофічними та некротичними процесами, перевагою запального процесу над репаративним, пригніченням клітинної проліферації.

На думку Yixiao Dong та його колег, регенерація рани в осіб з підвищеним рівнем глюкози у крові, порушується на всіх фазах загоєння. Відбувається аномальний ангиогенез, стійке запалення, неадекватне утворення грануляційної тканини, знижується синтез колагену та глікозаміногліканів.

Е. Ф. Ефімов та А. В. Хорошкевич у своїх дослідженнях з'ясували, що у регенератах шкіри пацієнтів, які страждають на цукровий діабет, є прояви паренхіматозного диспротеїнозу та жирової дистрофії, що відображає

порушення тканинного метаболізму у даної категорії хворих і є фактором для виникнення ранових ускладнень. Перебіг ранового процесу у таких пацієнтів характеризується пролонгуванням фази запалення та затримкою регенеративних процесів [118].

Аналізуючи характер регенерації шкіри у щурів різних вікових груп із змодельованою хронічною гіперглікемією ми виявили, що на 7-му добу дослідження проростання епідермісу у центр рани краще за все відбулося у щурів молодого віку, що обумовлене репаративними, компенсаторноприспосувальними механізмами та віковим аспектом. Так, площа ранової поверхні на 7-му добу дослідження у щурів молодого віку із хронічною гіперглікемією була на 16,28% ( $p < 0,001$ ) меншою відповідно площі рани на початку експерименту. У щурів зрілого віку на 7-му добу площа рани зменшилася на 14,204% ( $p < 0,001$ ) від початкової площі дефекту. При цьому, у тварин старечого віку зменшення рани відбулося лише на 8,99% ( $p < 0,001$ ) порівняно із вихідним показником на початку експерименту.

Цікавим було виявити, що при мікроскопічному дослідженні регенерату шкіри на ранніх термінах дослідження у щурів молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією біля крайових ділянок дефекту спостерігалось проростання епідермісу. Однак, чіткого порядку у клітинних шарах не було. У його товщі спостерігалися клітини макрофагальнолейкоцитарного ряду, залишки некротичного детриту, великі пустоти та розриви. Грануляційна тканина, окрім вогнищ запального інфільтрату містила судини просвіт яких був дуже широким, а стінки були неповноцінними.

На 7-му добу експерименту у щурів зрілого віку із хронічною гіперглікемією місце травми, також було заповнено запальним інфільтратом та грануляційною тканиною. Інтенсивність проростання кровоносними судинами регенерату була менша порівняно з контролем. Але, треба зазначити, що при цьому, судини утворювали хаотичну мережу з усіх типів відразу та все ж таки, вони були нестабільними, незрілими, не мали повноцінної базальної

мембрани та перицитів, міжєндотеліальні пори були значно збільшені, внаслідок чого біля крайових ділянок дефекту під епідермісом спостерігалися значні крововиливи. Проростання нового епідермісу під струпом відбулось трохи менше порівняно із тваринами молодого віку.

У щурів старечого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією на 7-му добу експерименту місце рани, здебільшого було заповнене запальним інфільтратом. Тільки у глибоких шарах спостерігався розвиток грануляційної тканини з малою кількістю судин мікроциркуляторного русла. Крім того у тварин даної вікової групи спостерігався розвиток дегенеративнодистрофічних змін у ділянках інтактної шкіри, які межували з раною, що не було характерно для інших щурів. У дермі відбувався лізис аморфного матриксу та пучків колагенових волокон, внаслідок чого втрачалось чітке розмежування сітчастої та сосочкової частин дерми. Збільшувалась кількість жирових клітин та відбувалось руйнування волосяного апарату шкіри. Утворення нового епідермісу не було виявлено. Можна припустити, що ці зміни відбулись внаслідок скомпрометованих віком та хронічною гіперглікемією судин дерми інтактної шкіри та агресивним впливом запального інфільтрата на цьому фоні.

Аналізуючи швидкість загоєння дефектів шкіри у тварин усіх вікових груп із хронічною гіперглікемією на ранніх термінах експерименту ми виявили, що найбільшою вона була у щурів молодого віку, що і підтверджувалось гістологічними даними, а саме найкращою серед усіх тварин епітелізацією рани. Але, порівнюючи із контрольним показником даного терміну дослідження, ми встановили, що швидкість загоєння рани у тварин молодого віку із хронічною гіперглікемією знизилась в 3,64 рази ( $p < 0,001$ ). У тварин зрілого віку швидкість епітелізації дефекту також знизилась та становила  $(3,12 \pm 0,82)$  мм<sup>2</sup>/добу, що в 4,14 рази ( $p < 0,001$ ) менше від контрольного показника. Найменшою швидкість загоєння рани була у тварин старечого віку –  $(1,94 \pm 0,59)$  мм<sup>2</sup>/добу, що в 4,49 рази ( $p < 0,001$ )

повільніше за швидкість епітелізації рани у тварин із нормальним рівнем глюкози у крові.

Швидкість епітелізації рани залежить також і від збережених залишків базальної мембрани з базальними кератиноцитами епідермісу, клітин волосяних фолікулів та сальних залоз. При поверхневому пошкодженні шкіри без порушення базальної мембрани та сосочкового шару дерми, регенерація шкіри завжди досягається шляхом посиленої проліферації базальних кератиноцитів. При пошкодженні шкіри із зачіпанням сосочкового шару дерми, внаслідок якого пошкоджується базальна мембрана та капіляри поверхневої судинної мережі, регенерація шкіри, як правило, протікає за рахунок збережених фрагментів базальної мембрани, клітин волосяних фолікулів та епітелію сальних залоз. При такому загоєнні кератиноцити починають активно ділитися і спрямовуватися на дно рани, а також переходять із країв рани. Спочатку створюється одиночний шар клітин, а потім багатошаровий, під яким проходить завершення регенерації шкіри.

На думку Грамкова І. І. та Максимової Є. Р. швидкість регенерації шкіри залежить від глибини та площі пошкодження, стану імунітету шкіри та від того, як протікає мікроциркуляція у судинному руслі шкірного покриву. За умов хронічної гіперглікемії має місце локальне зниження VEGF, внаслідок чого погіршується утворення судинних колатералей та загоєння ран.

В експериментальній роботі було показано, що при ЦД фібробласти, які відповідають за загоєння ран, експресують VEGF у 7 разів гірше, ніж здорові фібробласти. За умов впливу гіпоксії не відбувається збільшення експресії VEGF, що сприяє поганому загоєнню ран при цукровому діабеті та більш затяжному періоду одужання при ранових ушкодженнях.

Гіперглікемія та пов'язані з нею розлади метаболізму порушують нормальний ангиогенез. Високий рівень глюкози знижує експресію рецепторів VEGF в ендотеліальних клітинах, пригнічує здатність цих клітин до спрямованої міграції та формуванню судиноподібних структур. Крім того, надлишок глюкози зменшує здатність мезенхімальних стромальних клітин



стимулювати ангиогенез через паракринну активність. Показано, що вираженість порушення продукції VEGF, ендотеліальної NO-синтази та інтенсивність ангиогенезу залежить не тільки від рівня, а й від діапазону коливань глікемії. Важливу роль у порушенні ангиогенезу грають пізні продукти глікозилювання, що накопичуються в умовах гіперглікемії.

При дослідженні щільності судин мікроциркуляторного русла регенератів шкіри щурів із хронічною гіперглікемією з використанням маркера судин CD34<sup>+</sup> ми виявили, що найбільшою вона була у щурів молодого віку на всіх термінах експерименту. Але, на 7-му та 14-ту добу дослідження щільність судин у тварин молодого віку статистично не відрізнялася від показника щурів зрілого віку ( $p=0,4329$ ) та ( $p=0,5545$ ). У тварин старечого віку даний показник був найменший серед усіх груп.

Порівнюючи із контролем, щільність судин у щурів молодого віку із хронічною гіперглікемією на 7-му добу дослідження була на 53,75% ( $p<0,001$ ) менше. На 14-ту добу показник був меншим на 42,26% ( $p<0,001$ ), а на 21-шу добу – 36,28% ( $p<0,001$ ).

У тварин зрілого віку із хронічною гіперглікемією щільність судин на 7-му добу була меншою на 54,56% ( $p<0,001$ ), на 14-ту – на 37,68% ( $p<0,001$ ), а на 21-шу добу менше на 45,36% ( $p<0,001$ ) відповідно контрольної групи (рис. 4.8). У щурів старечого віку із хронічною гіперглікемією щільність судин була меншою на 36,37% ( $p<0,004$ ) на 7-му добу експерименту, на 31,39% ( $p<0,008$ ) на 14-ту добу та на 49,08% ( $p<0,0224$ ) менше контрольних показників відповідних термінів дослідження.

За умов хронічної гіперглікемії відбуваються зміни в імунній системі: зниження кількості лейкоцитів та лімфоцитів, порушення основних функцій нейтрофілів та макрофагів, у тому числі адгезії, хемотаксису та фагоцитозу, редукція бактерицидної здатності, зменшення адгезії поліморфноядерних лейкоцитів та зниження апоптозу. Встановлено, що у пацієнтів із хронічною гіперглікемією має місце підвищення виділення прозапальних цитокінів (ФНП- $\alpha$ , ІЛ-6, ІЛ-8, активних форм кисню) та зниження секреції

ендотеліального оксиду азоту, що сприяє вазоконстрикції. Зниження активності імунної системи підвищує ризик інфікування рани, при виникненні якого нейтрофіли та макрофаги у надлишку виділяють матриксну металопротеїназу та оксиданти.

A. Prakash et al. повідомили про зниження міцності ран у інсуліндефіцитних тварин. W. H. Goodson і T. K. Hunt виявили зменшення вмісту колагену в ранах у тварин із цукровим діабетом. E. R. Arguilla et al. W. H. Goodson та T. K. Hunt встановили, що у тварин з цукровим діабетом призначення інсуліну більше значення має на ранніх стадіях процесу ранового загоєння. Рання фаза загоєння, протягом якої призначення інсуліну має вирішальне значення, є періодом запальної відповіді. Виявлення порушень у цій фазі у тварин з діабетом корелює з відомими даними про порушення функціональної активності лейкоцитів у хворих на діабет. При цьому має місце зниження хемотаксису та фагоцитозу.

Підвищення рівня активних форм кисню та прозапальних цитокінів також призводить до зростання концентрації матриксної металопротеїнази у рановій рідині, що відображається на розщепленні та розпаді компонентів внутрішньоклітинного матриксу та закритті рани. Крім того, матриксна металопротеїназа має здатність руйнувати фактори росту та цитокіни, необхідні для загоєння. У результаті, недостатність продукції цитокінів у процесі загоєння призводить до хронізації ранового процесу. За даними інших авторів, цитокіни, які тривало містяться у рановій рідині незагоєваної рани пригнічують ріст та сприяють морфологічним змінам нормальних фібробластів шкіри, що також сприяє довготривалій регенерації дефектів шкіри.

У нашому аналізі зразків травмованої шкіри щурів молодого віку із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу виявилось, що повної епітелізації ран не відбулось. Лише біля крайових ділянок дефекту спостерігалось проростання епідермісу без чіткого порядку у клітинних шарах. Привертало увагу, що у його товщі зберігалися клітини макрофагально-лейкоцитарного

ряду, залишки некротичного детриту, великі пустоти та розриви. Формування повноцінної дерми не відбулося, натомість був утворений суцільний шар сполучної тканини у товщі якого нами були виявлені лейкоцити, макрофаги, лімфоцити, зруйновані еритроцити, залишки клітинного та тканинного детриту, а також судини, просвіт яких був дуже широким, а стінки були неповноцінними.

У тварин зрілого віку із хронічною гіперглікемією повного заміщення рани епідермісом, також ми не спостерігали, лише біля її крайових ділянок. У ньому ми не спостерігали формування повноцінної базальної мембрани, внаслідок чого базаліоцити не мали міцного зчеплення, спостерігалось їх проникнення у товщу нижче лежачої сполучної тканини. Також, слід зазначити, що між шипуватими кератиноцитами спостерігалися нейтрофіли та залишки зруйнованих клітин. На межі між епідермісом та дермою спостерігалися капіляри із зруйнованими стінками та локальні крововиливи.

У щурів старечого віку із хронічною гіперглікемією на 14-ту добу дослідження рана частково була вистелена неповноцінним епідермісом, у якому спостерігалось порушення процесів кератинізації, проростання клітин епідермісу у сполучну тканину дерми. У його товщі відмічалось утворення пустот, які із середини були вистелені кератиноцитами. Дерма була представлена щільною сполучною тканиною, у якій відмічались локальні ділянки запального інфільтрату. Ангіогенез був нерівномірним. Капіляри були неповноцінними. Артеріоли мали потовщенні оболонки та периваскулярний інфільтрат.

Отже, вищезазначений мікроскопічний аналіз зразків регенератів шкіри тварин усіх вікових груп із хронічною гіперглікемією показав, що на 14-ту добу не відбулось повного розсмоктування запального інфільтрату й розвитку повноцінного неоангіогенезу.

Гіперглікемія спричинює негативний вплив на регенеративні можливості шкірних покривів. Це пов'язано з ефектами кінцевих продуктів глікування, які індують продукцію факторів запалення (ФНП  $\alpha$ , ІЛ-1) та

порушують синтез колагену фібробластами. У результаті патогенного впливу гіперглікемії відбувається значна кількість молекулярних та клітинних порушень, рана не проходить етапи загоєння, та зупиняється, у більшості випадків, на фазі запалення.

Дослідження S. Leibovich та R. Ross свідчать, що розлади загоєння ран у період запальної фази, особливо елімінація макрофагів, є безпосередньою причиною подальшого порушення проліферації фібробластів та синтезу колагену. Таким чином, незадовільний результат загоєння ран у пацієнтів з цукровим діабетом може бути пов'язаний з дефектом запальної відповіді.

За умов хронічної гіперглікемії фібробласти можуть мати фенотип «старіючих» клітин, демонструючи низьку відповідь на ТФР- $\beta$  та ТФР, міграційну та проліферативну здатність, а також схильність до апоптозу.

У нашому дослідженні порушень у проліферації фібробластів та синтезу колагену з формуванням сполучнотканинного шара регенерата у щурів усіх вікових груп ми не спостерігали. Однак, слід зазначити, що у ході експерименту ми виявили ознаки затримання елімінації запального інфільтрата на всіх термінах експерименту, особливо на ранніх.

Низька інтенсивність реепітелізації у тривало регенеруючих ранах може бути пов'язана зі зниженням швидкості міграції та проліферації кератиноцитів, на які впливають багато факторів: склад матриксу та активність цитокінів, що синтезуються фібробластами та макрофагами у ранове середовище. У тривало регенеруючих ранах їх рівень знижений, кератиноцити не мають здатності мігрувати.

Під час вивчення регенерації шкіри щурів із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу експерименту, ми виявили, що найменша площа дефекта шкіри була у щурів зрілого віку. У тварин старечого віку площа ураження залишалась найбільшою. Але, слід зазначити, що повної епітелізації ран у цей термін дослідження у жодній групі щурів із хронічною гіперглікемією не відбулося. Також, привертало увагу, що у регенератах шкіри в усіх піддослідних щурів в утвореному епітелії ми спостерігали порушення

процесів кератинізації, неповноцінну базальну мембрану, внаслідок чого відбувалось проникнення клітин епітелію у товщу сполучної тканини дерми, у якій чіткого формування на сосочковий та сітчастий шари ми не виявили.

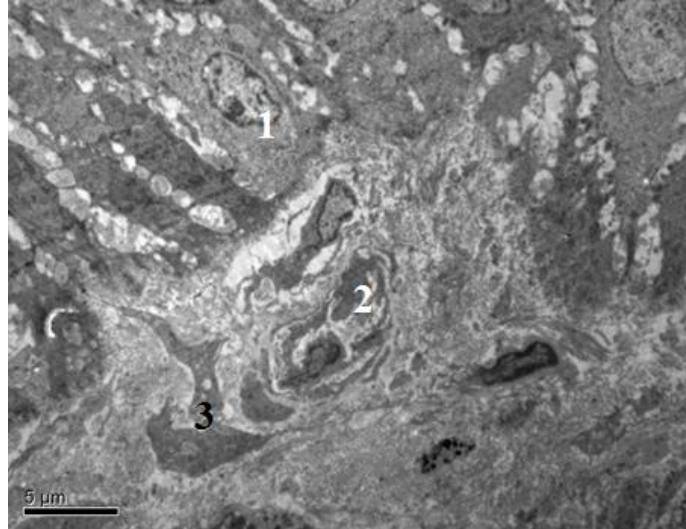


Рисунок 18 – Ділянка регенерата шкіри щура молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією на 21-ту добу дослідження: 1 – базаліоцити, 2 – капіляр, 3 – фібробласти. Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

У щурів зрілого віку безпосередньо під епітелієм спостерігалось щільне розміщення пучків колагенових волокон між якими відмічалася велика кількість судин мікроциркуляторного русла. Судини мали нормальні повнокровні просвіти. Однак у нижчих шарах сполучна тканина містила більше аморфного матриксу та осередки запального інфільтрату. Кровоносні судини мали розширені просвіти та були малокровними. Утворення волосяних фолікулів та сальних залоз ми не спостерігали. У зернистому шарі спостерігалися концентричні агрегати кератину.

У щурів старечого віку із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу дослідження між клітинами епідермісу та у верхніх шарах дерми

спостерігалися лімфоцити та сегментоядерні нейтрофіли. Роговий шар містив залишки зруйнованих органел, сполучення між корнеоцитами не було міцним.

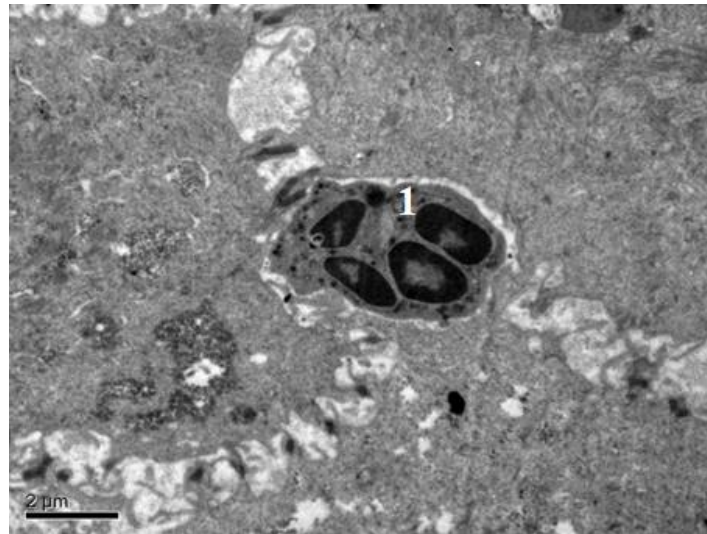


Рисунок 19 – Ділянка регенерата шкіри щура зрілого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією на 14-ту добу дослідження:

1 – нейтрофіл. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

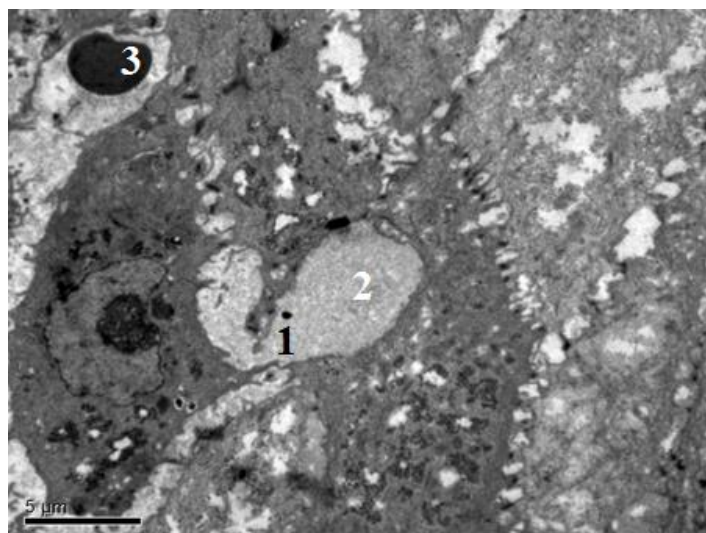


Рисунок 20 – Ділянка регенерата шкіри щура старечого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією на 14-ту добу дослідження:

1 - зруйновані міжклітинні зв'язки, 2 – порожнина, 3 – еритроцит. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

У дослідженні Іванова Е. В. у щурів із ЦД у порівнянні з контрольною групою загоєння ран сповільнилося на пізніх етапах (24-та доба). При цьому, середні значення розміру рани в різні терміни експерименту між групами ЦД та контролю значимо не відрізнялися. Але, було відмічено, що до кінця експерименту в групі контролю у всіх тварин рана повністю зажила, а в групі тварин з ЦД спостерігали варіабельність швидкості загоєння ран.

У нашому дослідженні на ранніх термінах дослідження швидкість загоєння ран та зменшення їх площ у контрольних групах була більше, ніж у групах із хронічною гіперглікемією. На 21-шу добу в обох групах із хронічною гіперглікемією швидкість загоєння рани виросла, а у груп контролю, навпаки, зменшилася. При цьому у щурів зрілого віку контрольної групи площа рани була найменшою серед усіх груп. У всіх інших тварин на 21-шу добу повної епітелізації рани не відбулося. У щурів із ХГ на 21-шу добу площа рани була меншою у щурів зрілого віку, а швидкість її загоєння більшою порівняно з групою тварин старечого віку із ХГ.

Під час морфометричного аналізу регенератів шкіри щурів усіх вікових груп із хронічною гіперглікемією, ми виявили що товщина епідермісу та дерми найбільшою серед усіх тварин у кінці дослідження була у щурів зрілого віку. Найменшою вона виявилася у щурів старечого віку.

Порівнюючі ці показники зі контрольними, то ми виявили, що на всіх термінах дослідження товщина епідермісу та дерми найгірше відновились у тварин старечого віку. У щурів зрілого віку із хронічною гіперглікемією на ранніх термінах дослідження товщина дерми була найбільшою відповідно усіх тварин до їх контрольних значень, а на останніх термінах експерименту у тварин цієї ж вікової групи товщина епідермісу виявилася найбільшою.

Регенерація рани являє собою складну проблему для сучасної охорони здоров'я, оскільки далеко не завжди існуючі методики лікування є ефективними, що обумовлює необхідність освоєння нових перспективних методів. У зв'язку з цим на сьогодні великий інтерес у дослідників викликає

можливість використання ЗТП при лікуванні хворих із пошкодженнями м'яких тканин [119].

Застосування ЗТП набуває все більшого інтересу в регенеративній медицині завдяки своєму потенціалу стимулювати та прискорювати загоєння тканин. ЗТП містить platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), fibroblast growth factor (FGF), epithelium growth factor (EGF) та vascular endothelial growth factor (VEGF), що мають здатність стимулювати ангиогенез та збільшувати диференціювання фібробластів, прискорюючи процеси загоєння ран. Крім того, PDGF та EGF – це головні чинники, що впливають на проліферацію, міграцію фібробластів та синтез колагену. За даними літератури, підвищена концентрація цих факторів прискорює загоєння рани в 2-3 рази [120]].

Epithelium growth factor відіграє життєво важливу роль у проліферації, диференціюванні, міграції клітин епітелію та кератиноцитів. Вважається, що EGF є ефективним у стимулюванні епітелізації глибоких пошкоджень. Більша концентрація EGF виявляється на початку процесу загоєння.

Fibroblast growth factor сприяє реепітелізації, ангиогенезу та прискорює утворення грануляційної тканини. Дослідження на моделях діабетичної миші показали прискорене загоєння ран.

ЗТП містить не тільки фактори росту, але й адгезивні молекули та цитокіни, що стимулюють репараційні та анаболічні процеси у пошкоджених тканинах, а також володіють протизапальним ефектом.

У своїх дослідженнях по вивченню структурних особливостей загоєння асептичних ран м'яких тканин А. А. Глухов з'ясував, що на 14-ту добу при використанні тромбоцитарного концентрату відбувалась епітелізація рани з повною диференціацією клітинних шарів епідермісу. При цьому товщина його була збільшена внаслідок потовщення шиповатого та зернистого шарів. До 14-ї доби дослідження вже були сформовані сосочковий та сітчасті шари дерми.

Клітинний компонент дерми був представлений фібробластами, тканинними базофілами, нерідко зустрічалися клітини макрофагального ряду.



В окремих препаратах зустрічалися ділянки великої клітинної інфільтрації, що свідчило про залишкові явища запальної реакції. По периферії регенерату були сформовані зачатки волосяних фолікулів та сальних залоз. На периферії рани у дермі спостерігалися численні розширені кровоносні судини з ознаками стазу. Навколо окремих судин зберігалися ознаки периваскулярного набряку.

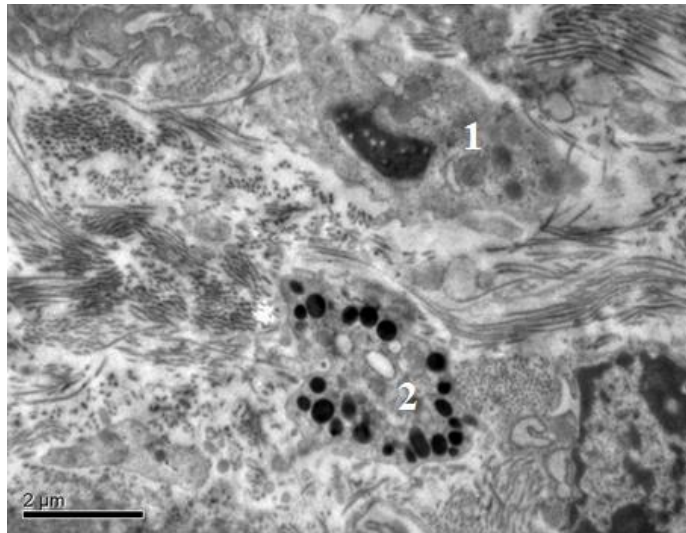


Рисунок 21 – Ділянка регенерата шкіри щура молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією та застосуванням ЗТП на 7-му добу дослідження: 1 – тромбоцити, 2 – електронно-щільні гранули. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

У нашому дослідженні у щурів молодого та зрілого віку із хронічною гіперглікемією на ранніх термінах регенерації, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму ми спостерігали більш швидке проростання епідермісу до центру рани під геморагічною кірочкою порівняно із групами тварин із хронічною гіперглікемією. У тварин молодого віку новоутворений епітелій під кірочкою був тонким, повноцінної кератинізації не спостерігалось. Клітинні шари добре простежувалися. При ультрамікроскопічному дослідженні регенерату шкіри ми спостерігали зруйновані тромбоцити із пікнотичними ядрами, багаточисленими включеннями та везикулами. У щурів зрілого віку в

місці контакту з інтактною шкірою відзначалося потовження епідермісу та вогнища запального інфільтрата у товщі грануляційної тканини.

У щурів старечого віку із змодельованою хронічною гіпреглікемією та при введенні ЗТП на місці дефекта ми спостерігали утворення струпа, який покривав всю площу рани. При гістологічному дослідженні було виявлено проростання тонкого шару базальних клітин під геморрагічною кіркою лише біля інтактної шкіри. Верхні шари регенерату були заповненні грануляційною тканиною із ділянками некротичного детриту. У більш глибоких шарах регенерату спостерігалось очищення рани від запального інфільтрату та розвиток сполучної тканини.

На 14-ту добу дослідження регенерата шкіри щурів молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП епітелізація рани відбулась не повністю. Центральна частина дефекту не була вистелена новим епітелієм. У перикрайових ділянках рани у базальному шарі епітелію ми спостерігали значну кількість мітозів. Повноцінної базальної мембрани ми не виявили. Під епідермісом ми спостерігали судини з різним діаметром просвітів. Також, відзначалися макрофаги та лімфоцити.

Площа рани у щурів зрілого віку із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП на 14-ту добу експерименту була меншою порівняно із тваринами без застосування ЗТП. Новий епідерміс мав переважно рівномірну товщину. Судини розміщувалися більш однорідно по площі зрізу та мали різні діаметри просвітів. Також у новоутвореній дермі серед пучків паралельно організованих колагенових волокон спостерігалися тлоцити та поодинокі відмічалися залишки тромбоцитів.

На 14-ту добу дослідження регенерату у щурів старечого віку із хронічною гіперглікемією та введенням ЗТП проростання епідермісу до центру дефекта відбулось краще ніж у тварин із ХГ, яким не вводили ЗТП того ж терміну спостереження. Однак, епітелій мав нерівномірну товщину, значні проростання у товщу дерми, під якими спостерігалися периваскулярні скупчення лімфоцитів. У товщі дерми відмічалися ділянки формування

сітчатого шару, поодинокі зачатки волосяних фолікулів та скупчень жирових клітин. У більш глибоких шарах регенерату зберігались поодинокі острівці грануляційної тканини з запальним детритом. Вени мали вузькі просвіти та плоскі ендотеліоцити з розширеними проміжками між ендотеліоцитами.

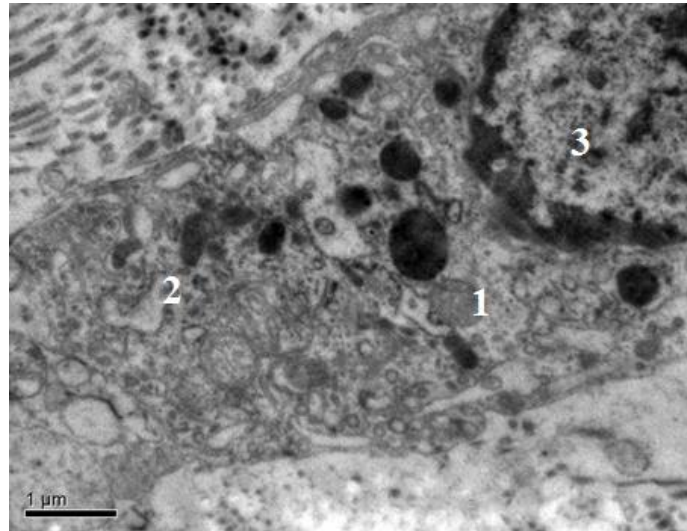


Рисунок 22 – Ділянка регенерата шкіри щура молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією та застосуванням ЗТП на 14-ту добу дослідження. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

Регенераційна здатність PRP допомагає скоротити час відновлення пошкоджень тканин. Babaei et al. при місцевому застосуванні PRP спостерігали формування здорової грануляційної тканини та раннє повне загоєння рани шкіри у 150 пацієнтів із діабетичною виразкою стопи.

Дослідники демонстрували потенційну безпеку та ефективність застосування PRP для хронічних незагоєваних ран. Вони відмічали значне зменшення розміру дефекту, відсутність побічних ефектів, зменшення болю та запалення у місці пошкодження у всіх пацієнтів, які отримували PRP. Подібні позитивні результати були отримані при вторинних ранах м'яких тканин після місцевого застосування аутологічної PRP, де спостерігалася посилена неоваскуляризація та реепітелізація.

Після проведення багаточисленних досліджень було встановлено, що після місцевої обробки ран шкіри аутологічною плазмою пришвидшується їх загоєння [121].

У своєму дослідженні ми виявили, що застосування ЗТП у щурів зрілого віку із хронічною гіперглікемією сприяє збільшенню швидкості загоєнню рани порівняно із тваринами, яким не вводили ЗТП. При цьому, швидкість на ранніх та пізніх термінах регенерації у тварин зрілого віку була однаковою. У тварин старечого віку із хронічною гіперглікемією введення збагаченої тромбоцитами плазми сприяло збільшенню швидкості епітелізації ран, як на ранніх так і на пізніх термінах дослідження майже в 2 рази.

У нашому дослідженні у щурів зрілого віку, яким вводили ЗТП на 21-шу добу епітелізація рани відбулось майже повністю. Клітини епідермісу локально проростали у сполучну тканину дерми, у якій повної реорганізації на сосочковий та сітчастий шари не відбулось. У щурів старечого віку, яким вводили ЗТП у кінці дослідження повної епітелізації рани не відбулося. Рана була заповнена сполучною тканиною. Епідерміс мав нерівномірну товщину, значні розростання та агрегати кератину. Реорганізацію дерми на сосочковий та сітчастий шари ми не спостерігали.

У тварин старечого віку рана була заповнена сполучною тканиною та новоутвореним епітелієм. При цьому, повністю проростання епітелію до центру дефекта не відбулося. Епітелій мав нерівномірну товщину за рахунок локального розростання. Спостерігались концентричні агрегати кератину у товщі епідермісу. Щільність судин у дермі була меншою порівняно з контрольною групою. Реорганізації дерми на сосочковий та сітчастий шари ми не спостерігали.

Використовуючи експериментальні підходи дослідники вивчили вплив тромбоцитарного концентрату на властивості проліферації та міграції мезенхімальних стовбурових клітин та фібробластів шкіри, демонструючи значну індукцію міграційної здатності та швидкості проліферації. Крім того,

вони продемонстрували прискорене загоєння ран шкіри після лікування PRPперев'язками та швидшу неоваскуляризацію ураженої ділянки.

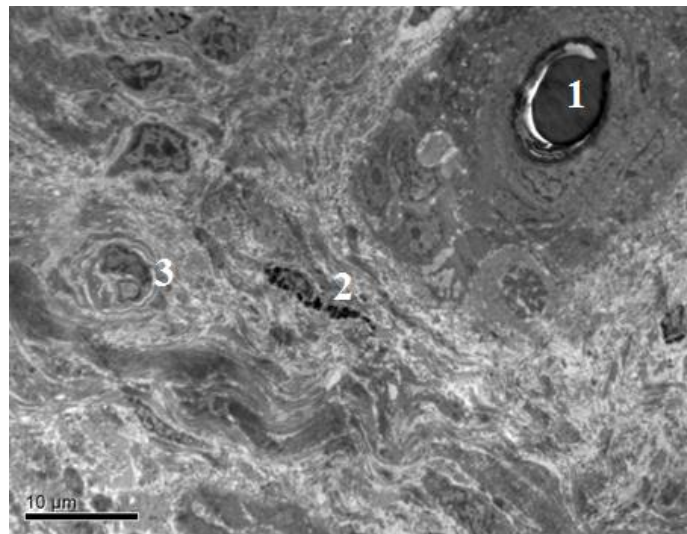


Рисунок 23 – Ділянка регенерата шкіри щура молодого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією та застосуванням ЗТП на 21-шу добу дослідження: 1 – стрижень волосся, 2 – капіляр, 3 – телодит. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

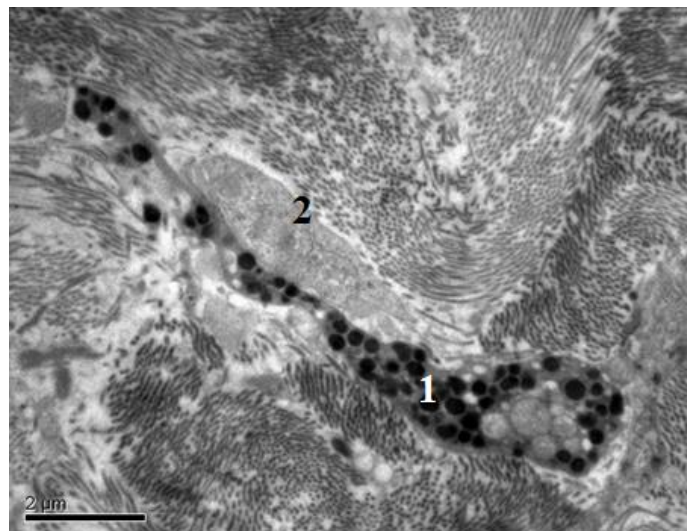


Рисунок 24 – Ділянка регенерата шкіри щура зрілого віку із змодельованою хронічною гіперглікемією та застосуванням ЗТП на 14-ту добу дослідження: 1 – телодит, 2 – тромбоцит. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю за Рейнольдсом

Показано, що при застосуванні PRP спостерігається більш високий синтез колагену I типу та матричної металопротеїнази, прискорюється дозрівання грануляційної тканини, посилюється ангиогенез, зменшується утворення рубців завдяки своєчасній епітелізації рани та добрій організації колагенових волокон порівняно з ранами, які лікували традиційними методиками.

В. Г. Богдан та співавтори показали, що PRP стимулює фібробласти синтезувати колаген при трофічних виразках венозної етіології. На їх думку, використання PRP дозволяє активувати синтез сполучної тканини без зміни її структури та складу.

G. Nicoletti з колегами виявили, що використання PRP сприяє проліферації клітин епітелію та фібробластів. Застосування PRP продемонструвало інгібуючий ефект на деструкцію колагену та еластичні волокна, а також позитивно сприяло реорганізації цих волокон [122].

Е. В. Липова та співавтори відзначили у ранах шкіри, через добу після застосування PRP, тенденцію до організації структури тканини, появу мітозів базальних клітин, фібробластів, колагенових волокон, що свідчить про активізацію процесів регенерації. Вони показали, що на 5-й день структура тканини була більш організованою, з'явилися стовпчики щільно упакованих базальних клітин. По краях рани відзначалася епітелізація. Збільшилася кількість фібробластів та пучків колагену. Почався ангиогенез. У групі, в якій застосовували традиційні підходи до лікування через добу не було відзначено ніяких змін. На 5-й день спостерігався ангиогенез, але він був виражений набагато слабше, ніж у групах із PRP. Відмічалася дезорганізація пучків колагену. У процесі лікування PRP не було відмічено ніяких небажаних ефектів, аномального формування тканини, розвитку гіпертрофічних рубців, а також випадків вторинного інфікування рани [123].

Оцінюючи процеси ангиогенезу у зрізах травмованих ділянках шкіри, ми виявили, що між щурами із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП та

контрольною групою зрілого віку на 21-шу добу дослідження достовірної різниці у показнику щільності судин мікроциркуляторного русла не було.

Тоді, коли у групі тварин зрілого віку з ХГ щільність судин була меншою порівняно з контролем. Щільність судин у зрізах шкіри щурів старечого віку із ХГ, яким вводили ЗТП була достовірно нижчою ніж у контрольній групі.

Згідно досліджень М. В. Аралова та ін. застосування ЗТП у лікуванні ран в експерименті, показало, що на 3-ю добу набряку та гіперемії не спостерігалось у жодній групі. Загоєння проходило під тонким струпом. На 5-у добу у всіх тварин рани гоїлися вторинним натягом, набряку та гіперемії не було. Однак площа ран була різною. У контрольній групі вона була в 2 рази більше порівняно з групою, яким вводили ЗТП. Максимальне скорочення площі рани було у тварин, яким вводили ЗТП. При гістологічному дослідженні біоптатів травмованої шкіри у тварин із ЗТП на 5-ту добу на всьому зрізі рани було видно епідерміс, структуровану дерму та незначну локальну периваскулярну інфільтрацію. У мікропрепаратах контрольної групи було відзначено крайову епітелізацію, дно рани було вистелено пухкою волокнистою сполучною тканиною з лейкоцитарною інфільтрацією, що свідчить про запальні зміни у рані. Отримані дані експериментальних досліджень вказують на досить високу ефективність застосування ЗТП для стимуляції регенерації хронічних ран.

Е. Н. Горбач та співавтори з'ясували, що на 18-ту добу після застосування PRP колагенові волокна у ділянці шкірного регенерату не мали певної орієнтації. У прикордонних тканинах із ділянкою рани кількість мітозів в епідермісі була більше ніж ближче до центра дефекта. У цей період у регенераті формувалися зачатки волосяних фолікулів та сальних залоз. На 28-му добу рана була покрита сформованим епідермісом. Іноді у крайових ділянках спостерігався акантоз. Роговий шар в цей період мав незначну товщину. Базальний і шипуватий шари були потовщені за рахунок збільшення в них клітинних рядів. Рана була заповнена щільною неоформленою волокнистою сполучною тканиною. Між пучками колагенових волокон

утворювалися проміжки (щілини), в які поступово проникали судини мікроциркуляторного русла. Клітинний склад був представлений в основному фібробластами різного ступеня диференціювання. У периваскулярних просторах спостерігалися поодинокі макрофаги. Еластичні волокна були нечисленні. У зоні дефекту вздовж судин спостерігалися їх незрілі форми.

Найбільш зріла волокниста сполучна тканина формувалася у ділянці рани через місяць після її загоєння.

Таким чином, отримані результати показали, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми покращує процес регенерації ран шкіри за умов впливу на організм хронічної гіперглікемії, що полягає у пришвидшенні їх епітелізації, відновленні правильної структури епідермісу та дерми.

### **2.3 Морфологічні особливості репаративного остеогенеза діяфізу великогомілкової кістки за умов хронічної гіперглікемії та застосування збагаченої тромбоцитами плазми**

Проблема регенерації кістки після пошкодження має особливе значення у зв'язку з соціально-економічною актуальністю, яка пов'язана з необхідністю тривалого та високовартісного лікування та медичної реабілітації. Цілісний аналіз остеогістогенеза після переломів та інших пошкоджень, пошук та обґрунтоване застосування засобів, які впливають на регенерацію кістки, можливі на підставі поглиблених знань загальних закономірностей остеогістогенеза, а також реактивних змін кісткової тканини у процесі регенерації. Крім того, актуальність даного питання зростає з ростом супутньої патології такої, як ЦД, ожиріння та інші ендокринні порушення, хвороби нирок, захворювання серцево-судинної системи [35].

Вважається, що тривалий вплив гіперглікемії призводить до зміни метаболізму кісток та порушення їх мікроструктури через різноманітні механізми на молекулярному та структурному рівнях. Зокрема, відомо, що ЦД пригнічує процеси ремоделювання кісток [37], зумовлює накопичення в них



кінцевих продуктів глікації [38], спотворює реакцію на гормональні сигнали та викликає розвиток мікросудинних ускладнень [39].

Сьогодні особливу увагу вчених привертає питання післятравматичного відновлення кісток в умовах ХГ. Результати багатьох досліджень на тваринах показали, що ЦД пов'язаний із порушенням процесу остеорегенерації, що проявляє себе пригніченням проліферації клітин та зменшення механічної жорсткості в ділянці перелому.

Експерименти *in vitro* встановили, що ХГ гальмує дозрівання остеобластів та призводить до зсуву диференціації мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) від остеобластогенезу в бік адипогенезу [40]. Поряд із цим виявлено, що у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом суттєво зменшується експресія факторів транскрипції, необхідних для остеобластної диференціації МСК [41].

Останніми роками аутологічні концентрати тромбоцитів широко використовують для регенерації тканин у клінічній практиці [42]. Вже доведено високу ефективність біологічних препаратів на основі збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) у лікуванні спортивних травм, при операціях на суглобах та кістках, в стоматології [43]. Однак відомостей про ефективність та можливість застосування ЗТП при переломах довгих трубчастих кісток в осіб, які страждають на хронічну гіперглікемію або ЦД II типу, у світовій науковій літературі недостатньо.

Отже, незадовільні наслідки порушень регенерації кісток в осіб, які страждають на ЦД, їх велика поширеність та кількість ускладнень, труднощі під час лікування вимагають подальшого дослідження та більш глибокого розуміння процесів репаративного остеогенезу за умов ХГ та нових ефективних, економічно більш доступних підходів до їх лікування.

Не дивлячись на значну кількість робіт щодо розкриття особливостей молекулярних та клітинних механізмів регенерації кісток в осіб із ЦД, на сьогодні бракує сучасних морфологічних досліджень, які б дозволили на різних рівнях структурної організації охарактеризувати посттравматичне

відновлення кісток в умовах впливу на організм ХГ та при застосуванні ЗТП, що і стало метою нашого дослідження.

У представленому дослідженні проведено вивчення морфологічних особливостей регенерації довгих кісток скелета у щурів без порушення вуглеводного обміну та тварин із ХГ, а також були вивчені особливості репаративного остеогенезу в щурів із хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП. Для експерименту була обрана механічна травма великогомілкової кістки. ХГ моделювали за допомогою двотижневого навантаження фруктозою та одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину і нікотинової кислоти.

Вивчення морфологічних особливостей остеогенезу у всіх щурів проводили на 3-тю, 7-му, 14-ту, 21-шу та 30-ту добу після моделювання дефекту великогомілкової кістки, хіміко-аналітичний аналіз проводили на 3-тю та 30-ту добу остеорепарації.

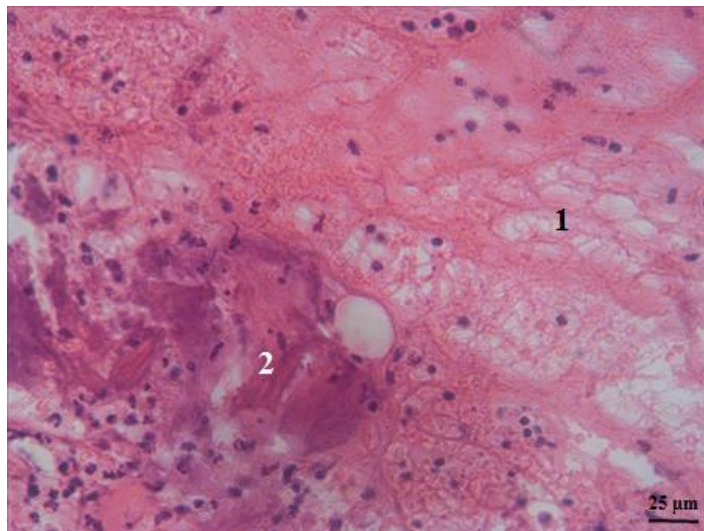


Рисунок 25 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 7-му добу репаративного остеогенезу: фібрин (1), кістковий детрит (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 400

Так, під час аналізу ранніх стадій процесу остеогенезу ми виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із хронічною

гіперглікемією, як наслідок, на 7-му добу більша частина дефекту залишалася заповненою некротичним кістковим детритом, фібрином, нейтрофільними гранулоцитами та жировою тканиною.

На 7-му добу репаративного остеогенезу в щурів контрольної групи площа запального інфільтрату та грануляційної тканини в регенераті була меншою на 93,39 % ( $p < 0,001$ ) та 13,11 % ( $p < 0,001$ ) відповідно тварин із ХГ. Площа фіброретикулярної тканини була меншою у щурів із ХГ на 82,49 % ( $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою

На думку Carlos Marin та співавторів, при хронічній гіперглікемії порушується узгоджена дія сигнальних молекул та регуляторів транскрипції репаративного остеогенезу, що призводить до зниження функціонування остеобластів, збільшення кількості жирової тканини у складі регенерату та істотного гальмування процесу консолідації переломів [44].

У тварин із хронічною гіперглікемією репаративний остеогенез є тривалішим за часом, ніж у тварин із нормальними показниками глюкози в крові. На фоні ХГ порушуються нео- та ангиогенез, 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 [44].

У нашому дослідженні морфологічна картина репаративного остеогенезу на ранніх стадіях процесу в щурів контрольної групи та із хронічною гіперглікемією відповідала результатам досліджень низки вітчизняних і закордонних учених [46].

При подальшому аналізі стадій процесу остеорепації ми, також виявили затримання ліквідації першої фази запалення у тварин із ХГ, як наслідок, на 14-ту добу регенерат у цій групі містив жирові клітини, ділянки локальної грануляційної тканини з лімфоцитарно-лейкоцитарною

інфільтрацією. Крім того, ми виявили, що в групі тварин із хронічною гіперглікемією відбувається порушення проліферації та диференціації остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату.

A. Sadighi, M. L. Brown та співавтори повідомляють про високий відсоток (від 8 до 32 %) порушень процесів репаративного остеогенезу в умовах ЦД 2-го типу, а також про те, що гіперглікемія призводить до зменшення проліферації та диференціації клітин хрящового й остеобластичного диферонів, які беруть участь у регенерації [47].

Важливу роль у загоєнні кістки при ЦД відіграє інсулін, що стимулює утворення кісткового матриксу, призводить до збільшення синтезу колагену остеобластами. У дослідженнях *in vitro* було визначено зниження рівня осифікації новоутвореної тканини та порушення формування хряща в умовах дефіциту інсуліну. Дослідники з'ясували, що в щурів із ЦД рівень синтезу колагену в зоні перелому знижувався на 50-55 %, що призводило до погіршення механічних властивостей новоутвореної тканини. У нашому дослідженні, ми виявили порушення структурування колагену в остеїдні балки у тварин із ХГ та нерівномірне утворення й розміщення хрящової тканини в регенераті.

Н. В. Дєдх та О. О. Сикал в експериментальних дослідженнях з'ясували, що на фоні змодельованого ЦД у тварин у ділянці регенерату відзначалася підвищена щільність остеокластів, зросла площа хондроїда та відбулося порушення заміщення хрящової тканини кістковою, порушувалися процеси ангиогенезу, утворення колагену та глікозаміногліканів. Площа фіброретикулярної тканини в ділянці регенерату у тварин із ЦД значно перевищувала показник у контрольних тварин, що свідчило про ускладнення процесів репаративного остеогенезу [50].

Аналіз морфометричних показників у нашому дослідженні виявив, що у тварин, в яких рівень глюкози перевищував нормальні показники, на 14-ту добу репаративного остеогенезу площа фіброретикулярної тканини у

регенераті була більшою на 32,91 % ( $p < 0,001$ ) відповідно тварин контрольної групи. Формування ретикулофіброзної кісткової тканини на цьому терміні дослідження в цій групі не відбулося (рис. 4.2).

На 21-шу добу процесу остеорепації площа фіброретикулярної тканини у регенераті щурів із хронічною гіперглікемією була більшою на 41,79 % ( $p < 0,001$ ), а ретикулофіброзної кісткової тканини меншою на 50,72 % ( $p < 0,001$ ) відповідно контрольної групи.

Крім цього, кістковий регенерат тварин із ХГ містив ( $17,19 \pm 1,3$ ) % хрящової тканини, що на 115,55 % ( $p < 0,001$ ) більше ніж у попередньому терміні дослідження. Повного розсмоктування запального інфільтрату ми не спостерігали. Але, його площа зменшилася на 46,02 % ( $p < 0,001$ ) відповідно попереднього показника.

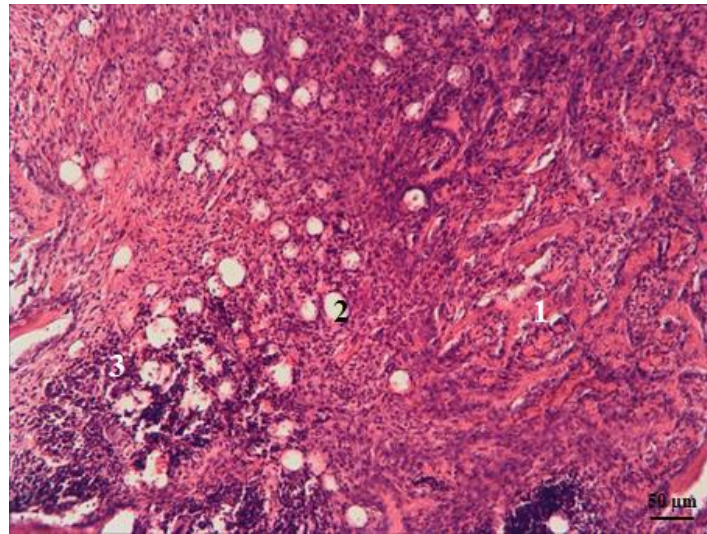


Рисунок 26 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 21-шу добу репаративного остеогенеза: остеогенні балки (1), жирові клітини (2), лімфоцитарно-лейкоцитарна інфільтрація (3). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. x 100

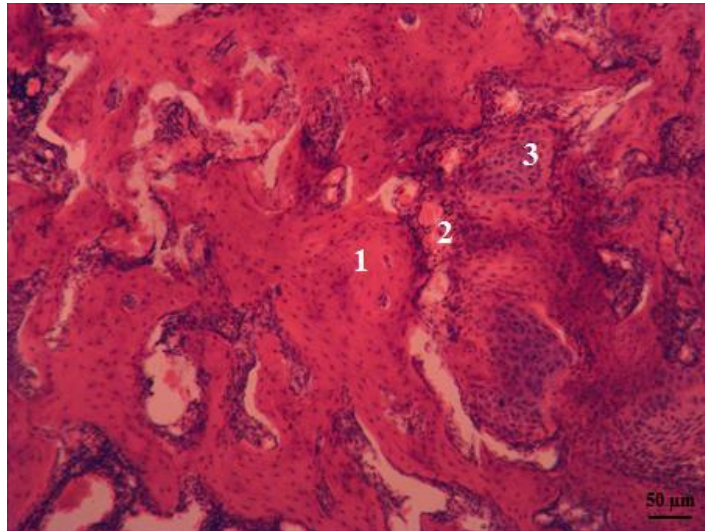


Рисунок 27 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією на 30 добу репаративного остеогенеза: остеогенні трабекули (1), капіляр (2), хондрогенні острівці (3). Забарвлення гематоксилином і еозином. 3б. х 200

На 30-ту добу процесу остеорепарації у регенераті щурів із ХГ площа новоутвореної ретикулофіброзної кісткової тканини була на 26,94 % ( $p < 0,001$ ) менше від контрольного показника. У тварин контрольної групи відбулось ремоделювання більшої частини ретикулофіброзної кісткової тканини у пластинчасту з повноцінними остеонами зі сформованими Гаверсовими каналами.

Таким чином, наше дослідження підтверджує, що у тварин із хронічною гіперглікемією процес репаративного остеогенезу більш тривалий, що обумовлюється затриманням переходу від однієї стадії до іншої.

Підходи до лікування пошкоджень опорно-рухового апарату за останні роки значно змінилися. Відповідно до уявлень більшості сучасних авторів застосування ЗТП – це простий, доступний і мінімально інвазивний спосіб отримання природної концентрації аутологічних медіаторів, таких як: інсуліноподібний фактор росту-1; основний фактор росту фібробластів; тромбоцитарний, епідермальний та ендотеліальний фактори росту; трансформуючий фактор росту бета, що відіграють найважливішу роль в ослабленні запальної реакції, елімінації некротизованих клітин і мають низку



потенційних переваг перед існуючими способами. Доступність, простота, ефективність методу, відсутність алергічних реакцій відкривають перспективи його подальшого дослідження та більш широкого використання в клінічній медицині [51].

За даними О. А. Бур'янова та співавторів, при використанні аутогенної кісткової тканини та фібрину, збагаченого тромбоцитами, в регенераті відзначалося хаотичне розміщення кісткових трабекул та їх різна зрілість, нерівномірна щільність остеоцитів на поверхні кісткових трабекул, формування періосту, який складався з колагенових волокон пухкої та щільної консистенції. Кісткова тканина, що є регенератом, мала певні відмінності від материнської: високу щільність остеоцитів, які мали базофільні ядра з цитоплазмою невеликого об'єму. Ці клітини були розміщені в лакунах, що свідчило про відсутність остеоцитарного остеолізу.

У нашому дослідженні ми виявили, що у щурів із ХГ, яким вводили ЗТП на 3-тю добу експерименту площа запального інфільтрату у регенераті була менше на 4,81 % ( $p < 0,001$ ), а площа грануляційної тканини була більше на 20,63 % ( $p < 0,001$ ) ніж у групі щурів із ХГ (рис. 28).

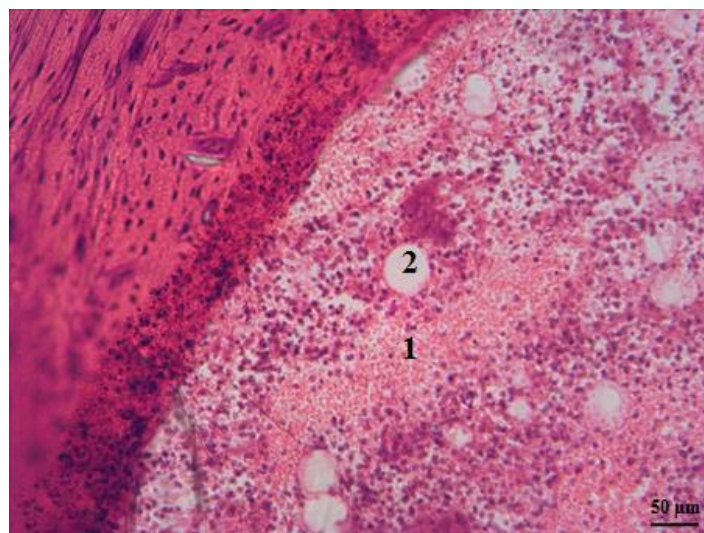


Рисунок 28 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 3-тю добу репаративного остеогенеза: еритроцити (1), ліпоцити (2). Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

На 7-му добу остеорепарації площа запального інфільтрату у щурів із ХГ, яким застосовували ЗТП вже була меншою на 71,79 % ( $p < 0,001$ ) порівняно з тваринами, яким не вводили ЗТП. Площа грануляційної тканини зменшилась на 25,41 % ( $p < 0,001$ ) у тварин із ЗТП відповідно щурів із ХГ. При цьому фіброретикулярної тканини було менше у тварин із ХГ на 81,99 % ( $p < 0,001$ ) порівняно із тваринами, яким вводили ЗТП (рис. 29). Але всі показники не досягли рівня контрольних значень.

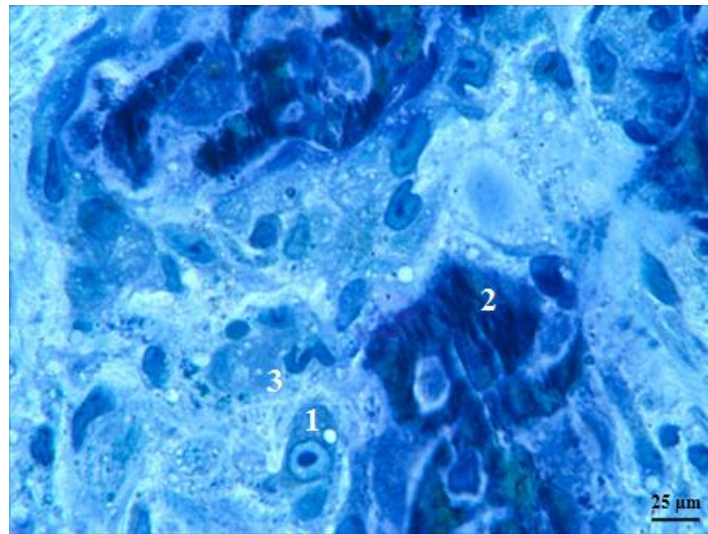


Рисунок 29 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 7-му добу репаративного остеогенезу: фібробласти (1), кісткові уламки (2), остеокласт (3).

Забарвлення метиленовим синім. Зб. х 400

У групі тварин із ХГ організму, яким після завдання дефекту великогомілкової кістки вводили в рану ЗТП, на 14-ту добу остеогенезу, на відміну від тварин із ХГ, запального інфільтрату, грануляційної та хрящової тканини в регенераті ми не виявили. Разом з тим, він складався із фіброретикулярної тканини, площа якої була меншою на 6,53 % ( $p < 0,001$ ) від тварин із ХГ, яким не вводили ЗТП, та  $(0,55 \pm 0,03)$  мм<sup>2</sup> ретикулофіброзної



кісткової тканини, якої у тварин із ХГ ми не виявили на цьому терміні дослідження (рис. 30).

Крім того, у тварин, яким вводили ЗТП вже на 14-ту добу експерименту ми спостерігали упорядкування й трансформацію фіброретикулярної тканини в остеїдні трабекули. Найінтенсивніше цей процес відбувався біля материнської кістки. У центрі дефекту ми спостерігали велику кількість капілярів синусоїдного типу у товщі фіброретикулярної тканини.

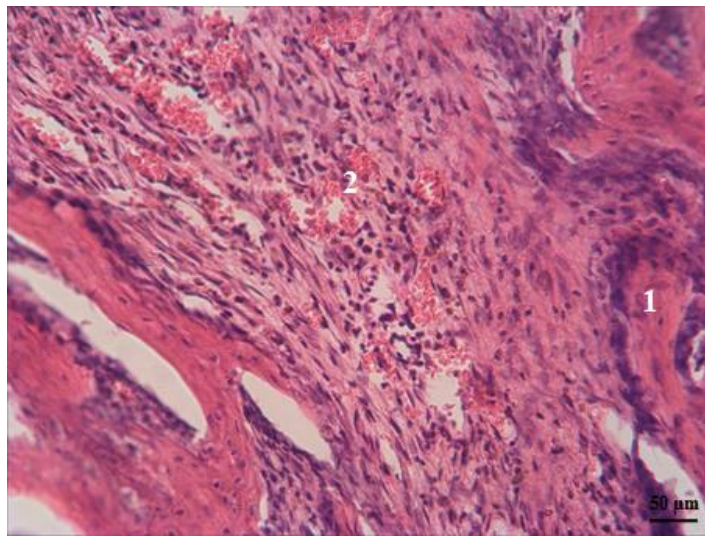


Рисунок 30 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із змодельованою хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 14-ту добу репаративного остеогенезу: кісткові трабекули (1), капіляри (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. х 200

Одержані вищезазначені дані свідчать про ще одну дуже важливу здатність ЗТП – антимікробну активність, що також показано й у дослідженнях Т. М. Bielecki і співавт. [54], які аналізували антибактеріальний ефект *in vitro*, збагаченої тромбоцитами плазми. У результаті виявили пригнічення росту *Staphylococcus aureus* і *Escherichia coli* та одночасне індукування росту *Ps. aeruginosa*, що свідчить про різну стійкість мікроорганізмів до плазми, збагаченої тромбоцитами. Автори вважають, що комбінація індуктивних та антимікробних властивостей збагаченої

тромбоцитами плазми може покращувати результати лікування хворих з інфікованими переломами і несправжніми суглобами. У нашому дослідженні на 14-ту добу репаративного остеогенезу при застосуванні ЗТП ми спостерігали повне очищення рани від залишків запального інфільтрату, яке не відбулось у тварин без застосування ЗТП.

На 21-шу та 30-ту добу у щурів із ХГ, яким вводили ЗТП кількість ретикулофіброзної кісткової тканини у регенераті збільшилася. Так, на 30-ту добу експерименту її площа була більшою на 16,89 % ( $p < 0,001$ ) ніж у тварин із ХГ, але на 14,59 % ( $p < 0,001$ ) менше порівняно із тваринами контрольної групи. Хрящової тканини у регенераті щурів, яким вводили ЗТП ми не виявили. Крім того, ми спостерігали велику кількість судини із повнокровними просвітами.

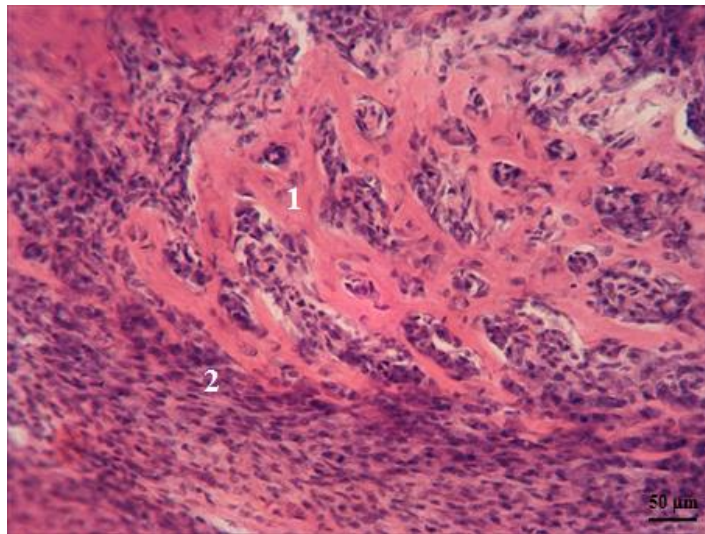


Рисунок 31 – Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура із хронічною гіперглікемією, якому вводили ЗТП на 21-шу добу репаративного остеогенезу: кісткові трабекули (1), фіброретикулярна тканина (2).

Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб. х 200

Також, тваринам, яким вводили ЗТП, дефект великогомілкової кістки був заповнений упорядкованою грубоволокнистою кістковою тканиною, а

біля материнської кістки – пластинчастою кісткою з повноцінними остеонами. У групі щурів із ХГ, яким не вводили ЗТП, відбулось формування лише ретикулофіброзної кісткової тканини. Біля материнської кістки остеогенні трабекули були структуровані, а у центральній частині дефекту вони мали нерівномірну товщину й дезорганізоване розміщення. Спостерігалось локальне заміщення дефекту хрящовою тканиною в оточенні фіброретикулярної тканини. Формування зрілої пластинчастої кістки в цій групі спостереження ми не виявили.

Одержані дані в нашому дослідженні підтверджують, що при введенні ЗТП зменшуються набряк у пошкоджених тканинах, ознаки гострого запалення, фаза альтерації швидше змінюється регенераторно-репаративними процесами [55].

Провівши детальний статистичний аналіз показників хімічних елементів кісткових регенератів, ми виявили, що на початку дослідження остеогенезу між усіма групами була достовірна різниця по всім елементам. При цьому, концентрація міді між групами ХГ та ХГ+ЗТП не мала статистичної значимості ( $p = 0,136$ ). Вміст Na, Fe, Ca та Zn був більшим у групі із змодельованою хронічною гіперглікемією порівняно з контролем, що може бути внаслідок затримки ліквідації запалення у місці кісткового дефекту. У групі щурів із змодельованою хронічною гіперглікемією, яким вводили ЗТП концентрації Na, Fe та Zn були нижчими ніж у групі тварин із ХГ, але більшими ніж у контрольній групі. Вміст K, та Mg у групі з корекцією був вищим ніж у групі із ХГ, але меншим порівняно з контролем. Концентрація Si у групі ХГ+ЗТП була більшою на 95,64 % ( $p < 0,001$ ) відповідно контрольної групи.

У дослідженні Devi T. R. та авторів було показано, що у людей, які страждали на ЦД 2 типу з ускладненнями концентрація Zn у сироватці крові була достовірно менше ніж у групі людей, які не мали ускладнення та контрольній групі. Рівень Si у сироватці крові пацієнтів із ЦД 2 типу був вищий ніж у здорових людей та пацієнтів, які страждали на ЦД 2 типу з

ускладненнями. Автори вважають, що змінені рівні мікроелементів Zn та Cu є важливими сприятливими факторами для розвитку ускладнень у людей, які страждають на ЦД 2 типу [56].

Підвищення рівня іонів Cu у пацієнтів з ЦД може бути пов'язано з гіперглікемією, яка може стимулювати глікування та вивільнення іонів міді, і це прискорює окислювальний стрес, який бере участь у патогенезі діабету. Дослідження довели, що мідь викликає окислювальний стрес. Велика частина міді в плазмі транспортується пов'язаної з церулоплазміном (> 95%); інше пов'язане з альбуміном та іншими білками, які утворюють комплекси з мідю. Церулоплазмін є реагентом гострої фази, володіє феро- $O_2$  оксидоредуктажною (прооксидантною) активністю, спрямованою на стимульоване іонами двовалентного заліза перекисне окислення ліпідів. Є деякі свідчення того, що ХГ може пошкодити Cu-зв'язуючі властивості обох білків. Мідь токсична у своїй незв'язаній формі, викликає окислювально-відновний дисбаланс через її високу окислювально-відновно активну природу. Мідь має здатність зв'язуватися з білками, які були глікірованими. Існує антагоністичний взаємозв'язок між рівнями Cu та Zn при діабеті.

На 30-ту добу дослідження концентрації Na, Fe, Zn та Cu у кістковому регенераті достовірно відрізнялися між групами порівняння. Найбільший вміст цих елементів був у тварин із хронічною гіперглікемією. У щурів із ХГ, яким вводили ЗТП концентрація Na, Fe, Zn та Cu знизилася, але до показників контрольної групи не досягла. Дані зміни можуть бути пов'язані, із пролонгуванням фази запалення на початку остеогенезу та розвитком хрящової тканини. Достовірної різниці між концентраціями K та Mg між групами порівняння ми не виявили. Вміст Ca між групами порівняння статистично відрізнявся, але за даними подальшого апостеріорного тесту Бонферроні достовірної різниці у його показниках не було між контрольною групою та тваринами із ХГ, яким вводили ЗТП.

Отже, 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. Порушується проліферація та диференціація клітин остеобластичного диферону в бік формування фіброзно-хрящового регенерату. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми коригує негативний вплив хронічної гіперглікемії на репаративний остеогенез, сприяє більш швидкому видаленню запального інфільтрату з місця дефекту кістки, формуванню остеогенного диферону та ремоделюванню грубоволокнистої кісткової тканини у повноцінну пластинчасту кістку, нормалізації макро- та мікроелементного складу регенерату.

#### **2.4 Морфологічна характеристика легень за умови експериментальної алоксанової гіперглікемії та на тлі вживання кверцетину**

На сьогодні частота всіх форм цукрового діабету в різних країнах світу становить близько 6,0-7,0 % (за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я). Наприклад, у США – 6,04-8,3 %, Канаді та Європі – 6,5 %. За офіційною інформацією Міністерства охорони здоров'я в Україні цукровий діабет діагностований у 2,67 % населення. Причиною такої різниці статистичних даних є наявність неефективної діагностики, особливо з урахуванням існування переддіабету, порушення глікемії натще. Частота переддіабету в західних країнах приблизно дорівнює виявленим випадкам діабету (приблизно 5-10 %), а в Україні такі випадки статистично не враховуються [57]. За сьогоднішніми прогнозами кожні 15 років очікується дворазове збільшення кількості хворих.

Порушення всіх видів обмінних процесів за хронічної гіперглікемії призводить до генералізованого ураження систем макро- та мікроциркуляторного русла. Діабетичні ангіопатії досконально вивчені в нирках, сітківці, шкірі, селезінці, в той час як зміни в судинах малого кола кровообігу, а отже і в легенях, досліджені меншою мірою.

Однією з основних причин виникнення легеневої патології є дія різноманітних шкідливих факторів зовнішнього середовища [59], але доскональне вивчення впливу гіперглікемії на легеневу тканину доводить, що первинно легеневі структури уражаються продуктами порушення обміну глюкози, на тлі цього посилюється дія інших патогенних чинників.

Загальні закономірності взаємодії цукрового діабету та захворювань легень: гострі запальні хвороби легень викликають декомпенсацію цукрового діабету, хронічні – заважають контролю цукрового діабету, підвищуючи ризик виникнення його ускладнень. Неконтрольований цукровий діабет створює умови для розвитку захворювань легень, ускладнює проходження супутньої патології та обмежує можливості їх лікування.

Багато авторів досліджували проблему ураження судин малого кола кровообігу та опосередковано альвеолоцитів II типу, оскільки доведено, що вони є носіями рецепторів, специфічних до інсуліну. Але дані щодо вивчення проблеми впливу хронічної гіперглікемії у віковому аспекті на строму, паренхіму легень та їх лімфатичну систему на сьогодні відсутні.

Зважаючи на вищезазначені факти, виявлення морфологічних перетворень та тлі хронічної гіперглікемії на доклінічних стадіях формування змін в органах-мішенях з одночасним дослідженням вікового фактора впливу на організм є важливим завданням для наукових дослідів.

Метою роботи було визначення на макро-, мікро- та ультраструктурному рівнях закономірності змін легень і їх хімічного складу за умов експериментальної гіперглікемії щурів різних вікових груп, а також виявити можливості їх корекції кверцетином.

Дослідження впливу гіперглікемії на легеневі структури розширило знання про особливості їх морфології та хімічного складу в експериментальних тварин різного віку, що дало можливість виявити механізм адаптаційних процесів у легенях за умов хронічної гіперглікемії різного терміну тривання. У результаті експериментального введення

тваринам кверцетину доведена можливість корекції патогенної дії гіперглікемії на легеневу тканину.

Паралельно як контроль вивчали морфологію легень інтактних щурів різних вікових груп із метою детального аналізу їх органометричних, мікроскопічних, ультрамікроскопічних особливостей та мікроелементного складу для виявлення закономірностей вікових перетворень.

Для експериментального моделювання гіперглікемії, що обумовлювалась абсолютною недостатністю інсуліну в організмі, ми використовували хімічну сполуку алоксану моногідрат – продукт розпаду сечової кислоти, який при парентеральному способі введення викликає вибірковий некроз островців підшлункової залози шляхом взаємодії з тіоловими групами глюкокінази ферменту  $\beta$ -клітин, у результаті чого знижується окиснення глюкози, генерація АТФ та секреція інсуліну. Контроль гіперглікемії здійснювався за допомогою визначення рівня глюкози та глікозильованого гемоглобіну у венозній крові.

У результаті проведеного експерименту було виявлено, що найбільш уразливими у віковому аспекті були тварини молодого віку, тому їм одночасно з алоксаном вводили кверцетин – це флавоноїд, який є агліконом багатьох рослинних флавоноїдних глікозидів, зокрема рутину і належить до вітамінних препаратів групи Р. Препарат має капіляростабілізуючі властивості, що пов'язані з антиоксидантним, мембраностабілізуючим впливом, знижує проникність капілярів, блокує ліпооксигеназний шлях метаболізму арахідонової кислоти, має стійку імуномодулюючу активність, запобігає гіперагрегації тромбоцитів, відновлює регіональний кровообіг і мікроциркуляцію, збільшує реактивність мікросудин.

У результаті дослідження динаміки змін морфометричних показників легень усіх вікових груп за умов хронічної гіперглікемії було встановлено, що легені, одночасно з нирками або сітківкою ока, є також органом-мішенню.

Через один місяць експерименту у щурів усіх вікових категорій відзначалися класичні симптоми хронічної гіперглікемії (з першої доби –

поліурія, поліфагія), різке зниження маси тіла в молодих щурів – на 19,02 %, у зрілих – на 31,7 %, у старих – на 23,5 % порівняно з інтактною групою. Летальність у молодих щурів становила 21,2 %, у зрілих – 18,4 %, у старечих – 15,2 %.

Експериментально встановлено, що підшлункова залоза здорових тварин продукує гуморальний фактор, що відрізняється від інсуліну і протидіє розвитку алоксанового діабету [68]. У результаті продукування підшлунковою залозою щура проінсулінового фактора можна пояснити поступове зниження рівня глюкози в крові у тварин усіх вікових категорій. Але враховуючи, що діабет – це складна хвороба, що характеризується чисельними симптомами та синдромами (не лише рівнем глюкози в крові) і підтверджується складними методами діагностики, ми у своїх експериментальних дослідженнях свідомо, по можливості, застерігалися вживати термін «діабет», використовуючи термін «гіперглікемія», що більш властиво для теоретичної медицини.

Рівень глюкози в крові молодих щурів на 30-ту добу експерименту відповідав тяжкому ступеню гіперглікемії, з 60-ї до 180-ї доби – середньому ступеню тяжкості. Відсоток глікозильованого гемоглобіну починав зростати з 90-ї доби експерименту до 8,1 % та на шостому місяці становив 9,39 %, що підтверджувало наявність у тварин хронічної гіперглікемії.

На 30-ту добу алоксанової гіперглікемії в молодих щурів показники товщини міжальвеолярної перегородки збільшилися порівняно з контролем практично вдвічі, що пов'язано з початковими деструктивними змінами в альвеолоцитах II типу та початком склеротичних процесів у стромі. На 60-ту добу експерименту цей показник незначно зростав та становив  $(6,9 \pm 0,04)$  мкм ( $p < 0,05$ ), що пояснювалося прогресуванням дистрофічних явищ в альвеолоцитах II типу. За період із 60-ї до 90-ї доби хронічної гіперглікемії спостерігались явища проліферації ендотеліоцитів в артеріолах та злущування респіраторного епітелію в термінальних бронхіолах. Із 90-ї доби експерименту товщина міжальвеолярної перегородки становила  $(7,03 \pm 0,09)$  мкм ( $p < 0,05$ ),



з 120-ї доби – зростала до  $(8,0 \pm 0,04)$  мкм ( $p < 0,05$ ) за рахунок прогресування вищеназваних процесів.

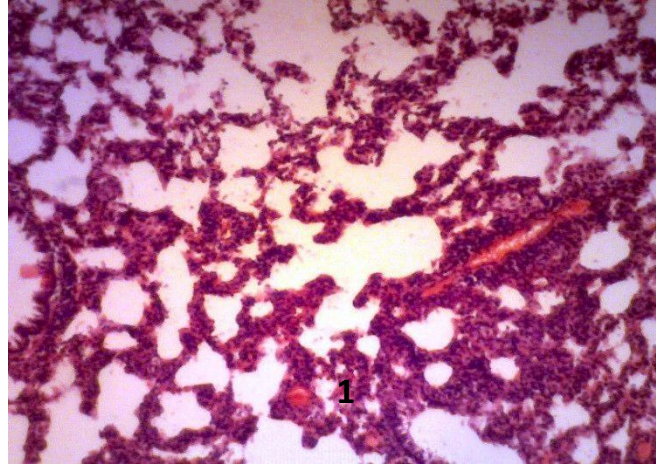


Рисунок 32 – Легенева тканина щура молодого віку на 60-ту добу експерименту. Забарвлення гематоксилін-еозином;  $\times 100$ :

1 – потовщені та повнокровні міжальвеолярні перегородки

На 150-ту добу на тлі гіперплазії зрілих колагенових волокон товщина міжальвеолярної перегородки збільшилася до  $(9,02 \pm 0,04)$  мкм ( $p < 0,05$ ). На 180-ту добу експерименту в результаті прогресування вищезазначених змін на тлі хронічної гіперглікемії товщина міжальвеолярної перегородки зросла у 1,7 рази ( $p < 0,05$ ) порівняно із 150-ю добою.

Із 120-ї доби експерименту в легенях розвивались явища емфізематозної спрямованості, доказом цього було достовірне зростання ширини входу в альвеолу (з  $(38,7 \pm 0,14)$  до  $(43,2 \pm 0,12)$  мкм ( $p < 0,05$ )), зростання показника співвідношення А на 15,3 % ( $p < 0,05$ ) та показника співвідношення Б на 19,5 % ( $p < 0,05$ ).

Ці співвідношення на 150-ту та 180-ту доби експерименту зростали на 37,5 % ( $p \leq 0,05$ ) та 26,6 % ( $p < 0,05$ ) і на 68,1 % ( $p < 0,05$ ) та 69,6 % ( $p < 0,05$ ) відповідно. З третього місяця експерименту на 6,3 % збільшувалася глибина альвеоли ( $(55,8 \pm 0,14)$  мкм ( $p < 0,05$ )), вже з 120-ї доби експерименту її розміри зазнавали зменшення на 6,7 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 90-ю добою за

рахунок розвитку склеротично-рестриктивних змін у легенях. Із 30-ї доби експерименту на 14,7 % ( $p < 0,05$ ) збільшується ширина провідної бронхіоли порівняно з контролем та вже на 120-ту добу хронічної гіперглікемії її розмір досягав показника ( $70,35 \pm 0,9$ ) мкм ( $p < 0,05$ ), що на 10,7 % ( $p < 0,05$ ) більше порівняно з 3-м місяцем експерименту (різке зростання показника). Паралельно з цими змінами абсолютний об'єм легень достовірно зростав із 90-ї доби дослідження на 9,2 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою тварин. Відносний об'єм легень на 30, 60, 90, 120, 150 та 180-ту доби хронічної гіперглікемії перевищував показники інтактних щурів на 8,6; 10,7; 21,7; 27,1; 35,5; 51,7 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, що пов'язано з дефіцитом маси тіла тварин, який розвивався на тлі експерименту.

Наукові дані свідчать про ураження судинної системи у хворих цукровим діабетом, починаючи від артерій великого калібру та закінчуючи капілярами [69]. Але за даними деяких авторів, здебільшого піддаються патологічному впливу гіперглікемії артерії м'язового типу та артеріоли. Тому в нашій роботі ми приділяли увагу більше легенеvim артеріям м'язового типу.

Морфометричні зміни судин у молодих щурів за умов алоксанової гіперглікемії починались із 30-ї доби (зростання товщини судинної стінки на 1,8 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок збільшення всіх складових), але значна перебудова відбулася на 60-ту добу експерименту – товщина судинної стінки зросла на 22,9 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами.

Зміни складових судинної стінки відбувалися так: товщина комплексу інтима + медіа збільшилася на 28,9 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок потовщення м'язового шару на 22,3 % ( $p < 0,05$ ). На 90-ту добу експерименту товщина судинної стінки збільшилась у 2,8 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно із 60-ю добою за рахунок збільшення розмірів комплексу інтима + медіа у 2,5 ( $p < 0,05$ ) та зовнішньої оболонки у 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) за рахунок гіпертрофії гладком'язових волокон, колагену у *t. media* та *t. externa*, плазморагії внутрішньої оболонки в результаті стазу. Починаючи із 120-ї доби досліду, в судинах м'язового типу спостерігалось розволокнення внутрішньої оболонки

та прогресування явищ стазу до кінця експерименту. На 6-му місяці алоксанової гіперглікемії в результаті сладж-синдрому, плазморагії стінок судин, їх склерозування показник ТСС становив  $(118,5 \pm 0,44)$  мкм ( $p < 0,05$ ). Вищезазначені зміни в легневих артеріях м'язового типу були описані у працях С. Gimenes, Е. В. Захарової, [71].

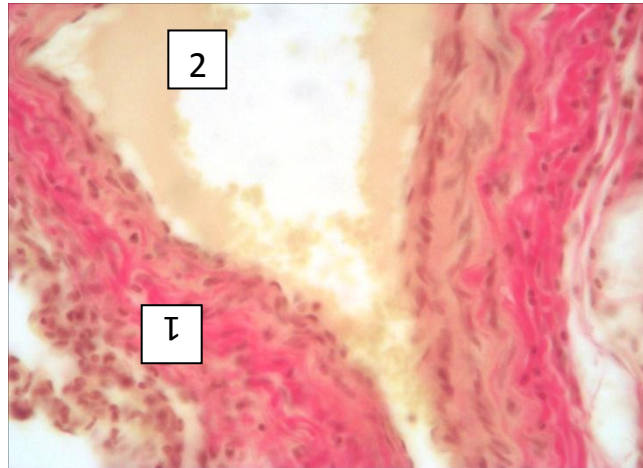


Рисунок 33 – Легенева артерія щура молодого віку на 90-ту добу експерименту. Забарвлення за Ван-Гізон.  $\times 400$ :

1 – гіпертрофована зовнішня еластична мембрана; 2 – стаз у судині

Морфометрія легневих лімфоїдних фолікулів свідчила про те, що зі зростанням терміну експерименту відбувалися їх гіпертрофічні зміни. Починаючи із 60-ї доби, відбувалося збільшення показника у 2,4 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами. Вже до 6-го місяця експерименту розміри лімфоїдних фолікулів збільшились у 3,5 раза ( $p < 0,05$ ), що пов'язано з розвитком імунореактивних механізмів, які мають місце при цукровому діабеті I типу [72].

На 1-му місяці експерименту захисна функція легень знизилася в результаті деструктивних змін у макрофагах. Із 30-ї доби експерименту в альвеолоцитах I типу ультраструктурних змін не було знайдено. Під час мікроморфометричного дослідження АГБ було виявлено його незначне, але

достовірне потовщення на 0,6 % ( $p < 0,05$ ), що може бути пов'язано з появою та гіпертрофією зрілих колагенових волокон в інтерстиції легень.

Під час експерименту було визначено найбільшу реактивність на хронічну гіперглікемію з боку альвеолоцитів II типу. Значні зміни відбулись у пневмоцитах II типу із 60-ї доби експерименту: в цитоплазмі спостерігались ознаки вакуолізації, чітко простежувалося масове скупчення як первинних, так і вторинних лізосом, типові пластинчасті тільця групувались у вигляді конгломератів, шорстка ендоплазматична сітка була незначно розширеною. У різних полях зору в межах однієї альвеоли спостерігались альвеолоцити II типу різного ступеня зрілості. Кількість мітохондрій зменшувалася.

Кількість цитофосфоліпосом в осміофільних тільцях зменшувалась. Осміофільний матеріал містився в електронно-прозорих вакуолях, був нещільно запакованим та деформованим. Часто траплялися спорожнілі аутофагічні вакуолі, а деякі містили поодинокі осміофільні пластини.

Уже на 90-ту добу експерименту альвеолоцити I типу мали незначну кількість піноцитозних везикул у навколоядерній ділянці та велику кількість у без'ядерній частині відростків, відбулося зростання макрофагів. Збільшився показник товщини інтерстиційного простору на 2,12 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок гіпертрофії сполучнотканинних волокон. Кількість мікрворсинок на поверхні альвеолоцитів II типу значно зменшувалася порівняно із 60-ю добою експерименту. Шорстка ендоплазматична сітка з апаратом Гольджі містили часточки осміофільного апарату, що вивільнялись у просвіт альвеол через плазмолему клітини. Зросла ТАБ порівняно із 60-ю добою експерименту на 7,8 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок дегенеративних змін у пневмоцитах та гіперплазії сполучної тканини легеневого інтерстицію. Тобто з 30-ї до 90-ї доби експерименту на тлі порушення обмінних процесів наростали деструктивні зміни в альвеолоцитах, збільшувалася кількість колагену в результаті кисневого дефіциту легеневої тканини та порушувався синтез осміофільного матеріалу, який є основним складовим сурфактантною системи, що збігається з літературними даними зарубіжних та вітчизняних авторів [73].

Через чотири місяці експерименту на тлі розпаду альвеолоцитів II типу продовжувалося зростання кількості альвеолярних макрофагів, які містилися як в просвіті альвеол, так і в складі їх стінок. Цитоплазма макрофагів була «нафарширована» осміофільними пластинчастими тільцями. Ультрамiкрометричні показники ГАБ свiдчать про його незначне потовщення порiвняно з 90-ю добою експерименту на 0,11 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок збiльшення всiх компонентiв.

На 150-ту та 180-ту доби експерименту значних структурних змiн на клiтинному рiвнi не спостерiгалося, крiм того, що фагоцити, якi мiстили значну кiлькiсть осміофiльних тiлець, починали розпадатися з вивiльненням вмісту в порожнину альвеол. До миттєвої реакції на абсолютну недостатність інсуліну альвеолоцитів II типу долучались імунокомпетентні клітини у вигляді проліферації макрофагів. Аналогічну картину у хворих на цукровий діабет I типу та в експериментальних тварин з індукованим діабетом спостерігали й інші науковці [75]. У результаті вищезазначених змін в альвеолоцитах II типу відбувалася гіпопродукція надмембранної речовини, що призводило до стоншення глікокаліксу.

Із 30-ї доби дослідження на комп'ютерній томограмі органів грудної клітки були виявлені гіпертрофовані лімфатичні вузли верхнього та нижнього середостіння, що могло обтяжувати вищеописані рестриктивні зміни в легенях.

Аналізуючи хімічний склад легень інтактних щурів усіх вікових категорій, встановлено, що концентрація мікро- та макроелементів мала такий порядок  $K > Na > Mg > Fe > Zn > Cu > Mn$ .

У легенях молодих щурів на 30-ту добу експерименту рівень натрію на 0,98 % ( $p < 0,05$ ) збільшився порівняно з інтактною групою тварин, та вже з 60-ї доби його концентрація зменшилася на 2,93 % ( $p < 0,05$ ). Починаючи із 60-ї доби рівень натрію прогресивно знижувався: на 90-ту добу експерименту – на 0,3 % ( $p < 0,05$ ), на 120-ту добу – на 0,73 % ( $p < 0,05$ ), на 150-ту добу – на 4,76 % ( $p < 0,05$ ), та на 180-ту добу – на 0,78 % ( $p < 0,05$ ), що пояснювалося

впливом абсолютної недостатності інсуліну, яка провокує екскрецію натрію з сечею.

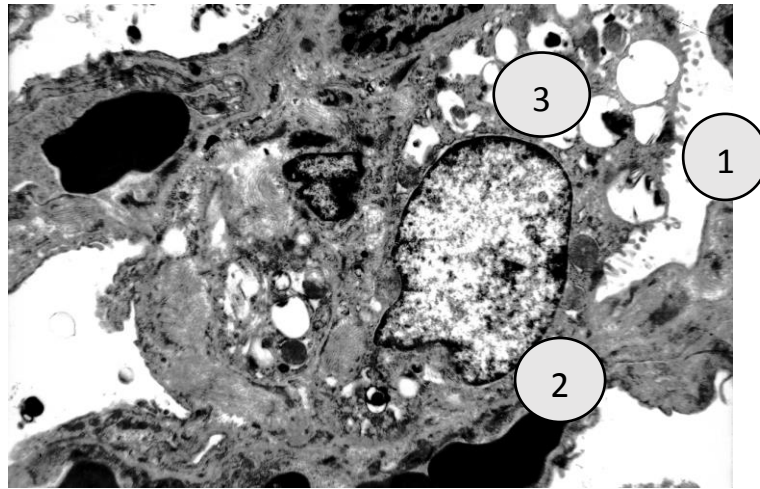


Рисунок 34 – Ультраструктура легеневої тканини щура молодого віку з терміном алоксанової гіперглікемії 60 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ :  
1 – спорожнілі аутофагічні вакуолі; 2 – ядро з фестончастим контуром; 3 – нещільно запакований осміофільний матеріал

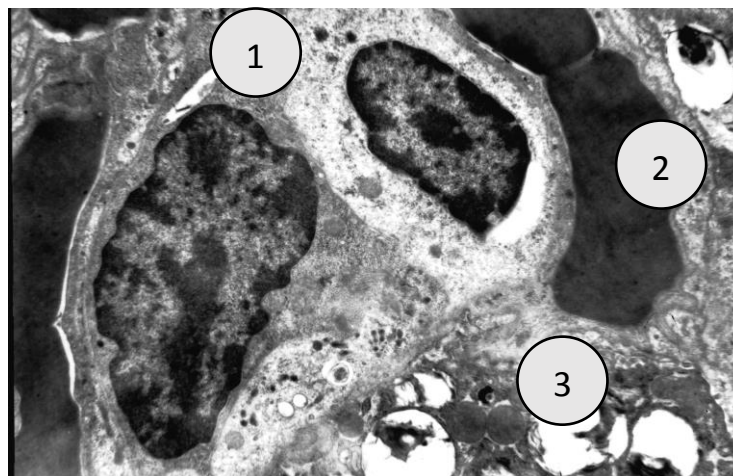


Рисунок 35 – Ультраструктура легеневої тканини щура молодого віку з терміном експериментальної гіперглікемії 150 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ :  
1 – міжепітеліальні лімфоцити в ділянці ущільнення; 2 – капіляр; 3 – альвеолоцит II типу

Рівень калію прогресивно починав знижуватися вже із 30-ї доби експерименту, що на 5,9 % ( $p < 0,05$ ) менше від інтактних щурів. Зі зростанням терміну гіперглікемії рівень калію зменшувався: на 60-ту добу експерименту – на 0,67 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 30-ю добою, на 90-ту добу – на 0,27 % ( $p < 0,05$ ), на 120-ту добу – на 0,7 % ( $p < 0,05$ ), на 150-ту добу – на 0,76 % ( $p < 0,05$ ), та на 180-ту добу – на 0,77 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 60-ю добою експерименту. Кількість калію в легенях молодих щурів із 30-ї до 180-ї доби експерименту знизилася на 1,42 %, що пояснювалося наявністю деструктивних та набрякових процесів у клітинах легень за умов хронічної гіперглікемії.

Рівень таких біолелементів, як залізо, магній, мідь, цинк та марганець збільшився в тканині легень. На 30-ту добу експерименту рівень заліза збільшився порівняно з інтактними щурами на 4,2 % ( $p < 0,05$ ) зі зростанням терміну гіперглікемії збільшувався відповідно на 60-ту добу – на 7,14 % ( $p < 0,05$ ), на 90-ту добу – на 8,5 % ( $p < 0,05$ ), на 120-ту добу – на 11,7 % ( $p < 0,05$ ), на 150-ту добу – на 12,1 % ( $p < 0,05$ ), та на 180-ту добу – на 12,4 % ( $p < 0,05$ ), що свідчило про наявність реакцій окисного стресу в легенях.

Кількість міді, цинку на марганцю аналогічно іншим біоелементом із 30-ї доби експерименту зростали порівняно з інтактною групою в 1,6; 2,9; 1,4 рази ( $p < 0,05$ ). Рівень міді з 60-ї до 180-ї доби експерименту збільшився на 3,6 % ( $p < 0,05$ ). Концентрація цинку збільшилася з 60-ї до 180-ї доби на 5,1 % ( $p < 0,05$ ). Рівень марганцю від початку експерименту збільшився в 1,7 рази ( $p < 0,05$ ). Зростання кількості вищезазначених елементів пов'язано з тим, що мідь, цинк та марганець є антиоксидантами широкого спектру дії, які попереджають окисне руйнування клітин. Показник коефіцієнта співвідношення Zn/Cu зростав зі збільшенням терміну діабету: на 30-ту добу порівняно з контролем на 95,3 % ( $p < 0,05$ ), на 60-ту добу – на 0,89 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з попереднім місяцем експерименту, на 90-ту добу – на 0,88 % ( $p < 0,05$ ), на 120-ту добу – на 0,29 % ( $p < 0,05$ ), та на 180-ту добу зменшився на 0,29 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 120-ю добою, що свідчило про збільшення



інтенсивності проходження антиоксидантних реакцій зі збільшенням терміну гіперглікемії.

Згідно з літературними джерелами в пацієнтів із цукровим діабетом I типу виникає дефіцит магнію, але експериментальні досліди на щурах показали накопичення цього елемента в усіх тканинах організму тварин. У наших дослідах концентрація магнію на 30-ту добу експерименту збільшилася на 2,8 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами та з 60-ї до 180-ї доби його рівень збільшився на 0,78 % ( $p < 0,05$ ). Ці зміни пояснюються тим фактом, що магній входить до складу ферментних систем, які беруть участь у розщепленні глюкози. Зростання його з початку експерименту пов'язано з посиленням регенеративних процесів в організмі, які з часом виснажуються. Склеротичні зміни в легеневих структурах можуть провокувати гіпермагніємію.

Рівень глюкози в крові зрілих щурів із 30-ї до 180-ї доби відповідав середньому ступеню тяжкості гіперглікемії. Відсоток глікозильованого гемоглобіну починав зростати з 90-ї доби експерименту до 7,4 % та на шостому місяці становив 9,98 %, що підтверджувало наявність у тварин хронічної гіперглікемії.

На 30-ту добу експерименту в зрілих щурів показники товщини міжальвеолярної перегородки збільшилися порівняно з інтактними тваринами у 1,4 раза ( $p < 0,05$ ), що було пов'язано з їх гіперваскуляризацією, строма представлена типовими волокнами, відзначалася візуальна гіпертрофія лімфоїдних фолікулів, що спостерігалось і на 60-ту добу експерименту (рис. 36).

На 60-ту добу експерименту товщина міжальвеолярної перегородки збільшилась на 8,3 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з попереднім терміном за рахунок появи та гіпертрофії зрілих колагенових волокон, проліферації альвеолоцитів II типу. У просвіті респіраторних бронхіол відбувалася десквамація епітелію. На третьому місяці тривання гіперглікемії відзначались ознаки емфізематозної перебудови легеневої тканини, на тлі яких виникали вогнища ателектазу з наявністю повнокровних та потовщених міжальвеолярних перегородок



(рис. 37). Із 90-ї доби в судинах мілкокого калібру спостерігався стаз та, як наслідок – плазморагія внутрішньої оболонки, збільшувались у розмірах міоцити та зрілі колагенові волокна в *t. media* та *t. externa* в легеневих артеріях м'язового типу.

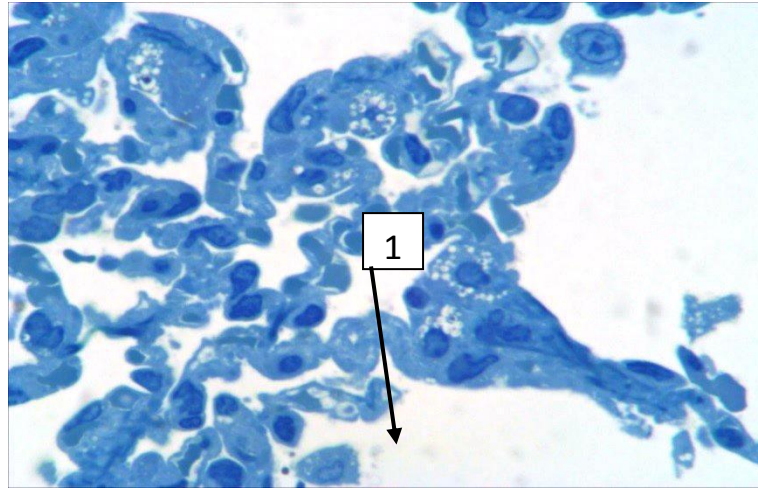


Рисунок 36 – Клітинна структура легеневої тканини щура зрілого віку з терміном алоксанової гіперглікемії 30 діб. Забарвлення толуїдиновим синім;  
 ×1 000: 1 – макрофаги, розміщені в просвіті альвеол

Гіпертрофовані лімфоїдні фолікули були гіперваскуляризовані, які до 120-ї доби експерименту мали вигляд «муфт». На 120-ту добу експерименту хронічна емфізематозна перебудова легень підтверджувалася наявністю булавоподібних потовщень на кінцях розірваних альвеол. Міжальвеолярна перегородка збільшилася на 8,6 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з попереднім терміном експерименту за рахунок гіперплазії зрілих колагенових волокон. На тлі вищезазначених явищ у легеневих судинах прогресували явища стазу, гіперагрегації клітин крові та десквамації ендотелію (рис. 38).



Рисунок 37 – Легенева тканина щура зрілого віку з терміном алоксанової гіперглікемії 90 діб. Забарвлення гематоксилін-еозином;  $\times 100$ : 1 – ділянки емфізематозно розширених альвеол; 2 – ділянки ателектазу легеневої тканини

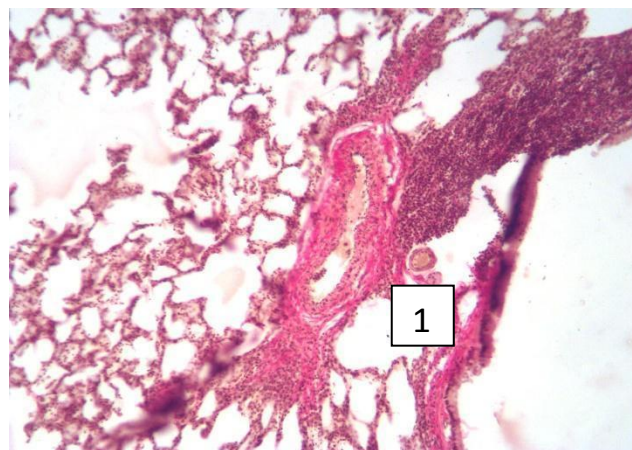


Рисунок 38 – Легенева артерія зрілого щура з терміном хронічної гіперглікемії 120 діб. Забарвлення за Ван-Гізоном.  $\times 100$ : 1 – гіперплазія колагенових волокон у м'язовій оболонці

На п'ятому місяці хронічної гіперглікемії товщина міжальвеолярної перегородки збільшилася на 23,9 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок посилення деструктивних змін у клітинах легеневої паренхіми та вакуолізаційних процесів, які розпочалися у попередніх термінах експерименту. Вже на 180-ту добу досліду показник товщини міжальвеолярної перегородки зріс на 20,2 % ( $p < 0,05$ ).

Ультрамiкроскопiя напiвтонких зрiзiв легеневої тканини з 30-ї доби експерименту свiдчила про збiльшення вдвiчі макрофагiв у вiдповiдь на початковi деструктивнi змiни в альвеолоцитах II типу, що виявлялося порушенням дiяльностi АГБ та захисної функцiї легень. З 60-ї доби вiдбувалася пролiферацiя альвеолоцитiв II типу. Збiльшення кiлькостi альвеолоцитiв II типу пояснюється їх пiдвищеною чутливiстю до абсолютного дефiциту iнсулiну, що спричинило пролiферацiю макрофагiв у вiдповiдь на одночасний посилений розпад альвеолоцитiв II типу.

Ультрамiкроморфометрiя складових гематоальвеолярного бар'єра у щурiв, якi перебували за умови алоксанової гiперглікемiї термiном 30 дiб, не мала достовiрних вiдмiнностей iз тваринами контрольної групи. З'являлися дистрофiчнi змiни в альвеолоцитах II типу, що проявлялося вакуолiзацiєю цитоплазми. Їх кiлькiсть незначно зросла порiвняно з контрольною групою, розмiщення було типовим, спостерiгалися на базальнiй мембранi та виступали у просвiт альвеол. Кiлькiсть осмiофiльного матерiалу всерединi альвеолоцитiв II типу зменшилася порiвняно з iнтактними щурами. Вже на 60-ту добу експерименту показники альвеолокапiлярного бар'єра зросли на 1,3 % ( $p < 0,05$ ) порiвняно з 30-ю добою за рахунок потовщення всiх його компонентiв. Кiлькiсть мiтохондрiй в альвеолоцитах II типу зменшилася порiвняно з iнтактною групою, їх локалiзацiя також була нетиповою, тобто не у навколядернiй зонi, а по периферiї клiтини. Простежувалася конденсацiя хромосом в ядерцях, що свiдчило про готовнiсть клiтин до подiлу. Спостерiгалася велика кiлькiсть вторинних лiзосом. Осмiофiльний пластинчастий матерiал мав нещiльно запаковану структуру. Зростала кiлькiсть сполучнотканинних волокон у легенеvій стромi (рис. 39).

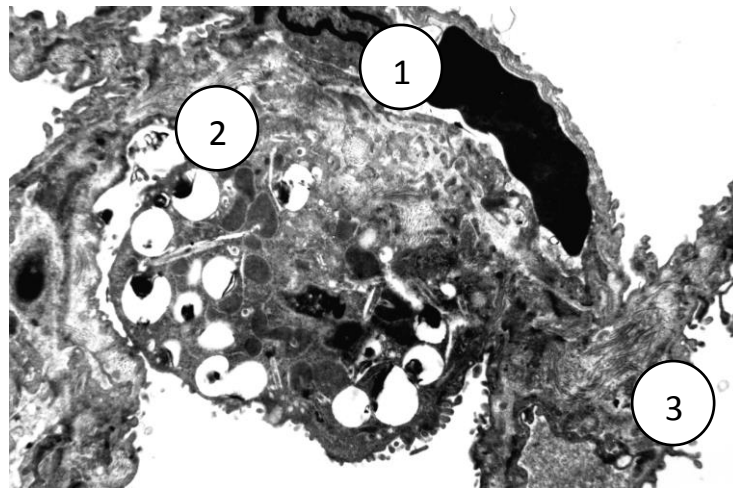


Рисунок 39 – Ультраструктура легеневої тканини щура зрілого віку з терміном алоксанової гіперглікемії 60 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ :  
1 – альвеолоцит II типу; 2 – осміофільні пластинчасті тільця; 3 – сполучнотканинні волокна

На 90-ту добу експериментальної гіперглікемії відбулася значна гіпертрофія складових гематоальвеолярного бар'єра в основному за рахунок збільшення показників ТЕ у 1,12 раза ( $p < 0,05$ ) та ТІ у 2,03 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з початком досліду. На тлі розпаду та паралельної проліферації альвеолоцитів II типу спостерігалось зростання макрофагів, що фагоцитували пластинчасті тільця. Кількість осміофільного матеріалу значно зменшувалася. Спостерігалось збільшення кількості аутофагічних вакуоль, що свідчило про явища клітинної дистрофії, а це призводило до порушення функції альвеол та захисної функції легень.

Аналогічно до групи щурів молодого віку зменшення кількості війок на поверхні альвеолоцитів II типу почалося з 120-ї доби експерименту. Ендоплазматична сітка була розширеною, розміщувалась у навколоядерній зоні. Кількість осміофільних пластинчастих тілець не відрізнялася від інтактної групи, але вміст осміофільного матеріалу в них відповідав гіпофункції. Деякі тільця не містили осміофільного матеріалу. Апікальна поверхня альвеолоцитів II типу мала незначну кількість інвагінацій та

невелику кількість осміофільного матеріалу поблизу (в просвіті альвеол), що призводило до порушення синтезу мембранної фази сурфактанта. У зв'язку з посиленням проліферації альвеолоцитів II типу поверхня деяких альвеол була вистелена практично цим типом клітин та, як наслідок, щільність контактів між альвеолоцитами I типу була порушена. Кількість вторинних лізосом в альвеолоцитах II типу була збільшеною. Зріс вміст сполучнотканинних волокон у міжклітинному просторі. Скупчення волокон колагену в інтерстиційному просторі мало частково впорядкований характер. Товщина гематоальвеолярного бар'єра збільшилася лише на 0,2 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 90-ю добою експерименту за рахунок збільшення товщини всіх його компонентів – зміни конфігурації ендотеліоцитів, товщини альвеолоцитів і товщини інтерстиційного простору до  $(189,7 \pm 0,05)$ ,  $(172,1 \pm 0,04)$  та  $(167,6 \pm 0,01)$  нм ( $p < 0,05$ ) відповідно.

Із 150-ї до 180-ї доби експерименту, крім процесів, які відбувалися в клітинах легеневої паренхіми на четвертому місяці експерименту, збільшилася кількість сполучнотканинних волокон у міжклітинному та інтерстиційному просторах. Зросла кількість макрофагів зі збільшеною фагоцитарною активністю. Фагоцити в деяких випадках розпадалися з вивільненням їх вмісту в просвіт альвеоли. Товщина гематоальвеолярного бар'єра на 180-ту добу порівняно з 150-ю добою експерименту зросла на 0,45 % ( $p < 0,05$ ).

У щурів зрілого віку в клітинах легеневої стромы та паренхіми відбувалися процеси, аналогічні до таких у тварин молодого віку, але зі значно меншою інтенсивністю. Наростання клітинної вакуолізації відбувалося лише з 90-ї доби експерименту та обмежувалося лише альвеолоцитами II типу.

Достовірні зміни абсолютної маси та абсолютного об'єму в щурів зрілого віку мали місце з 90-ї доби експерименту, їх показники зросли відповідно на 6,7 та 20,8 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами; до 180-ї доби відсоток зростання становив 25 та 24,1 % ( $p < 0,05$ ) відповідно, порівнюючи з аналогічними даними на 3-му місяці досліду. Щільність

легеневої тканини достовірно збільшилася з 30-ї доби алоксанової гіперглікемії на 2,7 % ( $p < 0,05$ ), порівняно з інтактними тваринами, але з 90-ї доби дослідження у зв'язку з розвитком емфізематозних змін зменшилася на 13,3 % ( $p < 0,05$ ), що простежувалося до кінця експерименту.

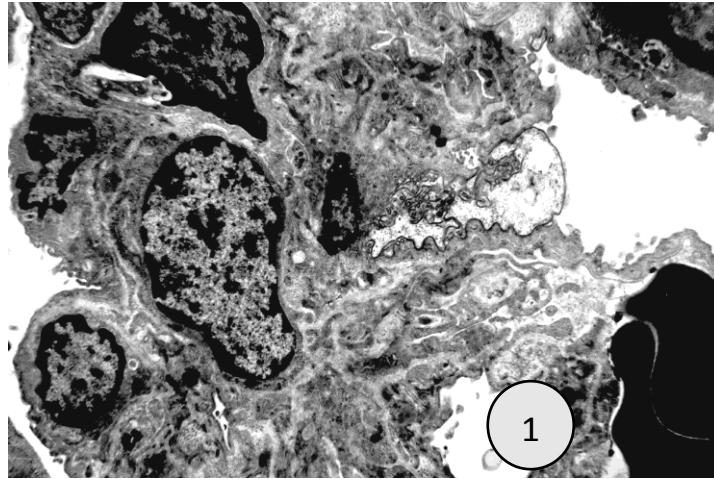


Рисунок 40 – Ультраструктура легеневої тканини щура зрілого віку з терміном гіперглікемії 150 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ : 1 – потовщений гематоальвеолярний бар'єр

На відміну від щурів молодого віку у зрілих тварин емфізематозні перетворення легень починалися з 90-ї доби експерименту (зростав показник ширини входу в альвеолу в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з інтактними тваринами), що на 4-му місяці досліду візуалізувалося під час гістологічного дослідження у вигляді типових для хронічної емфіземи «булавоподібних» потовщень на кінцях розірваних стінок альвеол. Показник ширини входу в альвеоли на 4-му місяці зріс на 16,5 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з попереднім місяцем експерименту. Показники співвідношень А та Б починали зростати з 60-ї доби досліду на 19,4 % ( $p < 0,05$ ) та на 26,3 % ( $p < 0,05$ ), відповідно порівняно з інтактними щурами. Зі зростанням терміну експерименту вищезазначені показники збільшувалися, на 90-ту добу хронічної гіперглікемії становили: показник А –  $(1,06 \pm 0,01)$  ( $p < 0,05$ ), показник Б –  $(1,23 \pm 0,01)$ , до

180-ї доби відбулося зростання на 9,4 % ( $p < 0,05$ ) та на 7,3 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

З 60-ї доби експерименту на 1,5 % ( $p < 0,05$ ) зріс показник глибини альвеол порівняно з інтактними тваринами. На відміну від групи молодих щурів, у яких глибина альвеол зменшилася за рахунок склеротично-рестриктивних змін із 120-ї доби експерименту, у зрілих тварин відбувається перерозтягнення альвеол, за рахунок чого показник глибини альвеол із 90-ї до 180-ї доби зростав на 11,9 % ( $p < 0,05$ ). Уже з початку експерименту показник ширини провідної бронхіоли збільшувався на 3,1 % ( $p < 0,05$ ). Різкого збільшення ширини провідної бронхіоли впродовж експерименту не було, на 60-ту добу відбулося зростання показника на 2,7 % ( $p < 0,05$ ), на 3-му місяці експерименту – на 4,2 % ( $p < 0,05$ ), на 4-му місяці – на 5,7 % ( $p < 0,05$ ), на 5-му місяці – на 5,9 % ( $p < 0,05$ ), на 6-му місяці – на 0,8 % ( $p < 0,05$ ). Відповідно до емфізематозної перебудови легень відбувалося зростання показника відносного об'єму легень упродовж досліджу.

Вплив порушення обміну глюкози на структуру легеневих артерій м'язового типу в щурів зрілого віку відзначався з 30-ї доби експерименту, показник товщини судинної стінки зріс у 1,5 раза ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою тварин у результаті гіпертрофії міоцитів. Із 60-ї до 90-ї доби експерименту товщина судинної стінки збільшилась у 1,6 раза ( $p < 0,05$ ), що пояснювалося вираженою гіпертрофією міоцитів, колагенових волокон у *t. media* та *t. externa*. У судинах були виражені процеси проліферації ендотелію. На 120-ту добу хронічної гіперглікемії товщина судинної стінки становила  $(90,3 \pm 0,08)$  мкм ( $p < 0,05$ ), та вже до 180-ї доби збільшилась на 17,9 % ( $p < 0,05$ ), що пов'язано з посиленням явищ плазморагії в результаті стазу.

Гіпертрофія легеневих лімфоїдних фолікулів у щурів зрілого віку відбувалася з 30-ї і до 180-ї доби експерименту.

На початок експерименту зростання показника порівняно з інтактною групою відбулось у 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), на 60-ту добу – в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) щодо



попереднього терміну досліджу, на 90-ту добу – в 1,2 рази ( $p < 0,05$ ), на 120-ту добу – в 1,2 рази ( $p < 0,05$ ) рази, з 120-ї до 180-ї доби дослідження – у 1,6 рази ( $p < 0,05$ ). Це пов'язано з розвитком імунореактивних механізмів, які мають місце при цукровому діабеті I типу [76].

Кількість натрію в легенях зрілих щурів на 30-ту добу експерименту зменшилася на 0,6 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з інтактною групою тварин, і поступово зі зростанням терміну експерименту його рівень знижувався та до 180-ї доби становив  $(436,7 \pm 0,02)$  мкг/г ( $p < 0,05$ ). Концентрація калію в легенях зменшувалася з 30-ї доби експерименту на 5,1 % ( $p < 0,05$ ), на 60-ту добу досліджу відбувалося подальше зниження калію на 0,8 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з попереднім терміном експерименту. В період з 90-ї до 180-ї доби вміст калію змінився з  $(2200,0 \pm 1,2)$  до  $(2183,5 \pm 0,5)$  мкг/г ( $p < 0,05$ ). Ці процеси є типовими для хронічної гіперглікемії, оскільки абсолютна недостатність інсуліну порушує проникнення калію в клітини.

Вміст заліза, магнію, міді, цинку та марганцю збільшився в тканині легень зрілих щурів. На 30-ту добу експерименту рівень заліза збільшився порівняно з інтактними щурами на 3,0 % ( $p < 0,05$ ) зі зростанням терміну гіперглікемії збільшувався незначно. Кількість міді, цинку та марганцю, аналогічно іншим біоелементом, із 30-ї доби експерименту зростала порівняно з інтактними на 1,8; 3,9; 1,6 рази ( $p < 0,05$ ). Рівень міді з 60-ї до 180-ї доби експерименту збільшувався на 0,92 % ( $p < 0,05$ ). Концентрація цинку збільшилася з 60-ї доби експерименту до 180-ї доби на 1,2 % ( $p < 0,05$ ). Рівень марганцю від початку експерименту збільшився на 20,0 % ( $p < 0,05$ ). Зростання рівня вищезазначених елементів пов'язане з їх антиоксидантними властивостями. Коефіцієнт співвідношення Zn/Cu зростав із початку експерименту та до 6 місяців хронічної гіперглікемії, що в абсолютних числах становило на 30-ту добу – 18,6; на 60-ту – 18,7; на 90-ту – 20,3; на 120-ту – 20,4; на 150-ту – 18,8; на 180-ту добу він незначно зменшився на 0,5 % порівняно з попереднім терміном експерименту. Зростання показника



коефіцієнта співвідношення Zn/Cu свідчило про посилене проходження антиоксидантних реакцій за умов хронічної гіперглікемії.

У наших дослідах концентрація магнію на 30-ту добу експерименту збільшилася на 0,9 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами та з 60-ї і до 180-ї доби його рівень збільшився 3,8 % ( $p < 0,05$ ). На відміну від щурів молодого віку, у яких рівень магнію з 30-ї доби експерименту підвищився та до 180-ї доби поступово знижався, в щурів зрілого віку гіпермагніємія спостерігалася під кінець експерименту, що можна пояснити більш сповільненими ферментативними реакціями організму та їх активацію з 60-ї доби експерименту (участь у метаболізмі білків, жирів, вуглеводів).

Рівень глюкози в крові старечих щурів на 30-ту добу відповідав тяжкому ступеню гіперглікемії, з 60-ї до 180-ї доби відповідав середньому ступеню тяжкості. Відсоток глікозильованого гемоглобіну починав зростати з 90-ї доби експерименту до 8,2 % та на шостому місяці становив 9,7 %, що підтверджувало наявність у тварин хронічної гіперглікемії.

Абсолютна маса легень у старечих щурів упродовж експерименту порівняно з інтактними тваринами збільшилася з 60-ї доби на 0,33 % ( $p < 0,05$ ) і до 180-ї доби її показник становив  $(3,3 \pm 0,04)$  г. Показники абсолютного об'єму легень достовірно почали зростати з 90-ї доби експерименту. За 120 діб досліду зростання показника відбулося на 12,2 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактною групою; на 5-му місяці хронічної гіперглікемії – на 3,73 % ( $p < 0,05$ ), на 6-му місяці – на 0,3 % ( $p < 0,05$ ) відповідно до попередніх термінів експерименту, що свідчило про посилення розвитку в легенях процесів емфізематозної спрямованості на тлі гіперглікемії, які притаманні здоровим тваринам старечого віку.

Із початку експерименту під час світлооптичного дослідження легень щурів старечого віку було встановлено, що міжальвеолярні перетинки були гіперваскуляризовані, відзначалася візуальна гіпертрофія лімфоїдних фолікулів, в артеріях м'язового типу значно збільшилися зрілі колагенові волокна в складі зовнішньої оболонки, та міоцити – в складі *t. media*. На 60-ту

добу експерименту відбувався процес десквамації респіраторного епітелію у термінальних та респіраторних бронхіолах. Товщина міжальвеолярної перетинки значного збільшення досягла лише з 90-ї доби досліду на 12,8 % ( $p < 0,05$ ), порівняючи з інтактною групою, з 120-ї до 180-ї доби цей показник зріс на 32,6 % ( $p < 0,05$ ) в результаті прогресування вищезазначених процесів.

Доказами емфізематозної спрямованості, що інтенсивно розвивалися з 90-ї доби досліду були вищезазначені органометричні виміри, які підкріплювалися морфометричними даними. Ширина входу в альвеоли зростала на 6,6 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 60-ю добою експерименту (аналогічно зрілим щурам). На 120-ту та 150-ту доби показник ширини входу в альвеоли зростав на 6,4 % ( $p < 0,05$ ) та 4,4 % ( $p < 0,05$ ) відповідно. Найбільшого значення вищезазначений показник досяг на 180-ту добу експерименту, він зріс на 25,3 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з попереднім терміном експерименту.

На відміну від показників співвідношення А та Б експериментальних тварин молодого та зрілого віку, які зростали впродовж експерименту, в щурів старечої групи показник співвідношення А на 90-ту добу досліду на 5,3 % ( $p < 0,05$ ) менший від показника інтактної групи, на 120-ту добу прогресувало його зменшення на 26,7 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з 90-ю добою експерименту, що свідчило про розвиток емфізематозних змін у легенях. Із 150-ї доби показник співвідношення А зростав на 1,3 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок збільшення показника ширини альвеоли, на 180-ту добу експерименту був більшим на 50 % ( $p < 0,05$ ) від попереднього. Показник співвідношення Б від 30-ї та до 90-ї доби експерименту зростав на 10,8 % ( $p < 0,05$ ), проте вже з четвертого місяця досліду зменшився на 33,3 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з 90-ю добою, з 120-ї до 150-ї доби відбулося знову його незначне збільшення на 9,1 % ( $p < 0,05$ ), хоча порівняно з інтактними тваринами показник співвідношення Б був меншим, починаючи з 120-ї доби експерименту.

Значне зростання показника глибини альвеол відбувалося на 4-му місяці хронічної гіперглікемії на  $(54,7 \pm 0,1)$  мкм, на 90-ту добу експерименту – на

34,6 % ( $p < 0,05$ ) і до 180-ї доби відбувалося його незначне зменшення на 0,3 % ( $p < 0,05$ ). Отже, до 120-ї доби експерименту відбувалося компенсаторне збільшення глибини альвеол на тлі зменшення входу в альвеоли, проте вже з 150-ї доби розміри входу в альвеоли збільшилися, відповідно до цього глибина альвеол дещо зменшилася. Вже з 30-ї доби експерименту показник ширини провідної бронхіоли збільшувався на 28,6 % ( $p < 0,05$ ) (молоді щури на 30-ту добу експерименту ШПБ зросла на 14,7 % ( $p < 0,05$ ), зрілі – на 3,1 % ( $p < 0,05$ )), та впродовж експерименту цей показник збільшувався незначно, відсоток його зростання від 60-ї до 180-ї доби становив 1,1 % ( $p < 0,05$ ). З 90-ї доби експерименту відбувалося достовірне збільшення показника відносної маси та відносного об'єму легень, що пояснювалось емфізематозними змінами в легенях на тлі хронічної гіперглікемії.

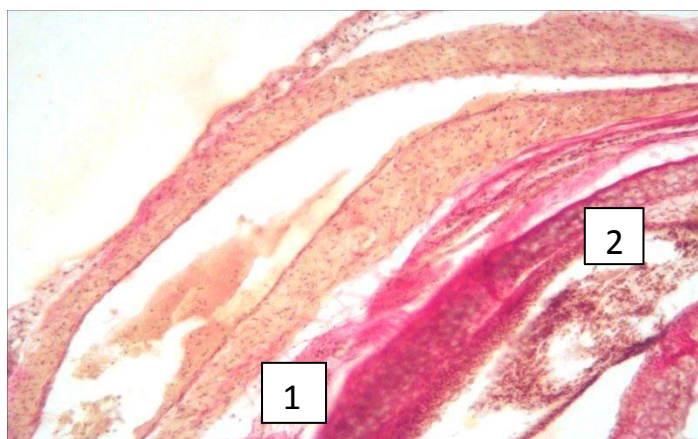


Рисунок 41 – Легенева артерія щура старечого віку з терміном гіперглікемії 90 діб. Забарвлення за Ван-Гізоном.  $\times 100$ : 1 – явища стазу в легеневій судині; 2 – колагенові волокна в зовнішній оболонці

Аналогічно до змін у легеневих судинах тварин експериментальних груп молодого та зрілого віку в щурів старечого віку реактивні процеси на тлі гіперглікемії в артеріях м'язового типу починалися з початку експерименту. Товщина судинної стінки зростала на 17,1 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з інтактною групою тварин, за рахунок збільшення товщини всіх складових

судинної стінки в результаті гіпертрофії міоцитів, зрілих колагенових волокон та розшарування *t. interna*. На 60-ту добу експерименту товщина судинної стінки збільшилася на 33,2 % ( $p < 0,05$ ), у цьому разі товщина комплексу інтима + медіа зростала на 56,6 % ( $p < 0,05$ ). На 90-ту добу хронічної гіперглікемії товщина судинної стінки становила  $(81,6 \pm 0,01)$  мкм ( $p < 0,05$ ), що пояснювалося вищезазначеними процесами та долученням явищ плазморагії стінок судин.

За період із 90-ї до 180-ї доби товщина судинної стінки незначно збільшувалася на 7,8 % ( $p < 0,05$ ). Ці явища свідчили про те, що у тварин старечого віку інтенсивність склерозування судин, гіпертрофія гладком'язових волокон уповільнюється, що також виявлено в працях Magdalena Kozakova та ін. [77].

Реакція лімфоїдної тканини легень у щурів старечого віку відбувалась аналогічно як у молодих, так і у зрілих тварин із 30-ї і до 180-ї доби експерименту, але з меншою інтенсивністю, проте з 150-ї доби алоксанового діабету спостерігалися гіпотрофічні зміни, що пов'язано з віковою інволюцією.

Під час ультрамікроскопії на 30-ту добу експерименту виявлено, що альвеолоцити II типу мали типову форму, спостерігалось зменшення ворсинок на апікальній поверхні, матрикс мітохондрій був просвітлений із деформованими кристами, спостерігалось розволокнення осміофільного матеріалу всередині тілець, проміжки між пластинами були збільшеними, осміофільні тільця були збільшеними, деформованими, кількість вторинних лізосом збільшилася порівняно з інтактними щурами.

На 60-ту добу досліду спостерігалось прогресивне потовщення гематоальвеолярного бар'єра на 1,2 % ( $p < 0,05$ ), порівняно з тваринами з терміном діабету 30 діб. Альвеолоцити I типу мали типову структуру, їх кількість зменшувалася одночасно з проліферацією альвеолоцитів II типу. В альвеолоцитах II типу відбувалося прогресування вищезазначених явищ, що розпочалися з початку досліду та були характерні для щурів молодого й

зрілого віку. Характерною відмінністю було раннє значне збільшення сполучнотканинних волокон у легеневому інтерстиції та міжклітинних проміжках. Через три місяці експерименту товщина гематоальвеолярного бар'єра зросла порівняно з попереднім терміном діабету в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ), за рахунок фіброзних змін в інтерстиційному та міжклітинному просторах. Дистрофічні явища спостерігались не лише у альвеолоцитах II типу, а й в альвеолоцитах I типу, що було типовим і для щурів молодого віку. Паралельно з процесами, описаними на 60-ту добу експерименту, спостерігалось повне зникнення ворсинок на поверхні альвеолоцитів II типу. Осміофільні пластинчасті тілця на 90-ту добу експерименту були деформовані та зруйновані.

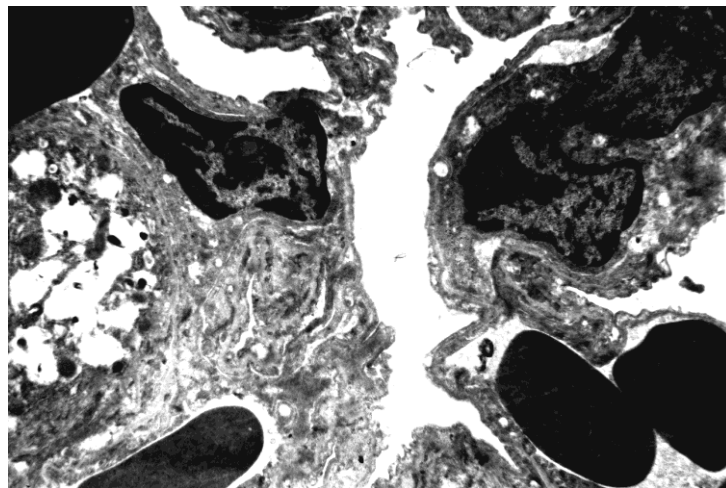


Рисунок 42 – Ультраструктура легеневої тканини щура старечого віку з терміном алоксанової гіперглікемії 30 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування уранілацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ :

1 – деформація осміофільних тілець та розпад осміофільного матеріалу

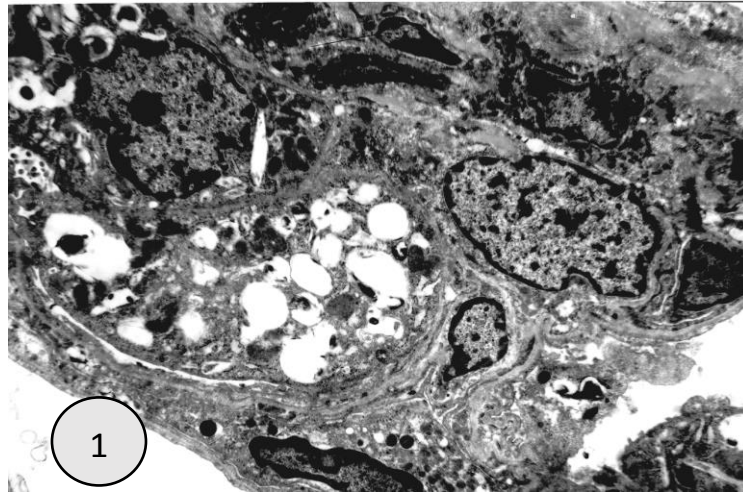


Рисунок 43 – Ультраструктура легеневої тканини щура старечого віку з терміном експериментальної гіперглікемії 90 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування уранілацетатом і цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ :

1 – альвеолоцити II типу та потовщений гематоальвеолярний бар'єр

На 120-ту добу експерименту спостерігалось зростання кількості макрофагів, що фагоцитували часточки зруйнованих альвеолоцитів II типу. Показник ТАБ на 150-ту добу хронічної гіперглікемії на 1,34 % ( $p < 0,05$ ) був більшим за аналогічний на 120-ту добу. Цитоплазматичні відростки альвеолоцитів I типу майже не містили органел та простягалися на значну відстань від ядра. Частіше траплялися ділянки оголення базальної мембрани за рахунок порушення міжклітинних контактів. Плазмолема місцями була просвітленою та містила вакуолі. Між собою клітини були з'єднані дещо розрихленими міжклітинними з'єднаннями. На 180-ту добу експерименту на тлі проліферації альвеолоцитів II типу відбулося зменшення альвеолоцитів III типу вдвічі ( $p < 0,05$ ) у досліджуваних зразках.

Товщина гематоальвеолярного бар'єра збільшилася на 1,2 % ( $p < 0,05$ ), порівняно з попереднім терміном експерименту. Ділянки фіброзування гематоальвеолярного бар'єра спостерігалися не локально, а в усіх полях зору.

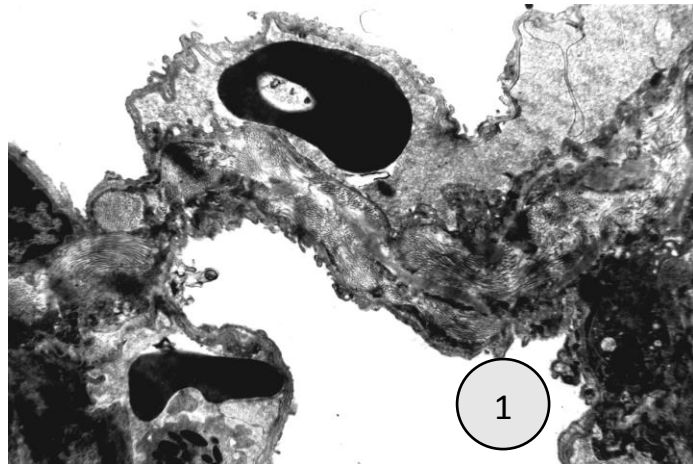


Рисунок 44 – Ультраструктура легеневої тканини щура старечого віку з терміном гіперглікемії 180 діб. Електронно-мікроскопічна фотографія. Контрастування ураніацетатом та цитратом свинцю;  $\times 4\ 000$ : 1 – фіброзні зміни в гемато-альвеолярному бар'єрі

Концентрація натрію в легенях старечих щурів на 30-ту добу експерименту зменшилася на 1,7 % ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з інтактною групою тварин, та паралельно зі зростанням терміну експерименту його рівень знижувався і на 180 добу досліду досягнув мінімального показника. Дефіцит натрію пояснювався його підвищеним виділення із сечею на тлі гіперглікемії.

Вміст калію в легенях зменшувався з 30-ї доби експерименту на 6,2 % ( $p < 0,05$ ). З 60-ї доби досліду рівень калію поступово, але незначно знижувався, до 6 місяців експерименту, що пояснювалось абсолютною недостатністю інсуліну в організмі експериментальних тварин, яка провокувала порушення проникнення калію в клітини (відсоток зменшення калію і натрію вище у тварин молодого та зрілого віку).

Вміст заліза, магнію, міді, цинку та марганцю зростав у тканині легень щурів як молодого, зрілого, так і старечого віку. На початок експерименту рівень заліза збільшився порівняно з інтактними щурами, на 5,4 % ( $p < 0,05$ ) зі зростанням терміну досліду, концентрація заліза зростала дуже незначно, що свідчило про проходження реакцій окисного стресу в легенях; їх інтенсивність

була максимальною на 30-ту добу експерименту та поступово знижувалася з 60-ї доби.

Показники вмісту міді, цинку на марганцю аналогічно іншим біоелементом із 30-ї доби експерименту зростали порівняно з контролем у 2,5; 4,3; 2,9 рази ( $p < 0,05$ ). Зростання рівня вищезазначених елементів пов'язано з їх антиоксидантними властивостями. Коефіцієнт співвідношення Zn/Cu зростав із початку експерименту та вже 60-ї доби дослідження спостерігалася тенденція до зменшення. Порівнюючи вищезазначені показники з аналогічними у молодих та зрілих тварин, можна стверджувати про найвищу експресію Zn та Cu-вмісних супероксиддисмутази та металопротейнів у щурів зрілого віку, а найнижчу – у тварин старечого віку, що можна пов'язати з виснаженням компенсаторних механізмів на тлі інволютивних змін в останніх.

Метаболізм магнію в старечих щурів подібний на метаболізм магнію у тварин молодшої групи, але, беручи до уваги незрілість ферментних систем у другій групі та зрілість у першій, можна пояснити посилене накопичення магнію у перші 30 днів експерименту. До кінця дослідження рівень виснаження репаративних процесів у тварин молодшого віку набагато більший, ніж у старечих щурів, про що свідчило зменшення концентрації магнію зі зростанням терміну експерименту, але вміст міді залишався більшим, ніж в інтактних тварин.

Під час аналізу результатів двофакторного дисперсійного аналізу впливу вікового фактора і терміну тривання хронічної гіперглікемії на морфометричні показники легеневих структур, легеневих судин та легеневих лімфоїдних фолікулів експериментальних тварин було встановлено переважання впливу терміну дослідження на зміну ширини входу в альвеоли, ширини провідної бронхіоли, товщини міжальвеолярної перетинки, показників співвідношень А та Б, товщини судинної стінки, товщини комплексу інтима + медіа, товщини м'язового шару, товщини зовнішньої оболонки, периметра лімфоїдних фолікулів, товщини гематоальвеолярного бар'єра, товщини інтерстиційного простору.



Під час дослідження впливу вікового фактора і терміну тривання хронічної гіперглікемії на відносну масу та відносний об'єм легень сила фактора взаємодії двох контролювальних ознак становила 59,8 та 2,8 % відповідно. Відсоток впливу терміну досліду та віку на ширину входу в альвеоли був практично однаковий 36,5 та 44,4 % відповідно, а комбінація факторів не дала достовірного результату. Вплив вікового фактора на глибину альвеоли в числових даних становив 42,7 %, а от комбінація вищезазначеного фактора з впливом терміну гіперглікемії мала значний вплив на розміри глибини альвеоли та становила 37,03 %.

Беручи до уваги значне зниження маси експериментальних тварин, особливо молодого віку, що є першим симптомом розвитку гіперглікемії, та провівши розрахунок сили впливу терміну експерименту й віку тварин, отримали по 14,2 та 71,6 % відповідно, комбінація факторів не дала достовірного впливу.

При визначенні впливу терміну експерименту та вікового фактора на зміни біоелементного складу легень переважання дії першого фактора було достовірним на концентрацію натрію. Вміст калію в легенях піддавався впливу дії комбінації обох факторів на 3,6 %, причому сила дії фактора зростання терміну хронічної гіперглікемії становила 48,01 %, вікового фактора – 48,4 %. Концентрація заліза, магнію, міді, цинку, марганцю залежала більшою мірою від дії вікового фактора: на 84,1; 95,96; 50,5; 99,9; 87,3 % відповідно. Комбінація вікового фактора і терміну тривання експериментальної гіперглікемії для заліза, магнію, міді, цинку, марганцю становила 9; 2,2; 28,9; 0,05 та 3,7 % відповідно.

Аналіз змін ультрамікроскопічних структур легеневої тканини показав значний вплив терміну тривання алоксанової гіперглікемії на товщину гематоальвеолярного бар'єра – 39,3 %, але віковий фактор впливав на товщину вищезазначеної структури більш вагомо – на 50,7 %. Взаємодія впливів обох умов становила лише 9,8 %. Неврахованими факторами було спричинено 0,1 % впливу на розмір кров'яно-повітряного бар'єра. Щодо окремих

складових гематоальвеолярного бар'єра, а саме товщини ендотеліоцитів, вагомий вплив на їх потовщення спричиняв термін хронічної гіперглікемії – 41,5 %, у меншому ступені – віковий фактор (на 34,3 %). Загалом сила дії комбінації обох факторів на показник товщини ендотеліоцитів становила 24,1 %. Решта факторів впливу – 0,1 % – відносилася до неврахованих. Значно більшою мірою на товщину без'ядерної частини альвеолоцитів мав вплив фактор тривання експериментальної гіперглікемії – 38,9 %, лише 9,3 % впливу припадало на віковий фактор, та у взаємодії обидва фактори мали вагомий вплив на вищезазначену структуру – 51,7 %. Сила дії неврахованих факторів становила 0,1 %. На показник товщини інтерстиційного простору легень більший вплив чинила сила вікового фактора – 52,2 %, хоча термін тривання хронічної гіперглікемії мав також вагомий вплив – 38,03 %. Комбінація обох результуючих факторів впливала на товщину інтерстицію незначно – 9,6 %. Вплив неврахованих факторів становив 0,17 %.

Морфологічними доказами дії продуктів порушення всіх видів обміну в результаті хронічної гіперглікемії на легеневі структури є макро- та мікроангіопатія, яка призводила до пневмосклерозу з порушенням еластичності легень. Вищезазначені явища посилювалися зі зростанням терміну експериментальної гіперглікемії та розгорталися на тлі гіперглікемії тяжкого і середнього ступенів. Такі зміни легеневої тканини описані в небагатьох працях зарубіжних вчених [79].

Зважаючи на характер змін у структурах легеневої тканини та з метою корекції патогенетичних ланок розвитку алоксанової гіперглікемії, був обраний лікувальний засіб кверцетин у вигляді гранул. Препарат широко використовується в медичній практиці. Унаслідок капіляростабілізуючих властивостей, пов'язаних з антиоксидантним, мембраностабілізуючим впливом, препарат знижує проникність капілярів. Кверцетин має протизапальний ефект завдяки блокаді ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти, зниженню синтезу лейкотрієнів, серотоніну та інших медіаторів запалення. Препарат проявляє стійку імуномодулюючу активність.

Експериментально визначені антисклеротичні властивості. Кверцетин здатний стимулювати вивільнення інсуліну, пригнічувати синтез тромбоксану [80].

Аналіз органометричних вимірювань легень щурів молодого віку продемонстрував, що у тварин, які отримували кверцетин, із 60-ї доби абсолютна маса легень на 0,8 % ( $p < 0,05$ ) була меншою, ніж у тварин із гіперглікемією. З 90-ї доби показники абсолютного та відносного об'єму, відносної маси легень на 14,3; 2,3 та 2,9 % ( $p < 0,05$ ) відрізнялися від аналогічних у щурів, що не вживали препарат. Щільність легеневої тканини на 90-ту добу була на 1,3 % ( $p < 0,05$ ) більшою у тварин, яким вводили лікувальний засіб. Це свідчило, що в легенях експериментальних тварин, які вживали кверцетин розвивались емфізематозні зміни, але з меншою інтенсивністю.

Під час проведення мікроскопічного дослідження легеневої тканини на 180-ту добу хронічної гіперглікемії з одночасним введенням тваринам кверцетину було виявлено незначне внутрішньосудинне скупчення елементів крові в поодиноких судинах. У стінках артерій м'язового типу (в *t. media* та *t. externa*), а також у складі міжальвеолярних перетинок спостерігалось менш інтенсивне збільшення розмірів зрілих колагенових волокон. У деяких зразках спостерігались ознаки дистелектазу вогнищевого характеру та незначна гіпертрофія лімфоїдних фолікулів.

Під час ультрамікроскопічного дослідження було виявлено незначні вогнища просвітлення цитоплазми альвеолоцитів II типу з 120-ї доби досліду, їх проліферацію та руйнування, і паралельно з цим – збільшення кількості макрофагів. Вплив препарату на товщину гематоальвеолярного бар'єра був виявлений уже на 60-ту добу його вживання тваринами. Показник товщини гематоальвеолярного бар'єра у тварин, що приймали кверцетин був на 0,41 % ( $p < 0,05$ ) менше, ніж у тварин, які не вживали його, але більший на 0,97 % ( $p < 0,05$ ) від інтактних щурів. Ці явища спостерігалися на тлі менш інтенсивної деструкції в пневмоцитах II типу та гіпертрофії колагену в легеневій стромі, ніж у тварин із гіперглікемією, але показників інтактних

тварин, на тлі прийому кверцетину, досягнуто не було. Вагомий вплив лікувального засобу був визначений на 120-ту добу його приймання тваринами (зменшення товщини гематоальвеолярного бар'єра на 0,13 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з тваринами, які не вживали кверцетин). Антиоксидантні властивості кверцетину проявились у його впливі на склеротичні зміни легеневого інтерстицію на тлі хронічної гіперглікемії. З 60-ї доби експерименту на тлі приймання препарату показник товщини інтерстиціального простору був меншим на 0,74 % ( $p < 0,05$ ), ніж у тварин, які не вживали препарат. Упродовж експерименту товщина інтерстицію зростала порівняно з інтактними тваринами, але була в 1,1 раза ( $p < 0,05$ ) меншою, ніж у щурів, яким не вводили кверцетин.

Початкові зміни у структурах легеневої тканини на мікрорівні під впливом препарату-коректора розпочалися з 150-ї доби алоксанової гіперглікемії. Показники ширини альвеоли достовірно були меншими порівняно з групою тварин без коректора на 1,5 % ( $p < 0,05$ ) та на 180-ту добу, коли превалювали рестриктивні зміни, цей показник був більшим порівняно з тваринами з гіперглікемією на 1,9 % ( $p < 0,05$ ). Глибина альвеол була більшою з 150-ї доби на 0,2 % ( $p < 0,05$ ), та на 180-ту добу зросла на 18,8 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з тваринами, які не вживали кверцетин. Показники ширини входу в альвеолу змінювалися з 120-ї доби досліду, на п'ятому місяці експерименту ширина входу в альвеолу у тварин, які вживали препарат, була меншою на 1,4 % ( $p < 0,05$ ) порівняно із щурами з гіперглікемією, на шостому місяці – на 11,5 % ( $p < 0,05$ ). Ширина провідних бронхіол на тлі вживання кверцетину також не так стрімко зростала: на 150-ту добу досліду з коректором їх розмір був меншим на 0,14 % ( $p < 0,05$ ) і до 180-ї доби зріс на 1,3 % ( $p < 0,05$ ) (у щурів, яким не вводили препарат зростання цього показника, відбулось на 21,8 % ( $p < 0,05$ )). Товщина міжальвеолярних перетинок достовірно була меншою з 150-ї доби експерименту на тлі вживання кверцетину. Цей показник був меншими вже на п'ятому місяці хронічної гіперглікемії на 4,9 % ( $p < 0,05$ ), на шостому місяці – на 61,5 % ( $p < 0,05$ ). Показники співвідношень А та Б вже з

150-ї доби експерименту та одночасного вживання кверцетину на 2,1 % ( $p < 0,05$ ) та 0,64 % ( $p < 0,05$ ) відповідно були меншими порівняно з тваринами, що не отримували препарат. Значне зменшення показників співвідношень А та Б спостерігали на 180-ту добу експерименту в 1,7 рази ( $p < 0,05$ ). Глибина альвеоли на шостому місяці дослідження у тварин, які отримували лікувальний засіб була на 8,3 % ( $p < 0,05$ ) більшою, ніж у групі без кверцетину, але порівняно з інтактною групою показник був більшим на 12,2 % ( $p < 0,05$ ). Стінка легеневої артерії м'язового типу достовірно потовщувалася з початку п'ятого місяця експерименту та паралельного вживання кверцетину. Порівняно з 120-ю добою дослідження товщина судинної стінки зросла на 0,72 % ( $p < 0,05$ ), (у групі без кверцетину – на 1,34 % ( $p < 0,05$ ), на 180-ту добу експерименту показник товщини судинної стінки був на 2,59 % ( $p < 0,05$ ) меншим, ніж у групі тварин, які не вживали препарат. Товщина зовнішньої оболонки на 120-ту добу була меншою на 1,1 % ( $p < 0,05$ ) за рахунок менш інтенсивної гіпертрофії зрілих колагенових волокон. Уже на початок 180-ї доби експерименту кверцетин достовірно вплинув на всі складові судинної стінки.

Реакція з боку органів імунної системи периферичної ланки розпочалася вже з 60-ї доби дослідження на тлі приймання кверцетину. Розміри лімфоїдних фолікулів на 90-ту добу експерименту були в 1,2 рази ( $p < 0,05$ ) меншими, ніж у групі без препарату, на 120-ту, 150-ту та 180-ту доби хронічної гіперглікемії в 1,14; 1,73 та 1,5 рази ( $p < 0,05$ ) були меншими відповідно до таких груп тварин, які не вживали лікувальний засіб, що підтверджує дані про високу протективну ефективність кверцетину, про це висвітлено у працях І.П. Стечишина та ін. [80].

Аналізуючи вплив препарату з діючою речовиною кверцетин на концентрацію деяких макро- та мікроелементів у легенях тварин з алоксановою гіперглікемією було встановлено, що ні на початку експерименту, ні на 180-ту добу достовірних змін показників умісту натрію, калію, заліза, магнію, марганцю, цинку та міді не було порівняно із щурами,

які не отримували лікувальний засіб. Коефіцієнт співвідношення Zn/Cu був незмінний порівняно із щурами, яким не вводили препарат, що свідчило про відсутність впливу кверцетину на проходження антиоксидантних реакцій у легенях. Рівень гіперглікемії не піддавався достовірному впливу лікувального засобу. Не мав впливу кверцетин на показники маси тіла тварин.

Аналізуючи вплив кверцетину на розвиток патогенетичних змін за умов експериментальної гіперглікемії, було встановлено, що вищезазначений препарат значно гальмував процеси емфізематозної перебудови легеневих структур завдяки блокаді медіаторів запалення, сповільнював неспецифічні імунні реакції організму, що виявлялося гіпертрофією лімфоїдних фолікулів і призводило до порушення функції зовнішнього дихання, завдяки своїм антиоксидантним та мембраностабілізуючим властивостям зменшував розвиток фіброзу в легеневій стромі та артеріях м'язового типу. Таким чином, лікувальний засіб кверцетин можна вважати коректором.

## **2.5 Ріст та формування стегнових і плечових кісток за умов експериментальної гіперглікемії**

Ураховуючи наявність певної кількості результатів клінічних та експериментальних досліджень, присвячених вивченню діабетичних порушень структури кісток скелету, потрібно відзначити недостатню вивченість особливостей впливу гіперглікемії на ріст та структурно-функціональні зміни остеогенних клітин в довгих трубчастих кістках щурів залежно від віку та тривалості впливу патологічного чинника. Результати досліджень в даному напрямку були представлені в нечисленних публікаціях, які доводять діабетичне ураження кісток скелету щурів, що обумовлене впливом на структуру і функцію як діафіза та епіфіза так і будову наросткового хряща [81-85].

Отже, наше експериментальне дослідження було спрямоване на встановлення особливостей впливу хронічної гіперглікемії на ріст та зміну структурних змін у довгих трубчастих кістках щурів різних вікових груп.

Відзначене в нашому дослідженні сповільнення росту та порушення ремоделювання довгих трубчастих кісток щурів є результатом впливу комплексу негативних чинників, серед яких дефіцит інсуліну та гіперглікемія є основними, що визначають напрямок та особливості розвитку подальших морфологічних змін.

Отримані нами результати остеометрії стегнових та плечових кісток щурів з гіперглікемією та дані про зміни в діафізі та дистальних епіфізах цих кісток свідчать про сповільнення їх і доповнюють накопичені відомості стосовно впливу тривалої гіперглікемії на систему скелета взагалі та довгі трубчасті кістки зокрема.

За даними остеометрії, лінійні ростові показники стегнових досліджуваних кісток щурів експериментальної та контрольної серії найбільш інтенсивно збільшувались у щурів молодого віку. Однак середній показник МДК стегнової кістки у тварин експериментальної серії був достовірно меншим за такий у тварин контрольної.

Відтак МДК стегнової кістки на 30-ту добу експерименту в молодих щурів була достовірно меншою на 18 % ( $p < 0,001$ ), плечової кістки – на 19 % ( $p < 0,001$ ), показники ШПЕ – відповідно на 4,8 % та 4,3 %, ШДЕ на 2,1 % та 3,8 %, ШСД – на 5 % та 4,8 %. У зазначений термін спостереження відмічено менші показники МДК як стегнової, так і плечової кістки порівняно з контролем. Це свідчить про затримку лінійних показників кісток щурів із гіперглікемією. Зі зростанням терміну гіперглікемії затримка ростових показників проявлялася дедалі сильніше. Значення МДК обох кісток на 60-ту добу експерименту були достовірно менші: стегнової кістки – на 7,3 % ( $p < 0,001$ ), плечової – на 7 % порівняно з 30-ю добою, на 90-ту добу – 6,1 % ( $p < 0,001$ ) та 6 % ( $p < 0,001$ ), на 120-ту добу – 11,8 % ( $p < 0,001$ ) та 11 % ( $p < 0,001$ ), на 150-ту добу – на 4 % ( $p < 0,001$ ) та 3,8 % ( $p < 0,001$ ), на 180-ту добу – на 7,3 % ( $p < 0,001$ ) та 8 % ( $p < 0,001$ ). Зазначена тенденція до уповільнення росту кісток щурів із гіперглікемією, зберігалась до закінчення експерименту.

За даними остеометрії, лінійні показники стегнової кістки тварин зрілого віку відзначалися незначним відсотком приросту порівняно з показниками щурів молодого віку. Середній показник МДК стегнової та плечової кісток на 30-ту добу експерименту був дещо меншим за такий порівняно з показниками контролю – на 11,2 % ( $p < 0,001$ ) та 5,2 % ( $p < 0,05$ ). Зміни величин показників ШСД стегнової та плечової кісток у щурів упродовж експерименту відповідали змінам, описаним для показників довжини кісток, а саме: відсоток зміни ШСД порівняно з контролем склав 5,34 % та 4,2 % відповідно. Середні показники ШПЕ й ШДЕ стегнової кістки порівняно з контролем склали 6 % та 9,6 %, плечової кістки – 6,2 % та 8,4 %.

У подальшому відсоткове співвідношення різниці показників щурів із гіперглікемією продовжувало збільшуватися порівняно з контролем. Відтак уже наприкінці експерименту, на 180-ту, добу остеометричні показники досліджуваних кісток були значно менші порівняно з показниками контролю, що може свідчити про значні порушення метаболізму кістки за умов дії патологічного чинника. Показники МДК стегнової та плечової кістки у порівнянні з контролем були меншими – на 13 % ( $p < 0,001$ ) та 7 % ( $p < 0,05$ ). ШПЕ досліджуваних кісток була меншою за контроль на 8 % та 11 %, ШДЕ – на 8,5 % та 11 %.

На 30-ту добу спостереження в щурів старечого віку спостерігається повільна зміна остеометричних показників. Проте варто зазначити, що більш інтенсивне зростання остеометричних показників спостерігалось у тварин серії контролю. За показником максимальна довжина стегнової кістки різниця порівняно з щурами контролю склала 8,9 % та плечової – 3,3 %, ШСД - різниця показників порівняно зі щурами контролю становила 3 % та 4 %. Відповідні зміни відбулись і в зміні середніх показників ШПЕ та ШДЕ обох кісток: ширина проксимального та дистального епіфізів стегнової кістки становила 3,8 % та 3,3 %, плечової – 4,2 % та 4,7 % відповідно. Більш інтенсивно проявляється затримка лінійних показників у щурів усіх вікових груп порівняно з іншими остеометричними параметрами. У подальші періоди



спостереження затримка ростових показників продовжувала прогресувати, та вже на 180-ту добу експерименту можна підсумувати, що гіперглікемія призводить до значних змін остеометричних параметрів стегнової та плечової кісток. На цьому етапі спостереження у щурів цієї вікової групи спостерігається призупинення ростових процесів, про що свідчить сповільнення показників приросту лінійних розмірів кісток. За показником МДК стегнової кістки різниця з контролем склала 10 % та плечової – 5 %. Варто відзначити більш інтенсивний лінійний ріст МДК у контрольних щурів порівняно з експериментальними. Приріст ШСД стегнової кістки становив лише 0,6 %, плечової – на 0,5 % відповідно. Аналогічні зміни відбулись і щодо зміни середніх показників ширини проксимального та дистального епіфізів обох кісток. Приріст ШПЕ та ШДЕ стегнової кістки збільшився на 0,2 % та 1,2 %, плечової – 1 % та 1,6 %, що значно менше порівняно з показниками приросту щурів молодого та зрілого віку. Отже, у тварин із гіперглікемією з 30-ї до 180-ї доби спостерігалася затримка лінійних показників як епіфіза, так і діафіза з найбільшим проявом у щурів молодого віку.

У результаті проведеного гістологічного дослідження на 30-ту добу експерименту в щурів молодого віку було встановлено, що епіфізарний хрящ зберігав характерну структуру, а в щурів старечого віку відмічено появу гіпертрофованих клітин у проліферативних колонках, що свідчить про пригнічення процесів поділу клітин. Виразніші зміни зафіксовано в зоні вторинної спонгіози в молодих щурів, а саме значне зниження кількості трабекул, не дивлячись на їх наявність у зоні первинної спонгіози. Середня ширина кісткових трабекул стегнової кістки у тварин із гіперглікемією виявилася меншою порівняно з контролем на 1,1 %, та становила  $(57,09 \pm 0,20)$  мкм відповідно ( $p < 0,05$ ).

Відповідний показник плечової кістки був меншим на 1,5 % та відповідав значенню  $(48,05 \pm 0,36)$  мкм ( $p < 0,05$ ). Аналогічна тенденція відмічена й у двох інших вікових групах, із найменшим проявом у щурів старечого віку. Показник діаметра остеонів стегнової кістки виявився більшим

у тварин із гіперглікемією на 2,5 % та становив  $(27,83 \pm 0,55)$  мкм ( $p < 0,05$ ) та плечової кістки – на 2,6 % та відповідав показникам  $(18,86 \pm 0,40)$  мкм ( $p < 0,05$ ) відповідно. Також у тварин із гіперглікемією встановлено більший середній показник діаметра каналів остеонів порівняно з контролем –  $(9,30 \pm 0,27)$  мкм та  $(7,70 \pm 0,40)$  мкм.

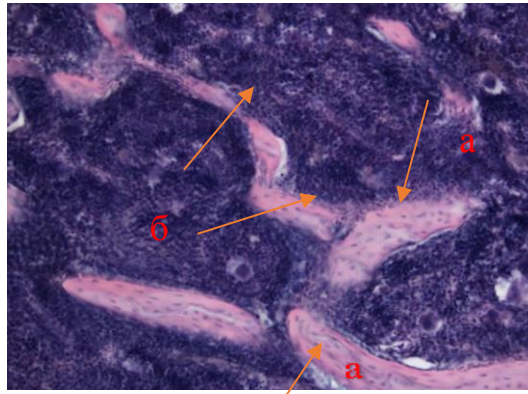


Рисунок 45 – Трабекули у зоні вторинної спонгіози стегнової кістки щурів молодого віку: нерівномірність товщина трабекул (а), відсутність зв'язку між ними (б).

Збільшення  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин

Натомість у щурів зрілого віку середній показник діаметра остеонів стегнової кістки виявився більшим у тварин із гіперглікемією, що становив  $(30,12 \pm 2,41)$  мкм та  $(21,40 \pm 1,46)$  мкм – плечової кістки, відсоток зміни склав 0,1 % та 0,8 %. Також встановлено більший показник діаметра каналів остеонів  $(11,35 \pm 1,41)$  мкм та  $(8,45 \pm 0,09)$  мкм; щурів старечого віку – діаметри остеонів стегнової кістки були  $(31,86 \pm 0,87)$  мкм, плечової –  $(28,02 \pm 0,35)$  мкм, діаметр каналів остеонів обох кісток був  $(13,72 \pm 0,45)$  мкм та  $(11,56 \pm 0,32)$  мкм. У кортексі тварин усіх вікових груп відмічено виражену зміну структури з найбільшим проявом у молодому віці, що можливо, є результатом резорбції в каналах остеонів. Установлено також зникнення зони індиферентного хряща на певних ділянках в епіфізарному хрящі, що можливо, і є причиною зниження численності кісткових трабекул, зафіксоване на наступні терміни спостереження.

На 60-ту добу експерименту було встановлено достовірні виражені структурні зміни в щурів молодого та зрілого віку. Це виражалося в порушенні зональності епіфізарного хряща та скороченні щільності кісткових трабекул.

Упродовж 90-ї доби було зафіксовано виражену резорбцію періосту кортикального шару кістки молодих щурів, що є суттєвим з точки зору виникнення переломів через втрату товщини кортексу. У щурів зрілого віку структурні порушення в кістковій тканині та епіфізарному хрящі протікали більш повільно та менш виражено.

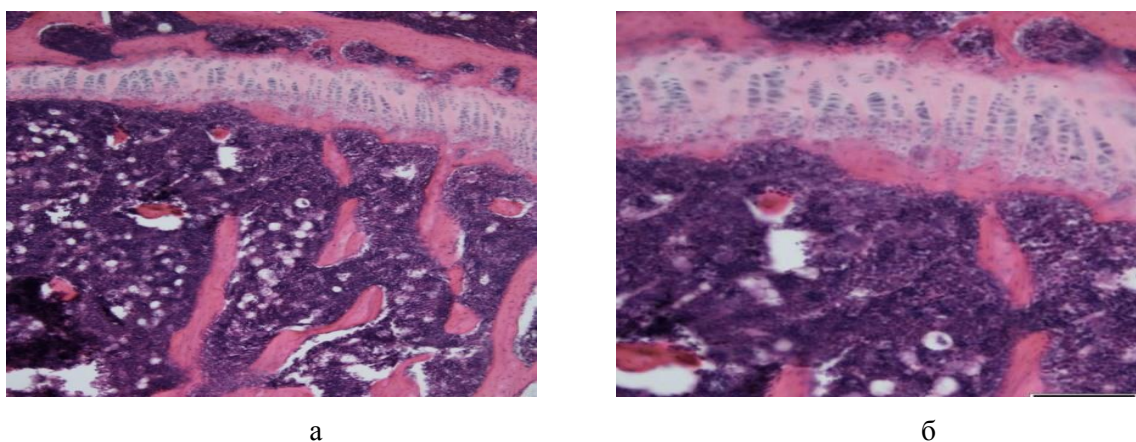


Рисунок 46 – Фрагмент дистального епіфіза стегнової кістки (а) щурів молодого віку на 60-ту добу експерименту. Епіфізарний хрящ із зоною первинної та вторинної спонгіози. Нерівномірна щільність та висота проліферативних колонок. Відсутність трабекул у зоні первинної спонгіози. Збільшення: а)  $\times 100$ ; б)  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин

Установлені зміни в щурів молодого та старечого віку свідчать, що зниження щільності кісткових трабекул, можливо, викликане порушенням механізму гіпертрофії хондроцитів та наступною неможливістю мінералізації цих ділянок.

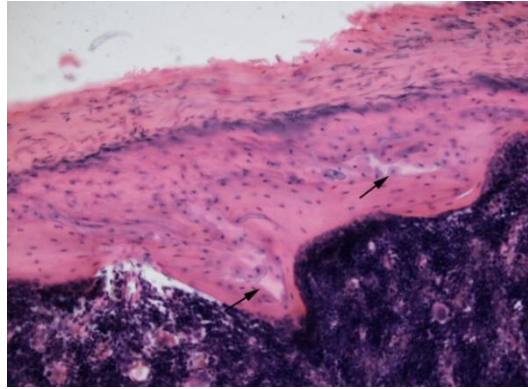


Рисунок 47 – Кортикальний шар стегнової кістки щура зрілого віку на 90-ту добу експерименту. Немінералізовані ділянки у матриці (стрілки).

Збільшення×200, збільшення гематоксилін та еозин

На 120-ту добу експерименту у щурів усіх вікових груп зафіксовані зміни в кортикальному шарі, найбільш виражені в щурів молодого та старечого віку. У молодих тварин резорбція відбувалася як із боку періосту, так і ендосту, а в щурів старечого віку – лише з боку періосту, що призводить до його стоншення та рарефікації. Середня ширина кісткових трабекул стегнової кістки щурів молодого віку у тварин із гіперглікемією виявилася меншою порівняно з контролем на 2 %. Відповідні показники ширини кісткових трабекул плечової кістки знаходились на рівні  $(50,59 \pm 0,26)$  мкм ( $p < 0,001$ ). Відносна величина площі губчастої тканини обох кісток зменшилася на 16,8 % та 17 % відповідно.

У щурів зрілого віку показник ширини кісткових трабекул стегнової кістки був також меншим порівняно з контролем на 1,4 % ( $p < 0,001$ ), плечової 1,6 % відповідно ( $p < 0,05$ ); старечого - на 1,6 % та 1,7 % менше порівняно з контролем. Крім того, виявлено скорочення кількості кісткових трабекул в зоні первинної спонгіози в щурів молодого та старечого віку, з більшим проявом у тварин старечого віку. У структурі епіфізарного хряща в щурів зрілого віку виявлено значні порушення структури у вигляді скорочення кількості проліферативних колонок на деяких ділянках.



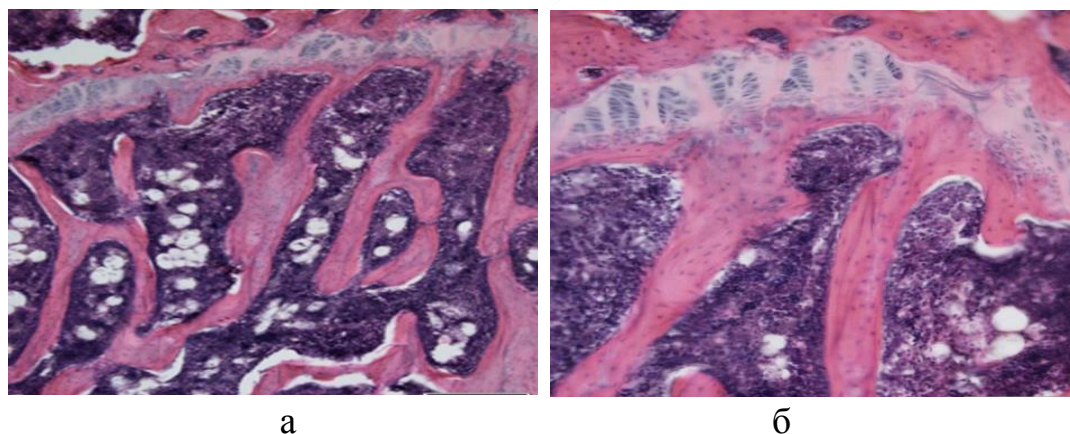


Рисунок 48 – Фрагмент епіфіза дистального відділу стегнової кістки (а), плечової кістки (б) щура молодого віку на 120-ту добу експерименту. Епіфізарний хрящ та зона первинною та вторинної спонгіози (а). Порушення орієнтації проліферативних колонок, відсутність їх на ділянках а, б. Збільшення а)  $\times 100$ ; б)  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин.

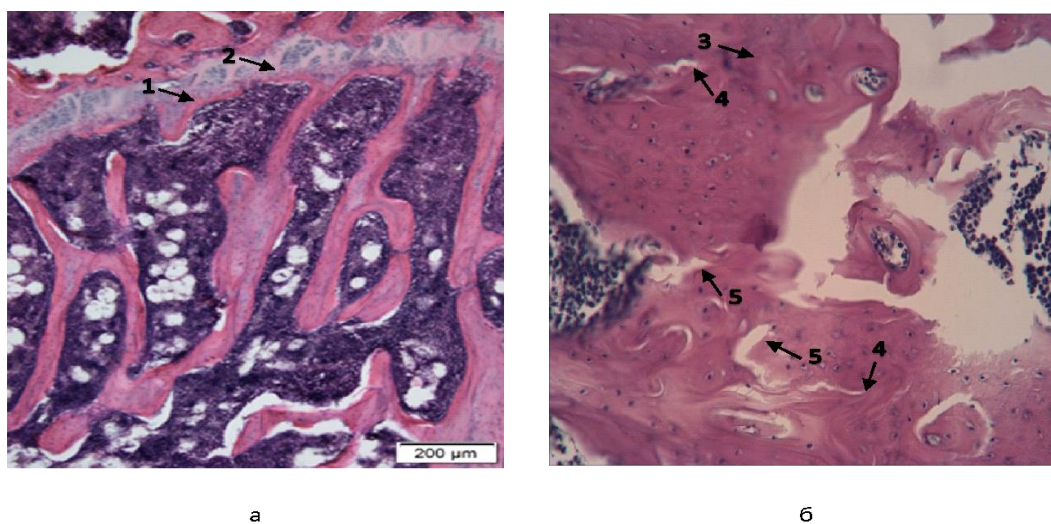


Рисунок 49 – Фрагмент дистального епіфізу стегнової кістки щура зрілого віку на 120-ту добу експерименту. Епіфізарний хрящ із зоною первинної та вторинної спонгіози (а): 1 – порушення орієнтації проліферативних колонок; 2 – відсутність проліферативних колонок в окремих ділянках. Фрагмент діафіза плечової кістки щура зрілого віку (б): 3 – зона гомогенізації; 4 – тріщини; 5 – щілини. Збільшення  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин

На 150-ту добу експерименту найбільші структурні зміни встановлено у молодих щурів, а саме: зниження кісткової маси у вигляді скорочення кількості кісткових трабекул у зоні первинної спонгіози та стоншення кортикального шару внаслідок резорбції періосту. У тварин зрілого віку також зафіксовано ділянки під епіфізарним хрящем без кісткових трабекул, проте у кортикальному шарі виявлено численні порушення. У щурів зрілого віку структурні зміни були подібними до встановлених у тварин молодого віку, однак мали менший прояв. Так відбувалася активізація резорбції кортексу, однак лише з боку періосту, тоді як у молодих тварин це встановлено ще й із боку ендосту. У щурів цього віку максимальний прояв структурні зміни мали на початку дослідження в компактній кістковій тканині та поступове скорочення чисельності кісткових трабекул в губчастій кістковій тканині.

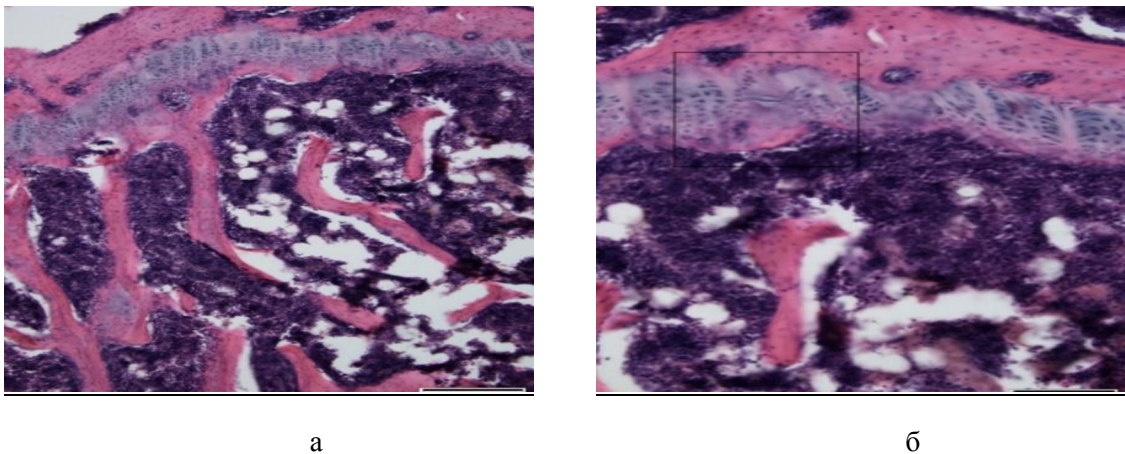


Рисунок 50 – Фрагмент діафіза дистального відділу плечової кістки щура зрілого віку на 150-ту добу експерименту. Відсутність трабекул на значних ділянках у зоні первинної спонгіози (а). Закриття зони росту (б, обведено).

Збільшення: а)  $\times 100$ ; б)  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин

На 180-ту добу експериментально встановлено, що виразніші порушення структури мали місце в старечому віці порівняно з молодими. Так само, як і в попередні терміни спостереження, зафіксовано припинення утворення кісткових трабекул, ймовірно внаслідок загибелі клітин та стоншення кортексу. Про переважання процесів резорбції над синтезом у

щурів молодого віку в обох кістах свідчить зменшення об'єму загальної спонгіози в стегновій кістці на 29,3 % ( $p < 0,001$ ), у плечовій кістці – на 30,3 % ( $p < 0,001$ ) за рахунок стоншення кісткових трабекул. Ширина кісткових трабекул стегнової кістки була достовірно меншою порівняно з контролем на 4,9 %, плечової – 5,4 %. Відносна площа губчастої тканини стегнової кістки зменшилася до  $(19,90 \pm 0,41)$  % ( $p < 0,001$ ), плечової – до  $(16,55 \pm 0,24)$  % ( $p < 0,01$ ), що достовірно менше за показники контрольних щурів, в щурів зрілого віку значення епіфіза вказують на значне порушення будови трабекулярної речовини кістки. Ширина кісткових трабекул стегнової кістки відповідала значенню  $(66,54 \pm 0,78)$  мкм ( $p < 0,001$ ), плечової кістки –  $(57,24 \pm 3,03)$  мкм ( $p < 0,05$ ), різниця показників склала 2 % в обох кістках, показники об'єму загальної спонгіози стегнової кістки знизилися до  $(24,37 \pm 0,40)$  % ( $p < 0,05$ ), плечової – до  $(24,73 \pm 0,46)$  % ( $p < 0,05$ ) відповідно; у щурів старечого віку ширина кісткових трабекул стегнової кістки була  $(64,93 \pm 0,39)$  мкм ( $p < 0,001$ ), плечової –  $(55,67 \pm 0,25)$  мкм ( $p < 0,001$ ), що на 2,1 % та 2,5 % відсотка менше порівняно з контролем. У щурів старечого віку можна відзначити зниження щільності клітин у проліферативних колонках та порушення їх структурної орієнтації.

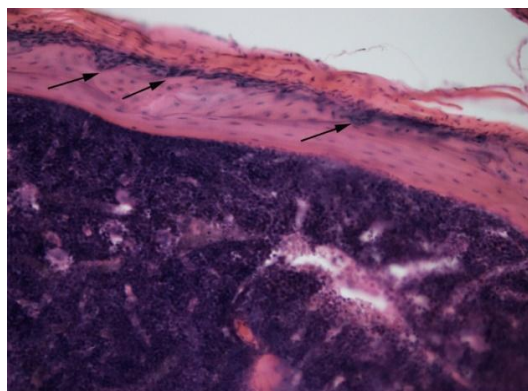


Рисунок 51 – Кортикальний шар стегнової кістки щура старечого віку на 180-ту добу експерименту. Резорбція періосту (стрілки). Збільшення  $\times 200$ , забарвлення гематоксилін та еозин

Відомо, що інсулін сприяє проліферації хондроцитів, диференціації та формуванню ними хрящового матриксу [86]. Установлене поступове зниження кількості кісткових трабекул губчастої кістки, що, можливо, є результатом зниження рівня інсуліну та реакції хондроцитів на це. Також установлене повільне стоншення кортикального шару протягом усього дослідження, внаслідок резорбції періосту кортикального шару. Максимальний прояв структурні зміни мали на кінець дослідження (180 діб).

Таким чином, у результаті гістологічного аналізу встановлено, що гіперглікемія спричинює зміни як у кортикальній, так і в трабекулярній кістковій тканинах у всі терміни спостереження. Найвиразніші структурні зміни зафіксовано в молодих тварин, починаючи з 30-ї доби спостереження і до 180-ї доби включно. Відтак структурні зміни виявлено в діафізах, обох кісток можна відмітити наявність численних ліній склеювання та порожнини остеокластичної резорбції, що вказує на затримку періостального кісткоутворення. Численні порожні остеоцитарні лакуни, тріщини та щілини, що присутні в цій зоні свідчать про загибель остеоцитів шляхом апоптозу. Протягом експерименту також було виявлено пригнічення росту кістки, про що свідчить значне скорочення чисельності кісткових трабекул під епіфізарним хрящем. Це відбувалося, ймовірно, внаслідок пригнічення процесу гіпертрофії хондроцитів що спричинює припинення мінералізації епіфізарного хряща, затримує проростання судин та порушує формування первинних кісткових трабекул. Так, установлено зникнення зони індіферентного хряща на певних ділянках в епіфізарному хрящі щурів молодого та зрілого віку на 30-ту добу експерименту. Крім того відзначалось пригніченням гіпертрофії хондроцитів в результаті чого спостерігалось пригнічення формування кісткової тканини та її мінералізації, це може бути реакцією остобластів на зниження рівня глюкози. У дослідженні загоєння перелому у щурів з індукованим діабетом виявлене зниження експресії колагену X-типу, що свідчить про затримку дозрівання та гіпертрофії



хондроцитів [87-89], можливо, це підтверджує гіпотезу про механізм пригнічення формування кісткової тканини в щурів молодого та зрілого віку.

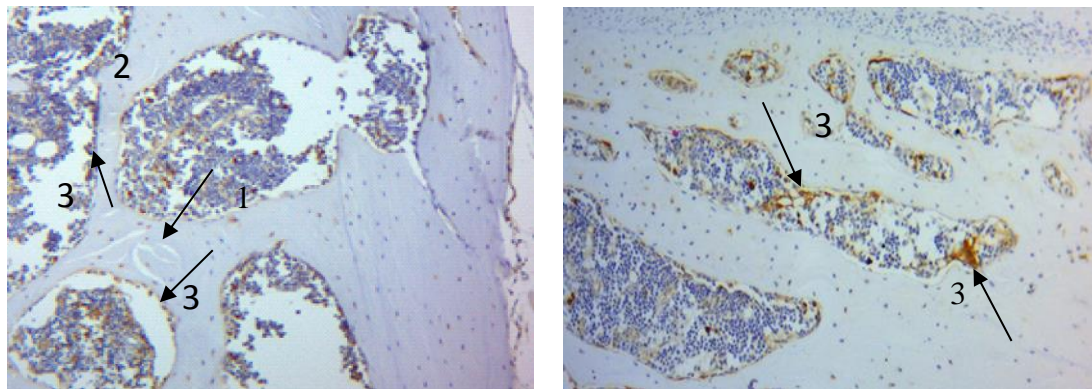
Виявлена в усіх вікових групах резорбція кортексу пояснюється посиленням остеокластогенезу, яке виникає при гіперглікемії, внаслідок зниження рівня інсуліну.

Відомо, що інсулін сприяє формуванню кісткової тканини шляхом посилення проліферації остеобластів та зниження частоти їх апоптоза, в свою чергу, підвищення рівня глюкози може порушувати процес мінералізації шляхом дії на остеобласти, внаслідок пригнічення їх проліферації а також зниженням активності лужної фосфатази [90-92]. Крім того, у щурів молодого віку зафіксовано підвищення кількості жовтого кісткового мозку у міжтрабекулярних просторах, що свідчить про зниження кількості мезенхімальних клітин, та вірогідну їх диференціацію замість остеобластів в адипоцити. Виявлене поступове стоншення кортикального шару, особливо у щурів старечого віку є суттєвим з огляду на те, що клінічно встановлено зростання ризику перелому шийки стегнової кістки у індивідів з цукровим діабетом I типу. Тобто посилена резорбція кортикального шару може спричиняти підвищення ризику переломів, особливо у людей похилого віку.

Таким чином хронічна гіперглікемія викликає пригнічення формування губчастої кісткової тканини стегнової та плечової кісток та стоншення кортексу, внаслідок резорбції, особливо в щурів молодого віку, що може бути причиною формування низького піку кісткової маси та підвищувати ризик виникнення остеопорозу та переломів у майбутньому. У даному контексті можна погодитися з думкою J. Starup-Linde, який вважає, що оцінка трабекулярного компартменту кісток може стати одним із найбільш цінних предикторів переломів у пацієнтів із ЦД, адже за нашими даними порушення в трабекулярній тканині, зокрема довгих трубчастих кісток, з'являються раніше і мають більший ступінь вираженості, порівняно з порушеннями в мікроархітектурі кортикальної тканини [93, 94].

У процесі імуногістохімічного аналізу ми спостерігали високий рівень експресії остеопонтину як в діяфізі, так і в епіфізах досліджуваних кісток у щурів молодого віку. У подальшому інтенсивність прояву лише зменшувалась у щурів зрілого віку, та найменший прояв був у щурів старечого віку. Показники експресії RANKL навпаки – найменший показник прояву спостерігався в щурів молодого віку з подальшим посиленням у щурів зрілого та старечого віку.

Проаналізувавши остеокластичну та остеобластичну активність в трьох вікових групах щурів можна зробити висновок, що підвищена кісткова резорбція спостерігається здебільшого в щурів старечого віку, найменш виражена експресія притаманна щурам молодого віку. Визначено, що в умовах індукованої гіперглікемії в щурів різних вікових груп експресія остеопонтину та RANKL відмічається як у діяфізі, так і в епіфізі трубчастих кісток, проте з різною інтенсивністю і з переважанням у трабекулярній кістковій тканині.



а

б

Рисунок 52 – Позитивна експресія остеопонтину (а) та RANKL (б) стегнової кістки щура молодого віку на 90-ту добу експерименту, ІГХ з гематоксиліном Майєра: 1 – тріщини КТ; 2 – наявність кісткової резорбції; 3 – експресовані клітини. Збільшення×400

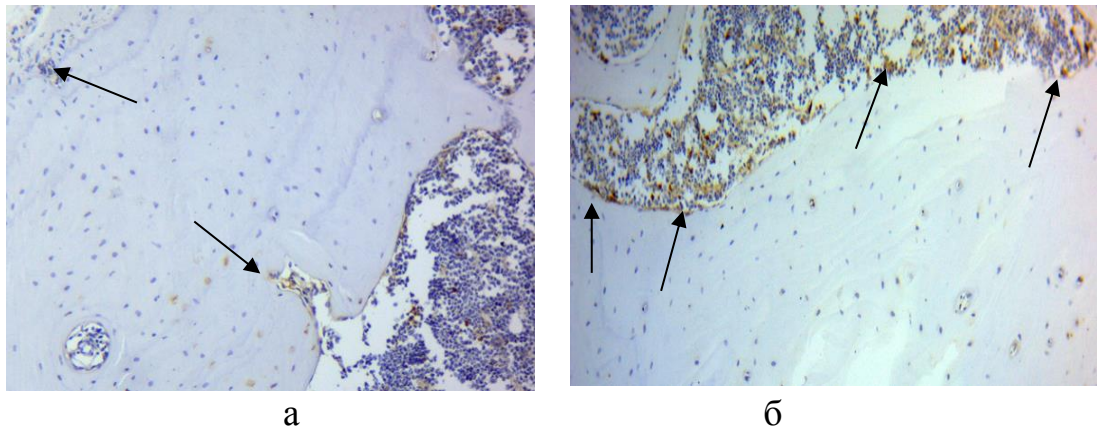


Рисунок 53 – Позитивна експресія остеопонтину (а) та RANKL (б) у щурів на 180-ту добу експерименту, ІГХ з гематоксиліном Майєра. Збільшення×200

Різні механізми впливають на процеси ремоделювання кісткової тканини. До них можна віднести фактори росту і гормони (ПТГ, естрогени, ГК), здатні стимулювати чи пригнічувати експресію RANKL і тим самим активувати або пригнічувати кістковий метаболізм [95; 81; 96]. Підвищена кісткова резорбція та зниження формування КТ у щурів старечого віку може бути спричинено дефіцитом естрогенів та порушенням експресії ПТГ та ГК. Адже ці гормони мають значний вплив на процеси ремоделювання кістки. За дефіциту остеопонтину в щурів молодого та зрілого віку спостерігали сповільнення утворення КТ та прискорення втрати кісткової маси.

Ультрамікроскопія виявила структурні зміни на 30-ту добу експерименту в клітинах кісткової тканини молодих щурів. Однак виявлені двоядерні остеобласти, можливо, вказують на адаптаційну реакцію клітин у відповідь на дію підвищеного рівня глюкози. Було встановлено, що гіперглікемія спричинює більш виражені структурні зміни в остеобластах, пригнічення клітин КТ, їх диференціацію та порушення мінералізації кісткового матриксу.

Відомо, що остеобласти мають інсулін – специфічні рецептори, через це інсулін безпосередньо впливає на їх функціонування – диференціацію, синтез колагену та ін. [102, 97, 98]. Згідно з недавніми дослідженнями одним із

важливих факторів впливу на клітини кісткової тканини за умов гіперглікемії є склеростин, який секретується остеоцитами та пригнічує диференціацію остеобластів. Експериментально на щурах встановлено, що підвищення рівня глюкози стимулює експресію склеростину в остеоцитах [99-101]. Клінічно спостерігається підвищення рівня склеростину лише в молодих пацієнтів, а в старих цього не виявлено [102, 103], що може свідчити про порушення функціонування остеобластів.

У проведеному нами дослідженні було виявлено виражену реакцію остеобластів у молодих щурів на 60-ту добу експерименту у вигляді значної гіпертрофії гЕПС, деструкції органел у цитоплазмі та набухання мітохондрій.

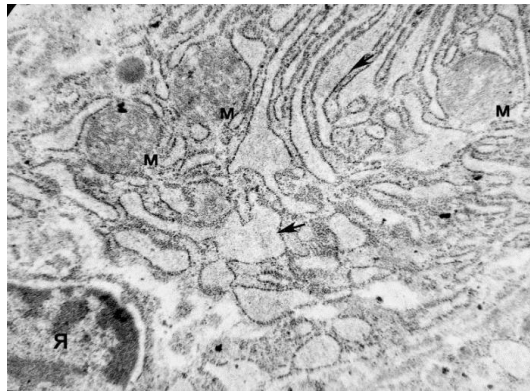


Рисунок 54 – Фрагмент остеобласта з дуже розвиненою гЕПС (стрілка), набухлими мітохондріями (м) та гетерохромним ядром. Щури молодого віку на 60-ту добу експерименту. Збільшення×20400, контрастування за

Рейнольдсом

Водночас компенсаторна реакція у вигляді гіпертрофії гЕПС спостерігалася в щурів зрілого та старечого віку вже на 30-ту добу експерименту, а в молодих пізніше – на 60-ту добу. Особливістю є те, що на всі терміни спостереження в щурів молодого та зрілого віку гіперфункція остеобластів проявлялася у вигляді гіпертрофії гЕПС, а в щурів старечого віку – зміною структури ядра – появою ядерець та зміною форми ядра для збільшення периметру ядерної мембрани. Також у щурів зрілого віку на 60-ту

добу встановлено формування залишкових тілець, що також є ознакою компенсаторної реакції.

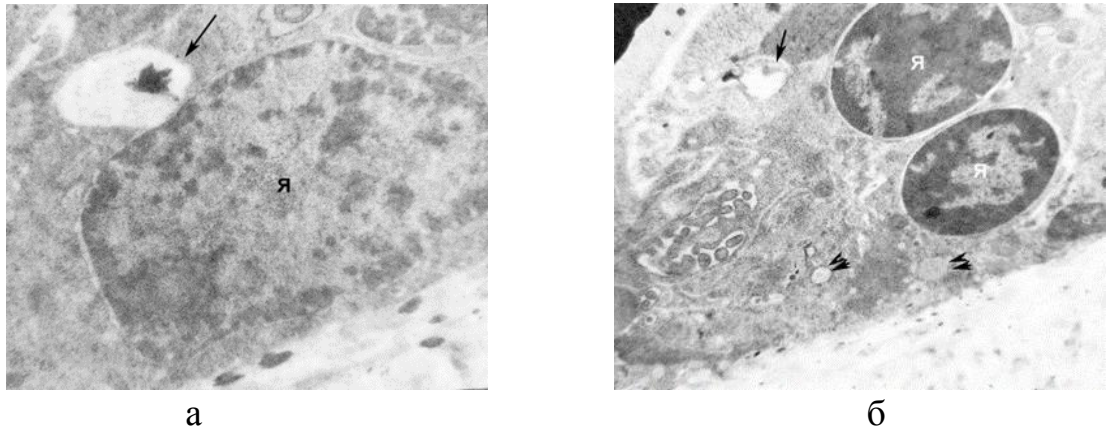


Рисунок 55 – Остеобласт із великим гетерохромним ядром (Я) та залишковим тільцем (стрілка). Збільшення $\times 15600$  (а). Остеобласт із двома овальними ядрами (Я), деструктивною порожниною (стрілка) та мітохондріями з гомогенізованим умістом (дві стрілки) у щурів зрілого віку на 60-ту добу експерименту. Збільшення $\times 8000$  (б), контрастування за Рейнольдсом

В експериментальному дослідженні доведено, що за умов дії гіперглікемії відбувається скорочення кількості остеоцитів вже на 30-ту добу експерименту. Крім того, встановлено, що лакуни остеоцитів втрачають округлу форму вже через 30 діб після початку моделювання діабету. Нами також встановлено загибель остеоцитів у щурів усіх вікових груп, починаючи з 30-ї доби дослідження в молодих тварин і активним прогресуванням аж до 180-ї доби в усіх вікових групах. Крім того, виявлено зміну форми лакун у щурів старечого віку на 60-ту, 90-ту та 150-ту добу експерименту.

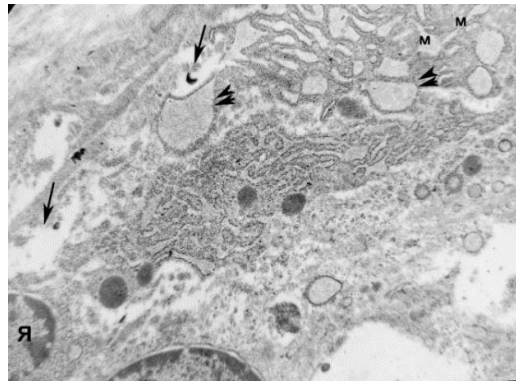


Рисунок 56 – Фрагмент остеобласта з деструктивними порожнинами (стрілка), розширеними цистернами гЕПС (дві стрілки) та набухлими мітохондріями (м). Щури старечого віку на 180-ту добу спостереження.

Збільшення  $\times 10000$ , контрастування за Рейнольдсом

Таким чином, за умов гіперглікемії вже на 30-ту добу експерименту виникає порушення остеобластів та деструктивні зміни в остеоцитах у молодих щурів, а на 60-ту добу – в щурів зрілого та старечого віку в усіх вікових групах у остеобластах виявлено компенсаторну реакцію у вигляді гіпертрофії гЕПС, однак утворення деструктивних порожнин у цитоплазмі на 60-ту добу експерименту свідчить про розвиток деструктивних змін.

З віком відбувається зміна рівня мінералізації кісткової тканини, цей процес є наслідком зміни вмісту органічних речовин та вологи в кістках скелета [104-107]. Аналізуючи хімічний склад кісток щурів серії контролю усіх вікових категорій, було встановлено, що концентрація макро- та мікроелементів мала чітку тенденцію до накопичення в щурів молодого віку, повільне та поступове зменшення у тварин зрілого віку і досить активне виведення хімічних елементів у щурів старечого віку. Кількісне співвідношення вмісту Са в діяфізі стегнової кістки щурів зрілого віку на 30-ту добу спостереження становило  $(2676,30 \pm 0,19)$  мкг/г ( $p < 0,05$ ), на 180-ту добу цей показник дещо знизився – до  $(2507,32 \pm 0,63)$  мкг/г ( $p < 0,001$ ). Загальний показник зменшення вмісту Са в діяфізі стегнової кістки становив 6,7%. Кількісні показники вказаного елемента в діяфізі плечової кістки становили  $(2445,26 \pm 0,17)$  мкг/г на початку експерименту та

(2284,34 ± 0,68) мкг/г – ш у кінці, відсоток зміни склав 7 %. Аналогічні показники можна відмітити й у зміні відсоткового вмісту Р у діафізах досліджуваних кісток: стегнова кістка – (869,40 ± 5,88) мкг/г на початку експерименту та (829,32 ± 10,94) мкг/г – у кінці, плечова кістка – (796,18 ± 3,85) мкг/г та (760,58 ± 6,55) мкг/г, відсоток зміни в обох досліджуваних кістках склав 5 %. Дещо вищий відсоток зміни відзначається у епіфізах досліджуваних кісток, а саме: вміст Са у стегновій кістці зменшився на 8,6 %, плечовій – на 8,8 %, вміст Р – на 6 % в обох досліджуваних кістках. Проте в щурів старечого віку спостерігається більш інтенсивне виведення досліджуваних елементів, а саме: Са в діафізах зменшився на 8,4 % та 9 %, Р – на 3 % та 3,1 %, в епіфізах цей показник був значно вищим: Са – 9,3 % та 10 %, Р – 4 % в обох кістках. У віковому аспекті була відмічена також різниця вмісту мікроелементів Cu та Zn, найбільший відсоток втрати яких спостерігається також у щурів старечого віку: Cu у діафізах – на 1,7 % та 1,8 %, в епіфізах на 2,4 та 2,6 %; Zn у діафізах обох кісток – на 1 %, в епіфізах – 1,6 % та 1,7 % відповідно. Таким чином, при дослідженні макро- та мікроелементів у щурів серії контолю в діафізах обох кісток було визначено поступове зниження вмісту хімічних елементів зі збільшенням терміну дії гіперглікемії в усіх вікових групах, із найбільшим проявом у щурів старечого віку. Вивчення хімічного складу кісток показало певні відмінності перерозподілу води в різних частинах трубчастої кістки. Відзначалася значна втрата води у кістках із віком у щурів зрілого та старечого віку. Відсоток втрати води в діафізах обох кісток щурів зрілого віку становить 7 %, в епіфізах – 8,2 %. У щурів старечого віку показник зміни в діафізі стегнової кістки становив 7,2 % та 6,6 %, в епіфізі цей показник знизився на 9 % та 9,3 % відповідно. У підсумку необхідно відзначити, що вищезазначені явища посилюються зі збільшенням терміну спостереження в усіх вікових групах.

У кістках щурів молодого віку на 30-ту добу експерименту спостерігається зменшення мінеральної насиченості. Показники вмісту Са в діафізі стегнової та плечової кісток виявилися дещо меншими у тварин



експериментальної серії порівняно з контролем на 2,3 % ( $p < 0,001$ ) та 2,5 % ( $p < 0,001$ ), P – на 0,3 % ( $p < 0,001$ ) між всіма показниками. Відповідні зміни показників можна спостерігати й у різниці Cu та Zn в обох кістках: Cu зменшився в діафізах на 5,9 % та 6,6 %, в епіфізах – на 5,6 % та 6,1 %, Zn – на 0,7 %, 0,6 % та 0,4 %, 0,5 % відповідно. Рівень Ca та P прогресивно знижувався протягом всього експерименту на 60-ту добу: Ca в діафізі – на 6,1 % ( $p < 0,001$ ) і 5,8 % ( $p < 0,001$ ) та в епіфізі – на 6,5 % ( $p < 0,001$ ) і 6,7 % ( $p < 0,001$ ); P – 2,5 % ( $p < 0,001$ ) і 2,6 % ( $p < 0,001$ ) та 5 % ( $p < 0,001$ ) і 5,6 % ( $p < 0,001$ ) відповідно. Уміст мікроелементів змінювався подібно до вищезазначених. Показники зміни Cu та Zn зменшилися: Cu – на 7,6 % ( $p < 0,001$ ) і 8,5 % ( $p < 0,001$ ) та 7,4 % ( $p < 0,001$ ) і 8,1 % ( $p < 0,001$ ); Zn – на 1,6 % в діафізах обох кісток та 1,1 % і 1,2 % – в епіфізах досліджуваних кісток. Проте вже на 180-ту добу показники значно відрізнялися порівняно з контролем: вміст Ca в діафізі обох кісток знизився – на 36,8 %, у дистальному епіфізі – на 44,2 % та 45,3 % відповідно. Зміна рівня P в діафізах обох кісток становила 19 % та 19,4 %, в епіфізах – 25,7 % і 24,8 %. Відсоткове співвідношення Zn у досліджуваних кістках достовірністю показників не відзначалося.

У щурів зрілого віку на 30-ту добу експерименту показники вмісту макроелементів у діафізі як стегнової, так і плечової кісток виявилися значно меншими у тварин експериментальної серії порівняно з контролем. Вміст Ca був меншим порівняно з контролем на 4,1 % ( $p < 0,05$ ) та 4 % ( $p < 0,05$ ), P – 2,1 % ( $p < 0,001$ ) та 3,6 % ( $p < 0,001$ ). Середні показники вмісту основних макроелементів в епіфізах обох кісток становили: Ca – 3,7 % ( $p < 0,05$ ) та 4,5 % ( $p < 0,05$ ), P – 15,8 % ( $p < 0,001$ ) та 20 % ( $p < 0,001$ ) відповідно. У тварин цієї групи спостерігається зменшення вологи у кістках порівняно зі щурами молодого віку. Вміст мікроелементів у діафізі та епіфізі обох кісток відповідав таким показникам: Zn у стегновій кістці становив  $(6,94 \pm 0,33)$  мкг/г, у плечовій –  $(6,19 \pm 0,33)$  мкг/г, Cu –  $(55,28 \pm 0,20)$  мкг/г ( $p < 0,001$ ),  $(52,16 \pm 0,46)$  мкг/г ( $p < 0,001$ ), відмінність показників становила 2 % ( $p < 0,001$ ) та 3,1 % ( $p < 0,001$ ), в епіфізі стегнової кістки Cu становив



(54,87 ± 1,13) мкг/г ( $p < 0,001$ ), плечової – (53,41 ± 0,88) мкг/г ( $p < 0,001$ ), різниця порівняно з контролем 6,1 % ( $p < 0,001$ ) та 6 % ( $p < 0,001$ ), Zn – (7,68 ± 0,28) мкг/г та (6,92 ± 0,36) мкг/г. На 180-ту добу експерименту загальний показник зміни склав: Ca – 15,3 % ( $p < 0,001$ ) та 15 % ( $p < 0,001$ ), P – 8,3 % ( $p < 0,001$ ) та 8 % ( $p < 0,001$ ) відповідно. У дистальному епіфізі загальний відсоток зміни Ca – 17 % ( $p < 0,001$ ) в обох досліджуваних кістках, P – 10,3 % ( $p < 0,001$ ) та 10,5 % ( $p < 0,001$ ). Вміст Cu знизився на 7 % ( $p < 0,001$ ) в обох кістках, Zn – на 3,5 % та 3,3%, H<sub>2</sub>O – на 14% ( $p < 0,001$ ) у обох кістках.

Уміст мінеральних речовин у кістках має виражену вікову залежність та відрізняється залежно від типу кісткової тканини [108; 109]. Відтак більший рівень мінералізації характерний для діафіза, який має пластинчасту компактну будову і дещо менший рівень мінералізації, спостерігається в епіфізах досліджуваних кісток. У щурів старечого віку показник зміни Ca у діафізах досліджуваних кісток становив 4,5 % та 7,3 %, P – 2 % та 0,3 %, в епіфізах обох кісток Ca в сегновій кістці – 9,2 % ( $p < 0,001$ ), у плечовій кістці – 5,3 % ( $p < 0,05$ ), P – 2,9 % ( $p < 0,001$ ) та 3,1 % ( $p < 0,05$ ). У тварин старечого віку спостерігається зменшення вмісту води в кістках. Показник втрати води в діафізах досліджуваних кісток становив 7,2 % ( $p < 0,001$ ) та 4 % ( $p < 0,001$ ), епіфізах 3,1 % ( $p < 0,001$ ) та 8 % ( $p < 0,05$ ). Зі збільшенням терміну гіперглікемії вміст макроелементів у кістках продовжував активно знижуватися та на 180-ту добу загальний відсоток зміни показників у діафізі становив: Ca – 10 % ( $p < 0,001$ ), P – 5,3 % ( $p < 0,001$ ). Аналогічні показники зміни вмісту основних макроелементів в епіфізах цих кісток становили: Ca 15 % ( $p < 0,001$ ) та 11 % ( $p < 0,001$ ), P – 7,3 % ( $p < 0,001$ ) в обох досліджуваних кістках. Втрата вологи в діафізах становила 12,1 % ( $p < 0,001$ ) та 9 % ( $p < 0,001$ ), у епіфізах – 9 % ( $p < 0,001$ ) та 15,6 % ( $p < 0,001$ ). Зміна вмісту мікроелементів у діафізах та епіфізах відповідає таким показникам: Cu у діафізі стегнової кістки знизився на 3 % ( $p < 0,05$ ), плечової кістки – 2,7 % ( $p < 0,05$ ), Zn – на 4,7 % та 4,3 %, в епіфізах Cu знизився на – 4,4 % ( $p < 0,001$ ) в

обох кістках, Zn – на 4,3 % та 7 %, що є значно менше за показники щурів молодого та зрілого віку.

Дані, які ми одержали, підтверджують факт впливу віку щурів на вміст мінеральних речовин у кістках. Водночас значний вплив на рівень вказаних показників у щурів експериментальної серії має гіперглікемія та термін її дії на кісткову тканину, сила дії якої значно перевищує віковий фактор.

Оскільки механічні властивості кісток визначаються сукупністю взаємоз'язаних факторів співвідношенням трабекулярного і кортикального компартментів [82; 110-112], структурних особливостей діафіза, то за умов гіперглікемії дослідження цих факторів має істотне значення [113; 114].

Механічні властивості досліджуваних кісток щурів молодого віку в динаміці експерименту змінювалися наступним чином. Починаючи з 30 до 180 доби експерименту тривкість діафіза стегнової кістки за показником навантаження при стисненні, у тварин експериментальної серії зменшилася на 18 % ( $p < 0,001$ ) в обох кістках. Водночас середня величина зазначеного показника дистального епіфізу знизилась на 23 % ( $p < 0,001$ ) та 24 % ( $p < 0,001$ ). Аналогічні показники діафіза щурів зрілого віку знизилися на 11 % ( $p < 0,001$ ) та 18 % ( $p < 0,001$ ), дистального епіфіза – на 15 % ( $p < 0,001$ ), та 16 % ( $p < 0,001$ ); у щурів старечого віку – на 13 % ( $p < 0,001$ ), 14 % ( $p < 0,001$ ) та дистального епіфізу – на 14 % ( $p < 0,001$ ), 16 % ( $p < 0,001$ ) відповідно. Різниця між середніми значеннями показника межі міцності при стисненні діафіза стегнової кістки в щурів молодого віку становила 29 % ( $p < 0,001$ ), плечової кістки – 25 % ( $p < 0,001$ ), у щурів зрілого віку відсоток зміни склав 11 % ( $p < 0,001$ ) та 10 % ( $p < 0,001$ ), у щурів старечого віку цей показник становив 8,6 % ( $p < 0,001$ ) у обох досліджуваних кістках. Аналогічні зміни відбувались і в епіфізах досліджуваних кісток упродовж усього експерименту. Межа міцності на стиснення дистального епіфіза стегнової кістки щурів молодого віку знизилася на 32 % ( $p < 0,001$ ), плечової кістки – на 35 % ( $p < 0,001$ ), у щурів зрілого віку – на 6,2 % ( $p < 0,001$ ) та 8 % ( $p < 0,001$ ), у щурів старечого віку – на 10 % ( $p < 0,001$ ) та 11,4 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

Під час дослідження механічних властивостей стегнових та плечових кісток щурів молодого віку спостерігається значне зменшення міцнісних властивостей. У щурів зрілого та старечого віку спостерігається поступове, повільне зниження показників мінеральної насиченості досліджуваних кісток на тлі зменшення мінеральної насиченості кісткової тканини. Достовірно зниження показників мінеральної щільності кісткової тканини у цей період спостерігається як у кортикальній, так і в трабекулярній кістці. Зазначеним змінам механічних характеристик відповідає поступове зниження процесу мінералізації кісток.

Таким чином, проведені дослідження доводять, що хронічна гіперглікемія спричинює затримку росту, формування, мінеральної насиченості та зниження механічних якостей довгих трубчастих кісток. Найбільш уразливий до збільшення глюкози скелет лабораторних щурів молодого віку. Можливо, що кістки цієї вікової групи перебувають в стані росту та розвитку.

## **2.6 Морфологічна характеристика щитоподібної залози під час експериментальної дегідратації організму**

Під час дослідження оранометричних показників ЩЗ за умов дегідратаційного порушення організму тварин спостерігається певна залежність від типу зневоднення, але не всі показники реагували однаково. На третю добу загального зневоднення спостерігається збільшення абсолютної маси (АМ) ЩЗ на 12,78% ( $p = 0,0002$ ), на шосту добу – на 22,51% ( $p = 0,000002$ ), а при досягненні важкого ступеня зневоднення відхилення від інтактної групи тварин становить більше 41,65% ( $p < 0,00001$ ). У групі тварин, що зазнали впливу клітинної дегідратації, тенденція до збільшення ваги згасає і спостерігається на 10 добу зневоднення підвищення зазначеного показника лише на 7,30% ( $p = 0,0098$ ); при середньому ступені – на 11,90% ( $p = 0,415$ ), а на 30 добу збільшення маси відбувається на 8,09% ( $p = 0,578$ ). За впливу позаклітинного зневоднення спостерігається активна схильність до

зменшення АМ ЩЗ відносно інтактної групи тварин і вже на 30 добу, показник стає меншим на 4,94 % ( $p=0,0396$ ), за досягнення середнього ступеня зневоднення – на 16,39 % ( $p<0,0001$ ), на 90 добу вага зменшується на 20,25 % ( $p<0,0001$ ).

Максимальне збільшення, а саме на 70,97 % ( $p<0,0001$ ), відносної маси правої частки (ВМ ПЧ) ЩЗ, спостерігається за умов загального зневоднення тяжкого ступеня. При клітинному зневодненні інтенсивність до підвищення згасає, водночас при моделюванні позаклітинної дегідратації, спостерігається незначне збільшення зазначеного показника, зокрема, за умов легкого ступеня зневоднення на 4,84 % ( $p = 0,0495$ ), тяжкого – на 11,11 % ( $p = 0,0006$ ). Лінійні показники синхронно зменшуються або збільшуються разом із масою. Максимальне збільшення довжини ПЧ ЩЗ, ширини ПЧ ЩЗ, товщини ПЧ ЩЗ спостерігається за умов загального зневоднення тяжкого ступеня, і це, відповідно, більше за групу інтактних тварин на 12,47 % ( $p < 0,0001$ ); 14,72 % ( $p < 0,0001$ ); 12,30 % ( $p < 0,0001$ ). Повільніше відбувається збільшення зазначених показників за умов клітинного зневоднення, а при моделюванні позаклітинного зневоднення спостерігається тенденція до зниження лінійних значень довжини, ширини та товщини, що максимально зменшуються при тяжкому ступені дегідратації, а саме на 4,93 % ( $p = 0,0265$ ); 6,58 % ( $p = 0,0089$ ); 12,59 % ( $p = 0,0002$ ), відповідно. Об'єм набуває максимально більшого значення за умов загального зневоднення тяжкого ступеня, і це на 45,04 % ( $p < 0,0001$ ) більше. Максимальне зменшення об'єму, а саме на 23,21 % ( $p < 0,0001$ ), спостерігається при позаклітинній дегідратації тяжкого ступеня.

Використання двофакторного дисперсійного аналізу для вивчення впливу типу дегідратації та її ступенів на вагово-лінійні показники продемонструвало, що вплив першого фактора здебільшого був більш значний. Яскравим прикладом впливу типу зневоднення є показники АМ ЩЗ та АМ ПЧ ЩЗ, що становлять 72,43 % та 71,54 %. Відповідно, дія ступеня зневоднення дорівнює 8,12 % та 9,28 %, водночас взаємодія факторів

зазначених показників становить 19,45 % та 19,18 %. Аналогічну картину демонструє показник об'єму, де вплив типу зневоднення становить 70,07 %, другу позицію займає вплив взаємодії факторів, і це становить 22,63 %, та тільки на 7,30 % впливає на зміни ступень дегідратації.

Результати морфометричних досліджень найбільше відрізняються від групи інтактних щурів за умов позаклітинного зневоднення. Під час перебування щурів на повністю безводній дієті протягом трьох діб площа фолікулів стає більшою на 11,25 % ( $p = 0,016$ ). Досягнувши середнього ступеня дисгідрії, розмір структурної одиниці збільшується на 20,32 % ( $p = 0,00076$ ), майже такий результат встановлено за умов клітинної дегідратації легкого ступеня, де площа фолікулів збільшилася на 21,33 % ( $p = 0,000145$ ). Тяжкий ступінь загального зневоднення демонструє збільшення цього показника на 34,94 % ( $p = 0,000021$ ), фолікули стали більшими за групу інтактних тварин на 38,24 % ( $p = 0,000001$ ). Максимального значення набули показники площі фолікулів ЩЗ за умов позаклітинної дегідратації важкого ступеня, що більше за контроль у два рази, а за умов середнього ступеня – збільшились у 1,5 рази.

Відмічається досить значне накопичення колоїду, внаслідок прояву гіпофункції, що також підкреслюється результатами гістологічного дослідження. Максимального значення площа колоїду набула за умов позаклітинного зневоднення важкого ступеня та збільшилася майже в три рази порівняно з контролем, більше ніж у два рази – при середньому ступені, та при легкому ступені – на 62,99 % ( $p < 0,0001$ ). Останній показник дуже схожий на результат площі колоїду за умов важкого ступеня клітинної дегідратації – збільшення на 69,44 % ( $p < 0,0001$ ). Вплив загальної дегідратації легкого ступеня на досліджуваний показник не такий значний, відповідно накопичення колоїду збільшується на 4,91 % ( $p = 0,2769$ ). Це можна пояснити тим, що починають діяти компенсаторні реакції, відповідно, за таких умов збільшується висота тироцитів, що активує функціональні властивості залози. Найбільша різниця висоти тироцитів від контрольних значень спостерігається

за умов позаклітинної дегідратації, зокрема на 30, 60, 90 добу відбувається відповідне зменшення на 11,28 % ( $p = 0,01167$ ); 19,15 % ( $p < 0,0001$ ); 24,77 % ( $p < 0,0001$ ). Клітинне зневоднення призводить до зниження висоти фолікулярних клітин на 5,46 % ( $p = 0,1241$ ); 12,58 % ( $p = 0,011$ ); 14,92 % ( $p = 0,0022$ ) за умов легкого, середнього та важкого ступенів зневоднення, відповідно. Таким чином, можна зробити висновок, що тип дегідратації більше впливає на результати морфометричного дослідження. І, якщо, експеримент більш тривалий, то компенсаторний механізм не працює, що призводить до істотних наслідків, які спостерігаються при вивченні гістологічних препаратів. Це також підтверджується даними двофакторного дисперсійного аналізу. Встановлено більш виражений вплив типу дегідратації на морфофункціональні зміни в тканині ЩЗ, вплив ступеня посідає друге місце. Так, тип зневоднення на 59,57 % впливає на площу фолікулів, 56,82 % – на площу колоїду; 62,44 % – на висоту тироцитів, відповідно до цих даних, вплив ступеня становить 28,37 %, 31,07 %, 31,71 %, водночас взаємодія факторів займає 12,06 %, 12,11 %, 5,85 %.

За умов загальної дегідратації дещо варіабельні показники площі ядер тироцитів та їхніх діаметрів, що також пов'язано зі здатністю компенсаторної реакції, яка відображає більшу стійкість механізмів підтримання морфофункціонального гомеостазу ЩЗ упродовж короткотривалого експериментального періоду. Найбільше відрізняються показники площі тироцитів від групи інтактних тварин за умов позаклітинного зневоднення, встановлено активне зменшення даних при важкому ступені, а саме на 32,69 % ( $p < 0,0001$ ), така ж тенденція спостерігається і при клітинному зневодненні, що свідчить про зниження функціональної та проліферативної здатності клітин. При моделюванні загального зневоднення площа ядер тироцитів починає збільшуватись і за умов середнього ступеня збільшується на 12,18 % ( $p = 0,0189$ ). Але за досягнення важкого ступеня зневоднення закінчується пристосувальний період, орган «втомлений» і згасає його функціональна здатність, що призводить до зниження зазначеного показника всього на 6,77 %

( $p = 0,1378$ ), у результаті виникає дисфункція тканини, яка спостерігається вже за умов загального зневоднення. Встановлена перебудова форми ядер на початку експерименту. Відмічається рівномірне збільшення їхніх діаметрів, що підкреслює проліферативну здатність, функціональну активність, а вже на десяту добу – більший діаметр ядер швидко знижується, вони сплющуються до базальної мембрани, змінюється відповідно і гістологічна характеристика. Процес сплющення ядер продовжується також за умов клітинної та позаклітинної дегідратації, і максимального зниження більшого діаметра ядер набуває на 90 добу, які стають меншими за контроль на 38,46 % ( $p < 0,0001$ ). Менший діаметр, навпаки, упродовж експерименту рівномірно збільшується. За легкого ступеня позаклітинного зневоднення ми бачимо зменшення обох значень діаметрів. Зокрема, більший діаметр ядра став меншим за контроль на 7,97 % ( $p < 0,0001$ ), а менший діаметр – на 3,34 % ( $p = 0,0937$ ). Це свідчить про те, що вже на першому етапі позаклітинного зневоднення згасає функціональна активність тканини, ядра зменшуються в загальному об'ємі та зі збільшенням експериментального періоду сплющуються.

Яскравим індикатором функціональної здатності є показники ІНК та ФКІ, які чітко підкреслюють прояви гіпер- та гіпофункції. При моделюванні клітинного та позаклітинного зневоднення на кожному експериментальному етапі дослідження спостерігається стрімкий ріст показника ІНК, водночас ФКІ, навпаки, має тенденцію до зниження, що свідчить про поступове зниження морфофункціональних властивостей тканини ЩЗ, розпочинаючи з легкого ступеня та посилюючись за умов тяжкого ступеня зневоднення. Найбільшого зниження функціональної здатності тканини в порівнянні з контрольною групою тварин набули результати тяжких ступенів позаклітинного та клітинного зневоднення, де ІНК став більшим на 92,08 % ( $p < 0,0001$ ), водночас як ФКІ зменшується на 31,48 % ( $p < 0,0001$ ), у другому випадку ІНК більше на 38,60 % ( $p < 0,0001$ ), ФКІ менше на 18,43 % ( $p < 0,0001$ ).

Використовуючи двофакторний дисперсійний аналіз з'ясовано, що тип дегідратації здебільшого впливає на морфометричні показники. Зокрема, тип дегідратації на 66,03 % впливає на площу ядер, а ступінь – на 29,55 %. Показники ІНК та ФКІ реагують на 62,77 % в першому випадку та на 53,85 % – у другому на тип дегідратації, водночас ступінь впливає на ІНК на 31,4 %; на ФКІ – на 43,59 %.

При загальній дегідратації легкого ступеня активуються захисні компенсаторно-адаптаційні реакції органа, зберігається гістоархітектоніка часточок залози, посилюється проліферативна здатність. З'являються ознаки екстрафолікулярного та інтрафолікулярного фолікулогенезу, збільшується висота фолікулярного епітелію, посилюється розмитість їхнього апікального краю, що свідчить про резорбційну активність тканини, розріджується колоїд. Утворення складок на стінці фолікулів, формування сосочків, багат шарових структур – це прояв інтрафолікулярної проліферації, яка свідчить про адаптативну реакцію ЩЗ на посилення її функції. Формування інтерфолікулярних острівців, що диференціюються в мікрофолікули, які з часом синтезують та накопичують колоїд у порожнині – це особливість екстрафолікулярної проліферації. Хоча з проявом гіперфункції з'являються й ознаки негативного впливу на тканину, посилюється васкуляризація, подекуди відмічаємо розростання прошарків сполучної тканини, спостерігається спорадична десквамація епітелію. Уже за умов середнього ступеня тенденція до гіперфункції стає значно меншою. Спостерігається поступова ретенція колоїду, фолікули набувають більшого розміру, спостерігаються також і дистрофічні зміни. Функціональний стан часточок у різних зонах залози досить різний, хоча зберігається топографічна гетерогенність фолікулів. Зниження функціональної активності підкреслюється збільшенням кількості десквамованого епітелію, частково відбуваються атрофічні процеси в часточках, відмічаються кровонаповнені судини з потовщеними стінками, але продовжується фолікулогенез та незначні мітотичні процеси, що підкреслює прояв дисфункції. Усе ж таки на десятю добу розпочинається активний процес



гіпофункції. З'являються дегенеративні зміни, проліферативна здатність згасає, подекуди виявляється редукцію фолікулів, нерівномірність склеротичних змін, і лише поодинокі залишаються ділянки зі стабільним функціонуванням органа. Протягом експериментального дослідження стан тканини погіршується. Змінюється форма фолікулів, вони стають більш витягнутим, деформуються, спорадично з ознаками атрофії. Фолікули наповнені загуслим колоїдом, що підтверджується також гістохімічними дослідженнями та підкреслює згасання функціональної здатності.

Колоїдонакопичення в тканині ЩЗ значно перевищує колоїдовиведення. Стінки фолікулів стоншуються, відбувається порушення їхньої цілісності. На 20 добу клітинного зневоднення зникає диференціація часточок, поодинокі залишаються прояви фолікулогенезу за типом фрагментації, з'являються гігантські фолікули.

Основна кількість тироцитів плоскої форми, десквамація майже в кожному полі зору. Епітеліальна тканина активно заміщується сполучною, у результаті – розростання строми, що підкреслюють дослідження препаратів забарвлених за Ван-Гізеном. Унаслідок згущення крові посилюється розвиток склеротичних змін. Максимально негативний вплив мають умови позаклітинного зневоднення. Порушуються ознаки секреторної функції: спостерігається велика кількість фолікулів-гігантів, наповнених щільним загуслим колоїдом; чіткий апікальний край тироцитів, відсутність вакуолей резорбції. Уже за умов легкого ступеня позаклітинного зневоднення адаптивні та компенсаторні механізми не захищають тканину від негативного впливу. Це підкреслюється і морфометричними результатами, де надзвичайно швидко змінюються всі показники. Зростає накопичення колоїду, він стає більш густим, зернистим, конденсованим, краще сприймає барвники ШИК-реакції. Збільшується кількість грубоволокнистої строми, зменшується паренхіма. Велика кількість деформованих фолікулів, які зливаються між собою та містять велику кількість десквамованих тироцитів. Часточки паренхіми ЩЗ

досить чітко відмежовані одна від одної склеротизованою строюю. При цьому кількість екстрафолікулярного епітелію значно зменшується.

Унаслідок тривалого впливу на організм позаклітинної дегідратації відмічається велика кількість фолікулів із розривом фолікулярної стінки та редукованих фолікулів. На місці зруйнованих фолікулів спостерігаються адаптивні процеси заміщення паренхіми сполучною тканиною. Відмічається домінуюча кількість тироцитів плоскої форми, спостерігається зменшення їхньої висоти. Ядра тироцитів змінюють форму, сплющуються до базальної мембрани. На 90 добу дослідження з'являється вогнищева атрофія часточок, виникають ознаки розпаду та утворюються апоптозні тіла, спостерігаються явища редукції фолікулів зі спаданням паренхіми та утворенням щілиноподібних структур. З'являється велика кількість фолікулів із розривом фолікулярної стінки, що призводить до «колоїдних озерець».

Значного розвитку сягає сполучна тканина в міжчасточкових проміжках та в міжфолікулярному просторі. Виникає склероз та розростання строми, що є певною компенсаторною реакцією, порушується проникність судин, відбуваються склеротичні зміни. Збільшилася кількість фолікулів, порожнина яких заповнена кров'ю у результаті діapedезних крововиливів.

Дослідження спектрального аналізу тканини ЩЗ за умов зневоднення демонструє значний діапазон показників залежно від типу та ступеня дегідратації. Кількість іонів цинку та міді одночасно змінюється. При загальній дегідратації легкого та середнього ступенів показники майже синхронно збільшилися відповідно до контролю: іони цинку – на 12,75 % ( $p=0,0022$ ) та 17,00 % ( $p=0,0004$ ); міді на 10,13 % ( $p=0,0125$ ) та 14,31 % ( $p=0,19$ ). Уже за умов важкого ступеня відбувається зменшення цинку на 5,18 % ( $p=0,0981$ ); міді – на 2,89 % ( $p=0,3972$ ). При клітинному зневодненні кількість цинку та міді набуває значних змін при важкому ступені зневоднення, де показники цинку стали меншими на 29,73 % ( $p < 0,0001$ ); міді – на 31,35 % ( $p < 0,0001$ ). Дефіцит цинку може призводити до накопичення заліза. Так, за умов клітинного та позаклітинного зневоднень, встановлено, що

кількість феруму стабільно збільшується з посиленням ступеня зневоднення. І навпаки, при загальному зневодненні зменшується досить активно, водночас кількість цинку прямо пропорційно збільшується.

Спектральний аналіз демонструє закономірне, поступове зменшення мангану за умов загальної дегідратації. Уже на 3 добу його кількість зменшилася відповідно до контролю на 7,51 % ( $p = 0,0466$ ), на шосту добу – стала меншою на 15,06 % ( $p = 0,0009$ ) та при важкому ступені зневоднення – на 21,94 % ( $p < 0,0001$ ). На початку клітинної дегідратації кількість Mn несуттєво збільшується в порівнянні з інтактною групою тварин, а вже за умов середнього та важкого ступенів знову показник знижується і на 30 добу стає меншим за контроль на 24,85 % ( $p < 0,0001$ ). При моделюванні позаклітинного зневоднення кількість мікроелемента зростала, що свідчить про порушення метаболічного процесу та за умов важкого ступеня стає вже меншою на 15,69 % ( $p=0,0005$ ).

За умов загальної дегідратації легкого та середнього ступенів відмічається тенденція до збільшення кількості магнію на 10,27 % ( $p = 0,0261$ ) і 19,88 % ( $p = 0,0006$ ) відповідно. Це може бути пов'язано з активними мітотичними поділами тироцитів як прояв компенсаторної реакції, а вже при важкому ступені зневоднення недостовірно зменшується відносно інтактної групи тварин. Результати клітинного зневоднення дають іншу картину: за умов легкого ступеня показник зменшується та досягає максимального зниження при важкому ступені зневоднення порівняно з контролем на 44,67 % ( $p < 0,0001$ ). Умови позаклітинної дегідратації демонструють інший напрямок змін – кількості іонів Mg зростає.

Концентрація іонів кальцію за умов клітинного та позаклітинного зневоднення також поступово зменшується, особливо за умов важкого ступеня, де показники стають меншими за контроль на 13,66 % ( $p=0,0012$ ) та 16,49 % ( $p=0,0004$ ), відповідно.

Хіміко-аналітичне дослідження тканини ЩЗ щодо визначення кількості натрію у її складі демонструє досить різкі зміни порівняно з групою інтактних

тварин. При тяжкому ступені позаклітинної дегідратації кількість зменшується на 49,20 % ( $p < 0,0001$ ). При клітинному зневодненні рівень натрію збільшується, що також є проявом зневоднення. Активне збільшення розпочинається вже за легкого ступеня зневоднення, досягає максимальних змін – при тяжкому ступені, де кількість збільшується на 41,20 % ( $p < 0,0001$ ). Загальне зневоднення – це нищівний стрес для тканини, і вже за умов легкого ступеня, ми бачимо втрату цього хімічного елемента, що посилюється впродовж експерименту (на 10 добу стає меншим за контрольну групу щурів на 43,53 % ( $p < 0,0001$ )). Прояв гіпонатріємії та гіпернатріємії є індикатором дегідратаційних порушень, що мають різні причини.

Усі три типи зневоднення демонструють зменшення калію. Але за умов клітинного зневоднення легкого ступеня ми спостерігаємо незначне збільшення щодо макроелемента, зокрема, на 6,31 % ( $p = 0,0923$ ), що є проявом перерозподілу внутрішньоклітинного калію, яке призводить до порушення та руйнування клітин. При моделюванні загального та позаклітинного зневоднення спостерігається тенденція гіпокаліємії вже на 30 добу експерименту та подовжується до 90 доби. Аналізуючи відновні властивості органометричних вагово-лінійних показників встановлено, що загальна картина відновних процесів краща у щурів, що перебували за умов тяжкого ступеня загальної дегідратації. Друге місце займають відновні властивості клітинного зневоднення, та на останньому – залишаються показники позаклітинної дегідратації. За умов загального зневоднення найбільш активна реакція до відновлення на 15 добу реадаптації належала показникам площі колоїду та, відповідно, ІНК і ФКІ, що набули достовірної різниці порівняно з результатами тяжкого ступеня зневоднення. Так, площа колоїду зменшилася на 14,94 % ( $p = 0,0049$ ); ІНК – на 5,12 % ( $p = 0,0145$ ); ФКІ – на 8,15 % ( $p = 0,0001$ ). Найменших змін зазнали показники площі фолікулярного епітелію, що стало більшими лише на 1,02 % ( $p = 0,8539$ ); висота тироцитів та їхня кількість збільшилася на 2,88 % ( $p = 0,4033$ ) та зменшилася на 1,54 % ( $p = 0,8474$ ), та площа ядер, які збільшилися лише на

1,96 % ( $p = 0,6855$ ), що свідчить про низьку функціональну та проліферативну активність. Тридцята доба реадaptaції за умов загальної дегідратації тяжкого ступеня демонструє найбільші зміни таких показників, як площа фолікулів ЩЗ, що зменшилася на 14,76 % ( $p = 0,0016$ ); площа колоїду стала меншою на 25,92 % ( $p = 0,0001$ ); збільшилася висота тироцитів на 4,75 % ( $p = 0,2391$ ). Аналізуючи цифрові дані ІНК та ФКІ, встановлено зниження ІНК на 11,95 % ( $p = 0,0002$ ) та збільшення ФКІ на 14,67 % ( $p < 0,0001$ ), що свідчить про позитивний вплив реадaptaційних умов. За умов клітинного зневоднення більш помірний процес відновлення. На 15 добу реадaptaції поступово починають змінюватися показники площі фолікулів, що стали меншими відносно результатів тяжкого ступеня на 6,19 % ( $p = 0,0339$ ). Зменшилася площа колоїду на 8,67 % ( $p = 0,0129$ ); поступово змінюються дані ІНК та ФКІ, що в першому випадку менші на 1,97 % ( $p = 0,3985$ ), а у другому – більші на 2,82 % ( $p = 0,0432$ ). Найменших змін зазнала висота тироцитів та площа ядер, що залишилися майже на рівні з результатами тяжкого ступеня. Тридцятиденна реадaptaції пасивно, але поступово збільшує різницю між значеннями тяжкого ступеня зневоднення. Площа фолікулів стала меншою на 9,38 % ( $p = 0,0044$ ); площа колоїду – на 17,01 % ( $p = 0,0002$ ), водночас площа фолікулярного епітелію залишається майже незмінною, що свідчить про пасивний ріст висоти тироцитів (лише на 7,47 % ( $p = 0,0523$ )). Незважаючи на це, все ж таки позитивний вплив спостерігається в показниках ІНК та ФКІ, де зменшення першого – на 11,18 % ( $p = 0,0007$ ) та збільшення другого – на 9,04 % ( $p < 0,0001$ ) демонструють прояв збільшення функціональної активності тканини ЩЗ щурів.

За умов 15-денної реадaptaції після тяжкого ступеня позаклітинного зневоднення зменшуються показники площі фолікулів на 6,77 % ( $p = 0,0037$ ); площі колоїду – на 10,90 % ( $p = 0,0001$ ). Висота тироцитів збільшилася на 8,40 % ( $p = 0,0792$ ), так само збільшується площа ядер на 6,53 % ( $p = 0,2403$ ), але в порівнянні з групою тварин, що перебували за умов тяжкого ступеня, результати не мають достовірно статистичної різниці. ІНК стає меншим на

11,91 % ( $p < 0,0001$ ), водночас ФКІ збільшується на 4,73 % ( $p = 0,0033$ ). Більш виражені зміни відбуваються на тридцятиденний період реадптації, де показники площі фолікулів та площі колоїду стають меншими за показники тяжкого ступеня на 22,48 % ( $p < 0,0001$ ) та на 32,08 % ( $p < 0,0001$ ), але все одно не наближаються до контрольних значень. Висота тироцитів стає більшою на 13,38 % ( $p = 0,0136$ ), але це не дає змогу наблизити показник площі фолікулярного епітелію до нормальних значень, що стала менше на 2,35 % ( $p = 0,4646$ ). Також збільшується площа ядер тироцитів на 21,86 % ( $p = 0,0019$ ), але різниця отриманих даних за умов тяжкого ступеня не наближають їх до результатів контрольної групи тварин. Але про підвищення функціональної активності свідчать зміни показників ІНК та ФКІ, що є певним індикатором функціональної активності. Так, ІНК зменшується на 24,73 % ( $p < 0,0001$ ), а ФКІ збільшується на 14,19 % ( $p < 0,0001$ ).

П'ятнадцятиденна реадптація після загального зневоднення тяжкого ступеня демонструє певні гістологічні зміни, зокрема регенеративні процеси тканини. Але дія пошкоджуючого фактора досить активна, що заважає якості відновних процесів. Спостерігається певна фолікулярна гетерогенність, тобто розподілення на центральну частину з меншими фолікулами та на периферійну – з більшими. Захисні фактори запускають процеси васкуляризації, проліферації, збільшується кількість екстрафолікулярного епітелію. Тривалий термін реадптації протягом тридцяти діб більш позитивно впливає на оновлення тканини ЩЗ. Частково відновлюється форма та розмір фолікулів, з'являється диференціювання на периферійну та центральну частини паренхіми, що підтверджується морфометричними даними. Форма тироцитів наближається до кубічної, колоїд містить резорбційні вакуолі, що підкреслює функціональну активність, посилюється проліферативний процес. Спостерігається тенденція до відновлення структурного та функціонального станів органа.

Процес реадптації після умов тяжкого ступеня клітинного зневоднення на п'ятнадцяту добу не демонструє активного покращення. Архітектоніка

паренхіми не відновлюється, колоїд у фолікулах залишається щільним та загуслим, тироцити сплюсненої форми, відповідно зі зміною форми ядра. Велика кількість зруйнованих ділянок у тканині, досить значні сполучнотканинні прошарки з клітинним вмістом. Залишаються дисциркуляторні розлади судин мікроциркуляторного русла, кровонаповнені судини зі складжами еритроцитів, відповідно відбувається склероз судин унаслідок загущення крові. На тридцяті добу реадаптації повного відновлення не відбувається, хоча певні позитивні зміни спостерігаються, і це підтверджується також морфометричними показниками ІНК та ФКІ.

Умови позаклітинного зневоднення надали більш стійкого та негативного впливу на тканину ЩЗ і за п'ятнадцятиденний період реадаптації не відбулося покращення структурного та функціонального станів. Певне покращення спостерігається лише на тридцяті добу: зменшується розмір фолікулів, збільшується висота тироцитів, посилюється васкуляризація, але повного відновлення мікроциркуляторного русла не відбувається. Усе це вказує на покращення стану, але не наближає до результатів інтактної групи тварин. Таким чином, тридцятиденна реадаптація не дає змоги тканині та органу загалом адаптуватися до раніше створених несприятливих умов, і внаслідок цього тканина не відновила своїх морфофункціональних можливостей.

Спектральне дослідження хімічного складу тканини ЩЗ після впливу важкого ступеня загального зневоднення на 15-ту добу реадаптації вказує на зростання концентрацій усіх досліджуваних елементів. Так, вміст калію збільшився на 27,59 %; натрію – на 64,46 %; кальцію – на 21,04 %; магнію – на 6,18 %; мангану – на 20,42 %; цинку – на 6,38 %; заліза – на 24,59 %. По-іншому реагують показники за умов реадаптації після клітинного зневоднення, зокрема, на 15-ту добу збільшується вміст калію на 39,44 %; магнію – на 39,94 %; мангану – на 11,01 %; міді – на 20,37 %; цинку – на 20,38 %, майже незмінною залишається кількість кальцію.

Концентрація натрію та заліза стає меншою на 8,76 % та 3,51 %, відповідно. Умови позаклітинного зневоднення під час реадаптаційного впливу демонструють збільшення кількості калію на 45,20 %; натрію – на 35,89 %; кальцію – на 8,32 %; міді – на 20,63 %; цинку на 20,61 %. Зменшується концентрація магнію на 10,26 %; мангану – на 5,72 % та заліза – на 5,27 %. Щодо тридцятиденної реадаптації, тонайбільше відновлювальні концентрації таких хімічних елементів, як магній, манган, мідь та цинк – спостерігаються після змодельованих умов загального та позаклітинного зневоднення. Відмічається найслабше відновлення калію та натрію, це свідчить про порушення калієво-натрієвого насоса, за допомогою якого відбувається фізіологічне циркулювання рідини за межі клітини та всередину разом із поживними речовинами та, відповідно, продуктами життєдіяльності. У зазначеному випадку це підкреслює складність морфофункціонального стану тканини.

Таким чином, можна зробити висновок, що для відновлення морфофункціонального стану тканини ЩЗ після стресу за рахунок умов дегідратаційного порушення, недостатньо створити лише сприятливі умови харчового та питного балансів, особливо після моделювання тяжкого ступеня позаклітинного зневоднення.



## ВИСНОВКИ

1. Вплив на організм протипухлинної хіміотерапії призводить до сповільнення диференціювання клітинних елементів кісткового регенерату, затримки формування, реорганізації та ремоделювання його тканиноспецифічних структур. На ранніх термінах репаративної регенерації встановлено збільшення площі сполучної та ретикулофіброзної кісткової тканин поряд із затримкою формування пластинчастої тканини на пізніх термінах. На 60-ту добу після травми в умовах впливу доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату у регенераті спостерігалось зменшення площі новоутвореної кісткової тканини, зокрема, пластинчастої тканини – на 49,59 % ( $p < 0,0001$ ), 11,07 % ( $p = 0,008$ ) та 26,84 % ( $p < 0,0001$ ) відповідно даних контрольної групи. Зміни у мікроархітектурі регенерату характеризувалися наявністю витончених, хаотично розташованих кісткових балок новоутвореної ретикулофіброзної кісткової тканини з широкими міжтрабекулярними просторами між ними, появою мікротріщин на їх поверхні, а також затримкою формування тісного контакту між регенератом та материнською кісткою. Найбільш виражений негативний вплив встановлений в умовах впливу доксорубіцину та метотрексату.

2. Дія на організм доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату майже однаково впливає на збільшення експресії катепсину К та зниження експресії остеопонтину в ділянці кісткового дефекту, що в першому випадку є однією з ознак посиленої резорбції кісткової тканини регенерату, а в другому – зниження темпу диференціювання остеобластів та інтенсивності мінералізації кісткового матриксу.

3. Протипухлинні препарати (доксорубіцин, 5-фторурацил та метотрексат) спричиняють зниженню рівня кальцію та фосфору як в самому регенераті (на 45,67 % ( $p < 0,0001$ ) та 27,33 % ( $p < 0,0001$ ); 26,03 % ( $p < 0,0001$ ) та 17,07 % ( $p < 0,0001$ ); 40,66 % ( $p < 0,0001$ ) та 25,20 % ( $p < 0,0001$ )), так і в материнській кістці (на 15,59 % ( $p < 0,0001$ ) та 18,59 % ( $p < 0,0001$ ); 20,45 %

( $p < 0,005$ ) та 17,33 % ( $p < 0,0001$ ); 22,25 % ( $p < 0,05$ ) та 14,59 % ( $p < 0,0001$ )) на 60-ту добу експерименту, що свідчить про зниження інтенсивності мінералізації новоутвореного кісткового матриксу та сповільнення ремоделюючої активності материнської кістки. Найбільш виражений негативний вплив на мінеральний обмін встановлений у разі застосування доксорубіцину, менш виражений – при дії 5-фторурацилу.

4. Лікування протипухлинними хіміопрепаратами призводить до затримки формування кісткової мозолі, про що свідчать низькі показники оптичної щільності регенерату порівнянно з контрольною групою. Так, на 60-у добу експерименту зниження оптичної щільності в ділянці регенерату в умовах застосування доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату становило 37,08 % ( $p < 0,0001$ ), 23,02 % ( $p < 0,0001$ ) та 27,86 % ( $p < 0,0001$ ) у порівнянні з контрольною групою. Найбільш виражений негативний вплив мав доксорубіцину та метотрексат.

5. За умов дії на організм доксорубіцину, 5-фторурацилу та метотрексату встановлено зниження мікротвердості кісткової тканини регенерату (на 21,47 % ( $p < 0,05$ ), 11,93 % ( $p < 0,05$ ), 16,12 % ( $p < 0,05$ )) та зменшення межі міцності на стиск діафізу травмованої стегнової кістки (27,50 % ( $p < 0,05$ ), 18,48% ( $p < 0,05$ ) та 23,56 % ( $p < 0,05$ )) порівняно з аналогічними даними контрольної групи, що відмічалось на 60-ту добу після травми. Найбільших змін перераховані показники зазнали при дії на організм доксорубіцину та метотрексату, а найменших – за умов впливу 5-фторурацилу.

6. 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.

7. 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 остеорепарації. 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 остеорепарації 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. Отже дані зміни підтверджують негативний вплив хронічної гіперглікемії на формування повноцінної кісткової тканини в ділянці дефекту.

8. 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 % ( $p < 0,001$ ) внаслідок уповільнення регресії гематоми та утилізації кісткового детриту. 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, що свідчить про зниження мінералізації утвореного регенерату.

9. 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, відбувалось збільшення остеобластів та остеокластів, а грануляційна тканина реорганізовувалася у фіброретикулярну

сполучну тканину. На 14-ту добу залишків кісткового детриту не було виявлено. Відбулось різке розростання фіброретикулярної тканини та її упорядкування й формування у остеїдні трабекули. 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 кінці експерименту, в центрі регенерат складався з упорядкованої грубоволокнистої кісткової тканини.

10. Встановлено, що регенерат у щурів із хронічною гіперглікемією, яким у дефект вводили збагачену тромбоцитами плазму, у кінці експерименту складався із ретикулофіброзної кісткової тканин, 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.

11. 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.

12. Інволютивні перетворення легень інтактних щурів виявлялися зміною морфо-, мікро- та ультрамікрометричних параметрів, а саме:

відбувалося збільшення 16 абсолютної маси та об'єму легень від ( $1,04 \pm 0,01$ ) до ( $2,95 \pm 0,04$ ) г та від ( $2,0 \pm 0,1$ ) до ( $5,74 \pm 0,03$ ) см<sup>3</sup> відповідно; зростання показників відносної маси та об'єму легень від ( $1,02 \pm 0,06$ ) до ( $1,29 \pm 0,05$ ) та від ( $1,97 \pm 0,07$ ) до ( $2,5 \pm 0,03$ ) відповідно; незначне зменшення ширини альвеол від ( $66,02 \pm 0,1$ ) до ( $52,8 \pm 0,06$ ) мкм, глибини альвеол від ( $52,1 \pm 0,66$ ) до ( $50,5 \pm 0,1$ ) мкм; збільшення ширини провідного відділу термінальних бронхіол від ( $53,2 \pm 0,56$ ) до ( $74,1 \pm 0,52$ ) мкм, потовщення міжальвеолярних перегородок від ( $3,2 \pm 0,16$ ) до ( $7,95 \pm 0,09$ ) мкм, значне збільшення товщини інтерстиційного простору від ( $79,7 \pm 0,08$ ) до ( $119,3 \pm 0,23$ ) нм, стабільності вмісту натрію та калію, зменшення заліза, міді, цинку, марганцю та збільшення магнію.

13. У щурів молодого віку на тлі експериментальної гіперглікемії, починаючи з 30-ї доби, виявлені гіпотрофічні зміни. Дефіцит маси тіла до 180-ї доби експерименту становив 40,4 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними тваринами. Абсолютна маса та об'єм легень до кінця дослідження зросли у 2,3 та 1,4 рази ( $p < 0,05$ ). Характерним був рестриктивний компонент порушення дихальної функції, що підтверджувалося морфометрично – зростанням показників співвідношень А та Б (відносно збільшення ширини входу в альвеолу та ширини провідної бронхіоли до глибини альвеоли, яка зменшувалась) зі зростанням терміну гіперглікемії та гістологічно – ранньою появою та гіпертрофією зрілих колагенових волокон у складі міжальвеолярних перегородок, збільшенням розмірів легеневих лімфоїдних фолікулів. У легеневих артеріях відбувалися склеротичні зміни з 60-ї доби алоксанової гіперглікемії, товщина судинної стінки легеневих артерій м'язового типу збільшувалась з ( $34,2 \pm 0,04$ ) до ( $118,5 \pm 0,44$ ) мкм (із 30-ї до 180-ї доби експерименту) за рахунок гіпертрофії гладком'язових волокон у середній оболонці та колагену – у зовнішній. На ультраструктурному рівні виявлено деструктивні зміни в альвеолоцитах II типу їх руйнування, посилення проліферації, що призводило до збільшення кількості легеневих макрофагів. Спостерігали зменшення натрію, калію та збільшення заліза,

цинку, магнію, міді, марганцю в тканині легень. Коефіцієнт співвідношення Zn/Cu впродовж усього терміну експерименту в середньому був більшим вдвічі порівняно з інтактними тваринами. З початку експерименту під час проведення рентгенологічного дослідження органів грудної клітки було виявлено гіпертрофію середостінних лімфатичних вузлів.

14. На тлі експериментальної гіперглікемії у щурів зрілого віку відбувалася втрата маси тіла з 30-ї доби. Абсолютна маса та об'єм легень до 180-ї доби збільшилися у 1,4 та 1,5 рази ( $p < 0,05$ ). Упродовж дослідження щільність легеневої тканини зменшилася на 8,4 % ( $p < 0,05$ ), глибина альвеол збільшилася на 18,2 % ( $p < 0,05$ ), що свідчило про розвиток процесів емфізематозного спрямування без рестриктивного компонента. Гіпертрофію зрілих колагенових волокон у складі міжальвеолярних перегородок та в зовнішній оболонці судин на мікроскопічному рівні було виявлено на 60-ту добу експерименту; реактивні зміни лімфоїдних фолікулів – на 30-ту добу. Явища стазу в артеріях м'язового типу спостерігалися з 90-ї доби досліду. Деструктивні зміни в альвеолоцитах II типу відзначалися з 30-ї доби експерименту. Антиоксидантні реакції проходили активно, про що свідчили показники співвідношення Zn/Cu (18,6–20,4).

15. У тварин старечого віку на тлі експерименту дефіцит маси тіла на 30-ту добу становив 23,5 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами. Абсолютна маса та об'єм легень до 180-ї доби збільшилися на 5,4 та 16,96 % ( $p < 0,05$ ). Показник щільності легеневої тканини був у середньому меншим на 4,1 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з інтактними щурами, що свідчило про достовірний вплив гіперглікемії на емфізематозну перебудову легень, але меншу інтенсивність, ніж у тварин молодого та зрілого віку. Гістологічно виявлено склерозування легеневої стромы, судин м'язового типу, явища стазу та плазморагії. Інволютивні зміни в органах імунної системи обумовили менш реактивну гіпертрофію лімфоїдних фолікулів, які до кінця експерименту збільшилися на 5,4 % ( $p < 0,05$ ). Товщина гематоальвеолярного бар'єра до кінця досліду зросла у 1,3 рази ( $p < 0,05$ ). У біоелементному складі легень відмінностей з іншими

групами не було, за винятком зниження проходження отиксидантних реакцій у легенях, про що свідчило зменшення показника співвідношення Zn/Cu з 18,2 до 16,3.

16. Розрахунки двофакторного дисперсійного аналізу впливу вікового фактора і терміну тривання хронічної гіперглікемії на морфометричні показники легеневих структур, легеневих судин та лімфоїдних фолікулів експериментальних тварин був виявлений переважний вплив терміну дослідження на зміну ширини входу в альвеолу (48 %), ширини провідної бронхіоли (42,8 %), товщини міжальвеолярної перегородки (67,7 %), показників співвідношення A (64,1 %), товщини судинної стінки (78,5 %), товщини комплексу інтима + медіа (62,95 %), товщини м'язового шару (62,7 %), товщини зовнішньої оболонки (43,5 %), периметра лімфоїдних фолікулів (85,5 %), товщини гематоальвеолярного бар'єра (39,3 %).

17. Препарат кверцетин зменшував інтенсивність розвитку пневмосклерозу, фіброзу легеневих судин м'язового типу, деструктивні зміни в паренхімі легень, гіпертрофію лімфоїдних фолікулів. Ефективність лікувального засобу була визначена після 2-місячного терміну його вживання на ультрамікроструктурному рівні (товщина гематоальвеолярного бар'єра на 60-ту добу на 0,41 % менша порівняно з групою без коректора, вже на 180-ту добу – на 2,4 %). Глибина альвеол, ширина входу в альвеоли зменшувалися з 120-ї доби, ширина провідних бронхіол – з 150-ї доби експерименту, що свідчило про зменшення розвитку емфізематозних змін. Товщина міжальвеолярних перегородок на 150-ту добу становила ( $8,6 \pm 0,1$ ) мкм у групі, яка вживала препарат, та ( $9,02 \pm 0,4$ ) мкм у тварин, які не вживали лікувальний засіб; до 180-ї доби співвідношення цих показників було таке: ( $9,3 \pm 0,1$ ) та ( $15,02 \pm 0,04$ ) мкм відповідно. Зменшення впливу гіперглікемії на легеневі судини м'язового типу спостерігалось з 150-ї доби досліду, що проявлялося зменшенням товщини судинної стінки. Легеневі лімфоїдні фолікули на 60-ту добу алоксанової гіперглікемії на 0,06 % ( $p < 0,05$ ) були меншими в групі

тварин, які вживали кверцетин, та вже на 180-ту добу – на 50,8 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з щурами, яким не вводили лікувальний засіб.

18. Ріст та формування довгих трубчастих кісток щурів молодого віку у фізіологічному стані характеризується прогресивним збільшенням величин всіх досліджуваних показників, а саме: діаметра остеонів та їх каналів, об'єму загальної спонгіози, ширини епіфізарного хряща та ширини кісткових трабекул. Хімічний склад кісток щурів молодого віку характеризується поступовим збільшенням вмісту Ca, P, Zn та Cu; у щурів зрілого віку та старечого вміст зазначених хімічних елементів поступово знижувався. Максимальні значення тривкісних показників кісток відзначаються у щурів зрілого віку, а найменші – у щурів молодого віку.

19. Хронічна гіперглікемія спричиняє порушення росту кісток щурів усіх вікових груп. При цьому у щурів молодого та зрілого віку достовірні зміни виникають вже на 30 добу спостереження. Так у щурів молодого віку максимальна довжина стегнової й плечової кісток до кінця експерименту збільшилась – на 41 % ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем, у щурів зрілого віку довжина стегнової кістки збільшилась на 8,8 % ( $p < 0,001$ ), плечової кістки – на 9,1 % ( $p < 0,001$ ), у щурів старечої групи – на 6,1 % ( $p < 0,001$ ) та 6,2 % ( $p < 0,05$ ) відповідно. У щурів експериментальної серії спостерігається уповільнення процесів апоозиційного росту порівняно з контролем. Показники ширини проксимального й дистального епіфізів стегнової кістки були меншими порівняно із контролем в щурів молодого віку – на 8,1 % ( $p < 0,05$ ) та 6,7 %, плечової кістки – на 9,0 % та 9,7 %, в щурів зрілого віку – на 7,7 % та 8,5 % для стегнової кістки та на 11 % та 11,2 % - для плечової кістки, в щурів старечого віку - на 5,3 %, 5 % та 5,3 %, 5,7 % відповідно.

20. Хронічна гіперглікемія призводить до розвитку деструктивних змін кісток щурів усіх вікових груп; найбільші порушення спостерігались у тварин молодого та старечого віку. Описані зміни проявлялися у сповільненні ремоделювання кісткової тканини, порушенні структури компактної речовини діафіза й будови епіфізарного хряща, зменшенні міцнісних характеристик



діафіза. Більш інтенсивні зміни виникають в епіфізах, що свідчить про вищу чутливість трабекулярної кісткової тканини. Морфологічні зміни за умов дії гіперглікемії полягають у відносному зменшенні площі губчастої речовини стегнової кістки в щурів молодого віку на 17,0 % ( $p < 0,001$ ), зрілого віку – на 10 % ( $p < 0,05$ ), старечого віку – на 18,0 % ( $p < 0,001$ ), розширенні остеонів та їх каналів в стегновій кістці щурів молодого віку – на 19 % ( $p < 0,001$ ) та 27 % ( $p < 0,001$ ) та 27,0 % ( $p < 0,001$ ), в щурів зрілого віку ці показники знизились у стегновій кістці – на 17,0 % ( $p < 0,05$ ) та 21,0 % ( $p < 0,05$ ), плечовій – на 16,0 % ( $p < 0,05$ ) та 20,0 %, в щурів старечого віку – на 3,2 % і 11,0 % ( $p < 0,001$ ) – в стегновій кістці та – на 3,6 % і 12,0 % ( $p < 0,001$ ) – в плечовій. Найбільша різниця з контролем визначається у будові епіфізарного хряща щурів молодого віку, де під впливом хронічної гіперглікемії спостерігається зменшення майже всіх досліджуваних морфометричних показників.

21. Імуногістохімічне дослідження активності остеогенних клітин в трьох вікових групах щурів свідчить про підвищену кісткову резорбцію в щурів старечого віку, найменш виражена експресія спостерігається в щурів молодого віку. Визначено, що в умовах хронічної гіперглікемії в щурів різних вікових груп експресія остепонтину та Rankl відмічається як в діафізі, так і в епіфізі трубчастих кісток, проте з різною інтенсивністю і з переважанням у трабекулярній кістковій тканині.

22. Результати електронно-мікроскопічного аналізу свідчать, що гіперглікемія викликає пригнічення клітин кісткової тканини та їх диференціації, на що вказує низький рівень розвитку органел у клітинах та порушення мінералізації матриксу внаслідок низької біосинтетичної активності остеобластів та загибелі остеоцитів в усіх вікових групах. Особливістю є те, що в усі терміни спостереження в щурів молодого та зрілого віку порушення остеобластів проявлялися у вигляді гіпертрофії гЕПС та формуванні залишкових тілець, а в щурів старечої групи - зміною форми та структури ядра, а саме появою додаткових ядерців. Гіперглікемія викликає дегенеративні зміни в клітинах кісткової тканини стегнової та плечової кісток

щурів усіх вікових груп починаючи з 30-ї доби спостереження з подальшим їх прогресуванням відповідно збільшення терміну експерименту.

23. Аналіз хімічного складу кісток щурів експериментальної серії свідчить, що концентрація макро- та мікроелементів має чітку тенденцію до зниження. У щурів молодого віку вміст Са в діяфізі стегнової кістки був меншим порівняно з контролем на 36 %, у щурів зрілого віку – на 23,5 %, у щурів старечого віку – на 10 %; вміст Р знизився в щурів молодого віку – на 19 %, зрілого – на 5,4 %, старечого – на 5,3 %. Разом з цим спостерігається стрімка втрата води в щурів молодого віку на 27 %, зрілого – на 5,5 %, старечого – на 12 % відповідно.

24. Експериментальне дослідження механічних показників досліджуваних кісток щурів різного віку показало значне зменшення міцнісних властивостей вже з 30-ї доби спостереження. Відтак межа міцності при стисненні діяфіза стегнової кістки в щурів молодого віку до кінця експерименту знизилася на 29 %, у щурів зрілого віку – на 11 %, у щурів старечого віку – на 9 %. Відповідні показники епіфіза в щурів молодого віку знизилися – на 32 %, у щурів зрілого віку – на 6,2 %, старечого – на 10 %. Тривала дія гіперглікемії призводить до достовірного зниження механічних показників кісток у всі вікові періоди, проте, найбільші зміни відзначаються у тварин молодого віку. Достовірне зниження механічних показників спостерігається як у кортикальній, так і в трабекулярній кістковій тканині. Зазначеним змінам механічних характеристик відповідає поступове зниження процесу мінералізації кісток.

25. При легкому та середньому ступенях загального зневоднення відбувається компенсаторно-приспосувальна реакція щитоподібної залози у формі зростання висоти тироцитів, фолікулогенезу паренхіми, повнокров'я судин зі стазом. За умов середнього ступеня зневоднення з'являються вогнища фолікулярної деструкції на тлі збереження їхньої проліферативної активності. За умов тяжкого ступеня загальної дегідратації морфометричні показники свідчать про збільшення індексу накопичення колоїду на 29,75 % ( $p < 0,0001$ )

та зниження фолікулярно-колоїдного індексу на 11,54 % ( $p < 0,0001$ ) відносно інтактної групи тварин. Площа фолікулів та колоїду збільшується на 34,94 % ( $p < 0,0001$ ) та 52,4 % ( $p < 0,0001$ ), відповідно. Відбувається деструкція тиреоїдної паренхіми.

26. За умов важкого ступеня клітинного зневоднення організму тварин фолікулярні стінки ЩЗ стоншуються внаслідок зниження висоти тироцитів на 14,92 % ( $p < 0,01$ ), збільшення площі колоїду – на 69,44 % ( $p < 0,001$ ). Зростає показник індексу накопичення колоїду на 38,6% при зниженні фолікулярно-колоїдного індексу на 18,43 % ( $p < 0,001$ ) як прояв пригнічення нормального стану органа. Фолікули поліморфні, перерозтягнуті загуслим щільним колоїдом. За умов середнього ступеня дегідратації змінюється архітектоніка паренхіми ЩЗ, посилюється десквамація епітелію, спостерігається елімінація фолікулярних структур. При моделюванні легкого ступеня зневоднення відмічається помірна десквамація епітелію. Судини кровонаповнені зі складжами еритроцитів, з'являються діapedезні крововиливи.

27. За умов позаклітинного зневоднення морфологія ЩЗ зазнає найбільш суттєвих змін на всіх рівнях її організації. Уже за легкого ступеня дегідратації спостерігається зрив компенсаторно-приспосувальних реакцій органа. При важкому ступені зневоднення визначається зниження ваги та об'єму ЩЗ на 20,25 % ( $p < 0,001$ ) та 23,21 % ( $p < 0,001$ ). Показники площі фолікулів та колоїду збільшилися на 103,91 % ( $p < 0,0001$ ) та 197,33 % ( $p < 0,0001$ ) відповідно. Індекс накопичення колоїду зростає на 92,08 % ( $p < 0,0001$ ), водночас фолікулярно-колоїдний індекс знизився на 31,48 %, що свідчить про пригнічення процесу резорбції колоїду.

28. Під впливом змодельованої дегідратації змінюється хімічний склад ЩЗ, унаслідок порушення водно-сольового обміну організму. За умов загального зневоднення важкого ступеня зменшується вміст усіх досліджуваних елементів, причому максимального значення зазнали показники К (34,61 % ( $p < 0,0001$ )) та Na (43,53 % ( $p < 0,0001$ )). За умов клітинної дегідратації збільшується кількість натрію й заліза на 41,20 %

( $p < 0,0001$ ) та 23,17 % ( $p < 0,0001$ ). Вміст усіх інших елементів значно зменшуються в порівнянні з інтактною групою тварин. За умов позаклітинного зневоднення хіміко-аналітичне дослідження ЩЗ вказує на зниження вмісту Na, K, Ca, Cu, Zn та збільшення Mg, Mn, Fe. Максимального зниження набула кількість натрію, зокрема, – на 49,20 % ( $p < 0,0001$ ) та калію – на 46,73 % ( $p < 0,0001$ ).

29. Найповільніший процес реадaptaції щитоподібної залози відбувається за умов позаклітинного зневоднення організму, де органометричні, гістоморфометричні показники не досягають контрольних значень. Індекс накопичення колоїду зменшений на 24,73 % ( $p < 0,0001$ ) у порівнянні з аналогічним результатом за важкого ступеня дегідратації, а фолікулярно-колоїдний індекс, навпаки, збільшений на 14,19 % ( $p < 0,0001$ ), що вказує на незначне відновлення структури ЩЗ. Площа фолікулів вища за контрольні значення на 50,97 % ( $p < 0,0001$ ), тироцити плоскої форми, проліферація відсутня, ледь простежується кровопостачання. Повної нормалізації структур щитоподібної залози не відбувається також після важкого ступеня загальної та клітинної дегідратацій.

30. Двофакторний дисперсійний аналіз демонструє виражену залежність досліджуваних параметрів ЩЗ щурів від усіх контрольованих чинників. Тип зневоднення здебільшого впливає на органометричні показники такі, як абсолютна, відносна маса та об'єм щитоподібної залози та на морфометричні, особливо на площу фолікулів, колоїду, фолікулярного епітелію, а також на результати індексу накопичення колоїду та фолікулярно-колоїдного індексу. На рівень досліджуваних хімічних елементів впливають однаково тип і ступінь зневоднення. На зміну іонів калію, кальцію, міді та цинку переважний вплив має ступінь дегідратації, а тип дегідратації – на результати вмісту натрію, магнію, мангану та заліза.

## ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Кузишин О.В., Ковалишин Н.В. Біохімія цукрового діабету: 1. Теоретична частина (огляд). Медична хімія. 2010. № 1. С. 74–102.
2. Takashi Tachibana, Shigeo Yoshida. Reduced vitreal concentration of periostin after vitrectomy in patients with proliferative diabetic. *Acta Ophthalmologica*. 2016. P. 81–82.
3. Daoyin Dong, Albert Reece. New development of the yolk sac theory in diabetic embryopathy: molecular mechanism and link to structural birth defects. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016. Vol. 214. P. 192–202.
4. Kyung Sik Park, Kwang Bum Cho. Characterization of smooth muscle, enteric nerve, interstitial cells of Cajal, and fibroblast-like cells in the gastric musculature of patients with diabetes mellitus. *World journal of gastroenterology*. 2016. Vol. 22. P. 131–138.
5. Carducci M, Bozzetti M, Spezia M. et al. Treatment of a refractory skin ulcer using punch graft and autologous platelet-rich plasma. *Case reports in dermatological medicine*. 2016;2016:7685939.
6. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366(9498):1736-1743.
7. Поворознюк В. В., Бистрицька М.А., Мусієнко А.С. Остеопороз при злоякісних новоутвореннях. *Практична медицина*. 2018;2:101-9.
8. Whitburn J, Edwards CM. Metabolism in the Tumour-Bone Microenvironment. *Current Osteoporosis Reports*. 2021:1-6.
9. Wysoczańska A, Ślęzak A, Barg E. Effects of oncological therapy on bone disorders. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism*. 2017;23(4):197-203.
10. Bedatsova L, Drake MT. The skeletal impact of cancer therapies. *British journal of clinical pharmacology*. 2019;85(6):1161-8.
11. Tsuzuki S, Park SH, Eber MR, Peters CM, Shiozawa Y. Skeletal complications in cancer patients with bone metastases. *International Journal of Urology*. 2016;23(10):825-32.

12. Robin F, Cadiou S, Albert JD, Bart G, Coiffier G, Guggenbuhl P. Methotrexate osteopathy: five cases and systematic literature review. *Osteoporos Int.* 2021;32:225–32.

13. Ілляшенко ВЮ, Ткач ГФ, Максимова ОС. та ін. Препарувальний лоток для фіксації дрібних лабораторних тварин. Патент на корисну модель № 145726. МПК 2021.01. № и 2020 05430; заявл. 2020-08-21; опубл. 2020-12-28, Бюл. № 24.

14. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 2008;51:216-226.

15. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (Review). *Acta Physiologica Hungarica.* 2014;101(4):408-420.

16. Hu DP, Ferro F, Yang F, Taylor AJ, Chang W, Miclau T, Marcucio RS, Bahney CS. Cartilage to bone transformation during fracture healing is coordinated by the invading vasculature and induction of the core pluripotency genes. *Development.* 2017;144(2):221-234.

17. Hadji P. Cancer Treatment-Induced Bone Loss in women with breast cancer. *BoneKey reports.* 2015;4:692. DOI: [10.1038/bonekey.2015.60](https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.60)

18. Rana T, Chakrabarti A, Freeman M, Biswas S. Doxorubicin-Mediated Bone Loss in Breast Cancer Bone Metastases Is Driven by an Interplay between Oxidative Stress and Induction of TGF $\beta$ . *PLoS ONE.* 2013;8(10):78043. DOI: [10.1371/journal.pone.0078043](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078043)

19. Pountos I, Giannoudis PV. Effect of methotrexate on bone and wound healing. *Expert Opinion on Drug Safety.* 2017;16(5):535-45. DOI: [10.1080/14740338.2017.1310839](https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1310839)

20. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *American Journal of physiology. Endocrinology and Metabolism.* 2012;302(11):E1440-9. DOI: [10.1152/ajpendo.00587.2011](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00587.2011)

21. Fan C, Georgiou KR, Morris HA, McKinnon RA, Keefe DM, Howe PR, et.al. Combination breast cancer chemotherapy with doxorubicin and cyclophosphamide damages bone and bone marrow in a female rat model. *Breast cancer research and treatment*. 2017;165(1):41-51. DOI: 10.1007/s10549-017-4308-3
22. Hernandez-Becerra E, Londoño-Restrepo SM, Hernández-Urbiola MI, Jimenez-Mendoza D, Aguilera-Barreiro MDLÁ, Perez-Torrero E, et.al. Determination of basal bone mineral density in the femur bones of male and female Wistar rats. *Laboratory Animals*. 2021;55(1):30-42. DOI: 10.1177%2F0023677220922566
23. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. *Clinical oral implants research*. 2017;28(9),e101-e110. DOI: 10.1111/clr.12936
24. Григор'єва НВ, Поворознюк ВВ, Гопкалова ІВ, Орлик ТВ. Вікові та статеві особливості показників мінеральної щільності кісткової тканини щурів. *Фізіол. журнал*. 2017;63(1):26-32.
25. Handforth C, D'Oronzo S, Coleman R. et al. Cancer Treatment and Bone Health. *Calcif Tissue Int*. 2018;102:251–264. DOI:10.1007/s00223-017-0369-x
26. Quach JM, Askmyr M, Jovic T, Baker EK, Walsh NC, Harrison SJ, et al. Myelosuppressive therapies significantly increase pro-inflammatory cytokines and directly cause bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2015;30(5):886-897. DOI:10.1002/jbmr.2415
27. Straszkowski L, Jovic T, Castillo-Tandazo W, Ritchie D, Purton L. Effects of chemotherapy agents used to treat pediatric acute lymphoblastic leukemia patients on bone parameters and longitudinal growth of juvenile mice. *Experimental Hematology*. 2020;82:1-7. DOI:10.1016/j.exphem.2020.01.010
28. Liu Y., Cui Y., Chen Y., Gao X., Su Y., Cui L. Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in

healthy Sprague Dawley rats. *Clinical interventions in aging*.2015;10:1245. DOI:10.2147/CIA.S85225

29. Fonseca H, Carvalho A, Esteves J, Esteves VI, Moreira-Gonçalves D, Duarte JA. Effects of doxorubicin administration on bone strength and quality in sedentary and physically active Wistar rats. *Osteoporosis International*. 2016;27(12):3465-3475. DOI:10.1007/s00198-016-3672-x

30. Fan C, Georgiou, KR, McKinnon RA, Keefe DM, Howe PR, Xian CJ. Combination chemotherapy with cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil causes trabecular bone loss, bone marrow cell depletion and marrow adiposity in female rats. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2016;34(3):277–290. DOI:10.1007/s00774-015-0679-x.

31. Fan CM, Foster BK, Hui SK, Xian CJ. Prevention of bone growth defects, increased bone resorption and marrow adiposity with folinic acid in rats receiving long-term methotrexate. *PloS one*. 2012;7(10):e46915. DOI:10.1371/journal.pone.0046915

32. Shandala T, Shen NgY, Hopwood B, Yip YC, Foster BK, Xian CJ. The role of osteocyte apoptosis in cancer chemotherapy-induced bone loss. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(7):2889-2897. DOI:10.1002/jcp.23034

33. Georgiou KR, King TJ, Scherer MA, Zhou H, Foster BK, Xian CJ. Attenuated Wnt/ $\beta$ -catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats. *Bone*. 2012;50(6):1223-33. DOI:[10.1016/j.bone.2012.03.027](https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.03.027)

34. Gawade PL, Hudson MM, Kaste SC, Neglia JP, Wasilewski-Masker K, Constine LS, Ness KK. A systematic review of selected musculoskeletal late effects in survivors of childhood cancer. *Current pediatric reviews*. 2015;10(4):249-62 PMID:25403639.

35. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 2018;185:240-75. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.09.028



36. Paschou SA, Dede AD, Anagnostis PG, Vryonidou A, Morganstein D, Goulis DG. Type 2 diabetes and osteoporosis: a guide to optimal management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(10):3621-3634. doi: 10.1210/jc.2017-00042.

37. Hygum K, Starup-Linde J, Langdahl BL. Diabetes and bone. *Osteoporos Sarcopenia.* 2019;5(2):29-37. doi: 10.1016/j.afos.2019.05.001.

38. Sanches CP, Vianna AG, Barreto FC. The impact of type 2 diabetes on bone metabolism. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9:85. doi: 10.1186/s13098-017-0278-1.

39. Murray CE, Coleman CM. Impact of Diabetes Mellitus on Bone Health. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4873. doi: 10.3390/ijms20194873

40. Panahi G, Pasalar P, Zare M, Rizzuto R, Meshkani R. High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF- $\kappa$ B, and MAPK pathways in HepG2 cells. *Arch. Physiol. Biochem.* 2018;124:468-474. doi: 10.1080/13813455.2018.1427764.

41. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 2003;144:346-352.

42. Yu T, Pan H, Hu Y, Tao H, Wang K, Zhang C. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J Orthop Surg Res.* 2017;12(1):178. doi: 10.1186/s13018-017-0665-1

43. Malygina MA, Borovkova NV, Sakharova OM, Ponomarev IN. The use of platelet-rich plasma in diseases and injuries of the musculoskeletal system. *Transplantologiya.* 2017;9(4):325-34. doi: 10.23873/2074-0506-2017-9-4-325-334

44. 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. doi: 10.3389/fendo.2018.00006

45. Mangialardi G, Ferland-McCollough D, Maselli D, Santopaolo M, Cordaro A, Spinetti G, Sambataro M, Sullivan N, Blom A, Madeddu P. Bone

marrow pericyte dysfunction in individuals with type 2 diabetes. 2019;62(7):1275-1290. doi: 10.1007/s00125-019-4865-6

46. 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):2585-2596. doi: 10.1007/s00198-018-4650-2.

47. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011;42(6):551-555.

48. Brown ML, Yukata K, Farnsworth CW, Chen DG, Awad H, Hilton MJ, O'Keefe RJ et al. Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e99656. doi: 10.1371/journal.pone.0099656

49. Sadighi A, Bazavar M, Niafar M, Tabrizi A, Doorandish N. Effect of diabetes mellitus type II on long bones fractures healing. *Advances in Bioscience and Clinical Medicine.* 2015;3(3):10-16. doi: 10.7575/aiac.abcm.15.03.03

50. Дедух НВ, Сыкал АА. Регенерация кости при сахарном диабете 2 типа (экспериментальное исследование). *Проблемы остеологии.* 2015;18(4): 12-18.

51. Baimukanova G, Miyazawa B, Potter DR, Gibb SL, Keating S, Danesh A, Beyer A et al. The effects of 22°C and 4°C storage of platelets on vascular endothelial integrity and function. 2016;56:52-64. doi: 10.1111/trf.13455.

52. Giraldo CE, Álvarez ME, Carmona JU. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet Res.* 2015;11:60. doi: 10.1186/s12917-015-0370-4

53. Tengbo Yu, Huazheng Pan, Yanling Hu et al. Autologous platelet-rich plasma induces bone formation of tissue-engineered bone with bone marrow mesenchymal stem cells on beta-tricalcium phosphate ceramics. *J. Orthop. Surg. Res.* 2017;12:178. doi: 10.1186/s13018-017-0665-1.

54. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(3):417-20. doi: 10.1302/0301-620X.89B3.18491.

55. Івченко ДВ, Мірошніков ВВ. Застосування аутологічної плазми, що збагачена тромбоцитами, для оптимізації репаративної регенерації кісткової тканини при остеопенії. *Патологія.* 2018;15,2(43):248-258. doi: 10.14739/2310-1237. 2018.2.141333

56. Devi TR, Hijam D, Dubey A, Debnath S, Oinam P, Devi NGT, Singh WG. Study of Serum Zinc and Copper levels in Type 2 Diabetes Mellitus. *International Journal of Contemporary Medical Research.* 2016;3(4): 1036-1040.

57. Гладких Ф. В., Степанюк Н. Г. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування вінборону з метою підвищення знеболювальної активності ібупрофену. *Експериментальна та клінічна фармакологія.* 2016. № 3 (22). С.41–48.

58. Тертишний С.І., Шаврін В.О. Патоморфологічні зміни легень і функціонально-біохімічні показники респіраторної функції у хворих на внутрішньомозкові крововиливи. *Запорозький медичинський журнал.* 2013. № 4. С. 25–27.

59. Teichert T., Vossoughi M. Association between traffic-related air pollution, subclinical inflammation and impaired glucose metabolism: results from the SALIA study. *PLOS One.* 2013. Vol. 8. P. 1–9.

60. Weichenthal S., Daniel L. Crouse. Oxidative burden of fine particulate air pollution and risk of cause-specific mortality in the Canadian census health and environment cohort (CanCHEC). *Environmental research.* 2016. Vol. 146. P. 92–99.

61. Schmidt A., Jung J. The association between active participation in a sports club, physical activity and social network on the development of lung cancer in smokers: case-control study. *Research notes.* 2012. Vol. 5. P. 1–9.

62. Mijacika T., Zeljko D. Sport-related lung injury during breath-hold diving. *Sport-related lung disease*. 2016. Vol. 25. P. 506–512.
63. Stefansson K. A. Variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral disease. *Nature*. 2015. Vol. 9. P. 638–642.
64. Erica A. Waters. Concern about unintended negative consequences of informing the public about multifactorial risk may be premature for young adult smokers. *Health psychology*. 2014. Vol. 19(4). P. 720–736.
65. Futoshi Misutani R., Terra-Fillu M. Hard metal lung disease. *Jornal Brasileiro de pneumologia*. 2016. Vol. 42. P. 447–452.
66. Melda Saglam, Naciye Vardar-Yagli. Functional capacity, physical activity, and quality of life in hypoxemic patients with chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*. 2016. Vol. 10. P. 423–428.
67. Фещенко Ю. І., Яшина Л. О., Назаренко К. В. Можливості діагностики гіперінфляції та емфіземи легень у хворих у поєднанні з перебігом бронхіальної астми та хронічного обструктивного захворювання легень на первинному та спеціалізованому рівнях надання медичної допомоги. *Український пульмонологічний журнал*. 2018. С. 7–13.
68. Wei Zhou, Mei-Hua Chen. Influence of phthalates on glucose homeostasis and atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *BMC Endocrine Disorders*. 2015. Vol. 15. P. 1–7.
69. Rupadevi Muthaian, Rajaa Muthu Pakirisamy. Hypertension influences the exponential progression of inflammation and oxidative stress in streptozotocin- induced diabetic kidney. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2017. Vol. 7. P. 159–163.
70. Seokjae Park, Krishna Chaitanya Sadanala. A metabolomic approach to understanding the metabolic link between obesity and diabetes. *Molecules and Cells*. 2015. Vol. 38. P. 587–596.
71. Gimenes C., Gimenes R. Low Intensity Physical Exercise Attenuates Cardiac Remodeling and Myocardial Oxidative Stress and Dysfunction in Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*. 2015. Vol. 2. P. 1–8.

72. Aysha Hasna, Kavitha Meiyappan. Is urolithiasis associated with Increased levels of high sensitivity C-reactive protein and interleukin-6 in diabetic patients. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015. Vol. 9. P. 1–3.

73. Dinender K. Singla, Reetu D. Singla. Fibroblast growth factor-9 enhances M2 macrophage differentiation and attenuates adverse cardiac remodeling in the infarcted diabetic heart. *PLOS One*. 2015. Vol. 7. P. 1–11.

74. Suvi E. Heinonen, Guillem Genové. Animal models of diabetic macrovascular complications: key players in the development of new therapeutic approaches. *Journal of Diabetes Research*. 2015. Vol. 2. P. 1–9.

75. Stepniewski I., Kachamakova-Trojanowska N. Induced pluripotent stem cells as a model for diabetes investigation. *Scientific reports*. 2015. Vol. 5. P. 1–17.

76. Jacob E. Kohlmeier, Shannon C. Miller. Cutting edge: antigen is not required for the activation and maintenance of virus-specific memory CD-8 T-cells in the lung airways. *The journal of immunology*. 2017. Vol. 2007. P. 21–25.

77. Magdalena Kozakowska, Jerzy Kotlinowski. Myoblast-conditioned media improve regeneration and revascularization of ischemic muscles in diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015. Vol. 6. P. 1–16.

78. Патоморфологія / за ред. В. Марковського та ін. Київ: ВСВ «Медицина», 2015. 936 с.

79. Rekha Jagadapillai, Madhavi J. Rane. Diabetic Microvascular Disease and pulmonary fibrosis: the contribution of platelets and systemic inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17. P. 1–13.

80. Стечишин І. П., Посохова К. А. Ефективність препаратів кверцетину за експериментального цукрового діабету. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2014. № 6. С. 66–71.

81. Yang J, Chen S, Zong Z, Yang L, Liu D, Bao Q, Du W. The increase in bone resorption in early-stage type I diabetic mice is induced by RANKL secreted by increased bone marrow adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Apr 30;525(2):433-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.02.079

82. Schacter GI, Leslie WD. Diabetes and Bone Disease. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2017;46(1):63-85.

83. Wongdee K, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Derangement of calcium metabolism in diabetes mellitus: negative outcome from the synergy between impaired bone turnover and intestinal calcium absorption. *J Physiol Sci*. 2017 Jan;67(1):71-81.

84. Щубелка ХМ, Олексик ОТ, Ганич ТМ. Стан опорно-рухового апарату у хворих на цукровий діабет. *Міжнародний ендокринологічний журнал*. 2017;13(6):450-54.

85. Kanazawa I. Interaction between bone and glucose metabolism [Review]. *Endocr J*. 2017 Nov 29;64(11):1043-1053.

86. Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, et al. The effects of rapid-or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. *Current aging science*. 2010;3(1):26-33.

87. Joseph TV, Caksa S, Misra M, Mitchell DM. Hip Structural Analysis Reveals Impaired Hip Geometry in Girls With Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;1;105(12):e4848–56. DOI: 10.1210/clinem/dgaa647

88. Matsumoto T, Endo I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2021 Jan;39(1):91-105.

89. Ming J, Cronin SJF, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Front Oncol*. 2020 Aug 7;10:1283.

90. Jiao H, Xiao E, Graves DT. Diabetes and its effect on bone and fracture healing. *Current osteoporosis reports*. 2015;13(5):327-35.

91. Ofori JK, Karagiannopoulos A, Nagao M, Westholm E, Ramadan S, Wendt A, et al. Human Islet MicroRNA-200c is Elevated in Type 2 Diabetes and Targets the Transcription Factor ETV5 to Reduce Insulin Secretion. *Diabetes*. 2021 Nov 9;db210077. DOI: 10.2337/db21-0077

92. Rubin MR. Bone cells and bone turnover in diabetes mellitus. *Current osteoporosis reports*. 2015;13(3):186-91.

93. Rubin MR. Skeletal fragility in diabetes. *Ann N Y Acad Sci.* 2017 Aug;1402(1):18-30. DOI: 10.1111/nyas.13463
94. Starup-Linde J, Vestergaard P. Management of endocrine disease: Diabetes and osteoporosis: cause for concern. *Eur J Endocrinol.* 2015 Sep;173(3):R93-9.
95. Perkins BA, Sherr JL, Mathieu C. Type 1 diabetes glycemic management: Insulin therapy, glucose monitoring, and automation. *Science.* 2021;30;373(6554):522-7. DOI: 10.1126/science.abg4502
96. Maghbooli Z, Shabani P, Gorgani-Firuzjaee S, Hossein-Nezhad A. The association between bone turnover markers and microvascular complications of type 2 diabetes. *J Diabetes Metab Disord.* 2016 Nov 7;15:51DOI: 10.1186/s40200-016-0274-2
97. Cunha JS, Ferreira VM, Maquigussa E, Naves MA, Boim MA. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell and tissue research.* 2014;358(1):249-256.
98. Ay B, Parolia K, Liddell RS, Qiu Y, Grasselli G, Cooper DML, et al. Hyperglycemia compromises Rat Cortical Bone by Increasing Osteocyte Lacunar Density and Decreasing Vascular Canal Volume. *Commun Biol.* 2020 Jan 9;3(1):20.
99. Pacicca, DM, Brown T, Watkins D, Kover K, Yan Y, Prideaux M, Bonewald L. Elevated glucose acts directly on osteocytes to increase sclerostin expression in diabetes. *Scientific reports.* 2019;9(1):17353.
100. Katra B, Fedak D, Matejko B, Małecki MT, Wędrychowicz A. The enteroendocrine-osseous axis in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Bone.* 2021 Dec;153:116105. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116105.
101. Mathiesen IH, Hitz MF, Katzenstein TL, Oturai P, Skov M, Jørgensen NR, et al. Markers of bone turnover are reduced in patients with CF related diabetes; the role of glucose. *J Cyst Fibros.* 2019 May;18(3):436-441.
102. Kanazawa I, Sugimoto T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Intern Med.* 2018;1;57(19):2773-2785.

103. El Malahi A, Van Elsen M, Charleer S, Dirinck E, Ledeganck K, Keymeulen B, et al. Relationship Between Time in Range, Glycemic Variability, HbA1c, and Complications in Adults With Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;18;107(2):570-81. DOI: 10.1210/clinem/dgab688

104. Hoang M, Jentz E, Janssen SM, Nasteska D, Cuzzo F, Hodson DJ, et al. Isoform-specific roles of prolyl hydroxylases in the regulation of pancreatic  $\beta$ -cell function. *Endocrinology.* 2021;28:bqab226. DOI: 10.1210/endocr/bqab226

105. Hunt HB, Pearl JC, Diaz DR, King KB, Donnelly E. Bone Tissue Collagen Maturity and Mineral Content Increase With Sustained Hyperglycemia in the KK-Ay Murine Model of Type 2 Diabetes. *J Bone Miner Res.* 2018;33(5):921-9.

106. Acevedo C, Sylvia M, Schaible E, Graham JL, Stanhope KL, Metz LN, et al. Contributions of Material Properties and Structure to Increased Bone Fragility for a Given Bone Mass in the UCD-T2DM Rat Model of Type 2 Diabetes. *J Bone Miner Res.* 2018 Jun;33(6):1066-75.

107. Wijaya MC, Sari GM, Tinduh D. Hyperglycemia caused reduction of cortical bone thickness in streptozotocin-induced diabetic rat. *Bali Medical Journal/* 2016;6(1):161-163.

108. Al-Hariri M. Sweet Bones: The Pathogenesis of Bone Alteration in Diabetes. *J Diabetes Res.* 2016;2016:6969040.

109. Christensen MB, Lund A, Calanna S, Jørgensen NR, Holst JJ, Vilsbøll T, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) Inhibits Bone Resorption Independently of Insulin and Glycemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;1;103(1):288-94.

110. Zhang J, Chen X, Chen B, Tong L, Zhang Y. Tetrahydroxy stilbene glucoside protected against diabetes-induced osteoporosis in mice with streptozotocin-induced hyperglycemia. *Phytother Res.* 2019;33(2):442-51.

111. Shah VN, DiMeglio LA. Sweet bones: diabetes effects on bone. In: Burr DB, Allen MR, eds. *Basic and applied bone biology.* London: Academic Press; 2019, p. 425-41.



112. Hu P, McKenzie JA, Buettmann EG, Migotsky N, Gardner MJ, Silva MJ. Type 1 diabetic Akita mice have low bone mass and impaired fracture healing. *Bone*. 2021 Jun;147:115906. DOI: 10.1016/j.bone.2021.115906

113. Lekkala S, Taylor EA, Hunt HB, Donnelly E. Effects of Diabetes on Bone Material Properties. *Curr Osteoporos Rep*. 2019 Dec;17(6):455-64. DOI: 10.1007/s11914-019-00538-6

114. Asrih M, Dusaulcy R, Gosmain Y, Philippe J, Somm E, Jornayvaz FR, et al. Growth differentiation factor-15 prevents glucotoxicity and connexin-36 downregulation in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;8;541:111503. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111503

115. Ivanov EV, Morozova MP, Rzhavina EM. et al. Keratinocytes differentiation and wound healing in rats with streptozotocin – induced diabetes and severe hyperglycemia. *Diabetes Mellitus*. 2020;23(1):19-28. doi: 10.14341/DM10017

116. Phillips A, Mehl AA. Diabetes mellitus and the increased risk of foot injuries. *J Wound Care*. 2015;24(5):4-7. doi:10.12968/jowc.2015.24.Sup5b.4

117. Zhang XN, Ma ZJ, Wang Y. et al. Angelica dahurica ethanolic extract improves impaired wound healing by activating angiogenesis in diabetes. *PLoS One*. 2017;12(5): e0177862. doi: 10.1371/journal.pone.0177862.

118. Efimov EV, Khoroshkevich AV. Features of wound process affected by diabetes mellitus. *Wounds and wound infections*. 2015;2(3):30-35. doi: 10.17650 / 2408-9613-2015-2-3-30-35

119. Medvedev VL, Kogan MI, Mihailov IV, Lepetunov SN. Platelet-rich autologous plasma: what is it and for what? *Urology Herald*. 2020;8(2):67-77. <https://doi.org/10.21886/2308-6424-2020-8-2-67-77>

120. Roubelakis MG, Trohatou O, Roubelakis A. et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev*. 2014;10:417-428. doi: 10.1007/s12015-013-9494-8

121. Laposy CB, Nai GA, Giuffrida R, Nogueira RM. Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir. Bras.* 2015;30:209-215. doi: 10.1590/S0102-865020150030000008

122. Nicoletti G, Saler M, Villani L. et al. Platelet rich plasma enhancement of skin regeneration in an ex-vivo human experimental model. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:2. doi:10.3389/fbioe.2019.00002