



## Розділ IV. Фізіологія людини і тварини

УДК 616.379–008.64:616.71–091–092.9

DOI <https://doi.org/10.29038/NCBio.21.1.85-92>

### Структурно-функціональні зміни остеобластів за умов дії хронічної гіперглікемії

Аліна Понирко, Тетяна Теслик, Тетяна Рябенко

Медичний інститут СумДУ, Суми, Україна

Адреса для листування: [ponyrkoalina123@gmail.com](mailto:ponyrkoalina123@gmail.com)

Отримано: 19.05.21; прийнято до друку: 15.06.21; опубліковано: 02.09.21

**Резюме.** Метою нашого дослідження було вивчення структурно-функціональних змін остеогенних клітин довгих трубчастих кісток щурів старечого віку та визначення взаємозв'язку між ультрамікроскопічною будовою остеобластів та інтенсивністю експресії остеопонтину та RANKL за умов хронічної гіперглікемії. Експеримент моделювали шляхом інтраперитонеального введення одноразової ін'єкції дигідрату алоксану в дозі 150 мг/кг маси тіла на 0,9% розчину хлориду натрію. Для дослідження структури стегнової та плечової кісток використовували такі методи: трансмісійної електронної мікроскопії та імуногістохімічний. При дослідженні остеобластів та остеоцитів оцінювали наступні показники: цілісність клітинних елементів та мембранних органел, вакуолізацію цитоплазми.

В результаті експерименту було встановлено, що в старечих щурів за умов тривалої гіперглікемії спостерігається значна гіпертрофія гЕПС, наростаюча деструкція органел у цитоплазмі відповідно до збільшення терміну дії хронічної гіперглікемії. Починаючи з 30 доби експерименту у щурів старечого віку було виявлено гіперфункцію остеобластів як адаптивну реакцію на підвищення рівня глюкози та їх виражену реакцію у вигляді значної гіпертрофії гЕПС, деструкції органел у цитоплазмі та набуханні мітохондрій із подальшим активним прогресуванням аж до 180 доби. Відзначається формування залишкових тілець, що є ознакою компенсаторної реакції.

Пригнічення рівня експресії остеопонтину є наслідком підвищення рівня глюкози, що в свою чергу порушує нормальне формування кісткової тканини за умов хронічної гіперглікемії. Імуногістохімічне дослідження підтвердило порушення будови і функціонування остеобластів та деструктивні зміни в остеоцитах, що проявлялось у зменшенні експресії остеопонтину (одного з маркерів формування кісткової тканини) та поступовим збільшенням показника RANKL (маркер, що бере безпосередню участь у кістковій резорбції).

**Ключові слова:** ультрамікроструктура, довгі трубчасті кістки, гіперглікемія, остеогенні клітини.

### Structural and functional changes of osteoblasts under conditions of chronic hyperglycemia

Alina Ponyrko, Tetiana Teslyk, Tetiana Riabenko

Medical Institute, Sumy, Ukraine

Correspondence: [ponyrkoalina123@gmail.com](mailto:ponyrkoalina123@gmail.com)

**Abstract.** The aim of our study was to examine the structural and functional changes of osteogenic cells of the long tubular bones of elderly rats and to determine the relationship between the ultramicroscopic structure of osteoblasts and the intensity of osteopontin and RANKL expression in chronic hyperglycemia. The experiment was simulated by intraperitoneal injection of a single injection of alloxan dihydrate at a dose of 150 mg / kg body weight in 0.9% sodium chloride solution. The following methods were used to study the structure of the femur and humerus: transmission electron microscopy and immunohistochemical. In the study of osteoblasts and osteocytes evaluated the following indicators: the integrity of cellular elements and membrane organelles, vacuolation of the cytoplasm.

As a result of the experiment, it was found that in senile rats under conditions of prolonged hyperglycemia, there is a significant hypertrophy of the EPS, increasing the destruction of organelles in the cytoplasm, respectively, increasing the duration of chronic hyperglycemia. From the 30th day of the experiment, osteoblast hyperfunction was detected in elderly rats as an adaptive response to elevated glucose levels and their pronounced response in the form of significant hypertrophy of EPS, destruction of organelles in the cytoplasm and swelling of mitochondria with subsequent active progression up to 180 days. There is the formation of residual cells, which is a sign of a compensatory reaction.

Suppression of osteopontin expression is a consequence of elevated glucose levels, which in turn disrupts the normal formation of bone tissue in chronic hyperglycemia. Immunohistochemical studies confirmed disturbances in the structure and function of osteoblasts and destructive changes in osteocytes, manifested by decreased expression of osteopontin (one of the markers of bone formation) and a gradual increase in RANKL (a marker directly involved in bone resorption).

**Keywords:** ultramicrostructure, long tubular bones, hyperglycemia, osteogenic cells.

## ВСТУП

В основі цукрового діабету лежить порушення гомеостазу інсуліну, а саме інсулінорезистентності периферичних тканин та руйнації  $\beta$ -клітин підшлункової залози, це призводить до ряду патологічних змін майже всіх тканин організму внаслідок глюкозотоксичності і ліпотоксичності з наступним розвитком судинних ускладнень. Відомо, що глюкоза є основним енергетичним джерелом для остеокластів, пропорційно підвищуючи їх резорбційну активність [1, 2, 3, 4]. Гіперглікемія має значний негативний вплив на метаболізм кісток, порушуючи функцію остеогенних клітин. Крім того, вона призводить до неферментативного глікозування білків кісткового матриксу, в тому числі і колагену I типу, що порушує якість кісткової тканини.

Згубна дія гіперглікемії порушує метаболічну функцію остеобластів, що в свою чергу впливає на зниження біосинтезу остеокальцину, остеоонектину, остеопонтину. Відтак зафіксовано зниження інсуліноподібного фактору росту – 1, що стимулює остеобласти до біосинтезу білків кісткового матриксу та його мінералізації [2, 5, 6, 7, 8].

Патологічні зміни кісткової тканини при цукровому діабеті були предметом вивчення протягом багатьох років, проте окремі аспекти патоморфології та патофізіології цієї хвороби ще не з'ясовані. Зокрема, існує принаймні дві гіпотези

щодо патологічного ремоделювання кістки в умовах цукрового діабету (ЦД). Згідно з однією, гіперглікемія пригнічує остеогенез (функцію остеобластів) та посилює резорбцію (функцію остеокластів) [9, 10, 11, 12]. Згідно з іншою, при ЦД, зокрема у жінок у постменопаузі, на тлі інгібування остеогенезу, процес резорбції залишається неушкодженим, або знижується формування, активність і рухливість остеокластів, що в підсумку призводить до втрати кісткової маси та ускладнення відновлення мікротріщин [13, 14, 15]. У зв'язку з цим, досить актуальними можна вважати експериментальні дослідження з моделювання хронічної гіперглікемії на щурах для вивчення патологічного підґрунтя розвитку діабетичної хвороби кісток [16]. Тому **метою** нашого експерименту було вивчення структурно-функціональних змін остеогенних клітин довгих трубчастих кісток щурів старечого віку та визначення зв'язку між ультрамікроскопічною будовою остеобластів та інтенсивністю експресії білків - маркерів остеогенезу за умов хронічної гіперглікемії.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експеримент було проведено на 72 лабораторних щурах старечого віку. Щури були розділені на дві групи: експериментальну (n=36) та

контрольну (n=36). Експеримент моделювали шляхом інтраперитонеального введення одноразової ін'єкції дигідрату алоксану щурам старечого віку масою 178– 223 г (віварій медичного інституту СумДУ), після 10-годинного голодування, на тлі нормальних показників глюкози крові. Кожна група щурів була розділена на 6 підгруп (по 6 тварин у кожній): 1 гр. – 30 діб, 2 гр. – 60, 3 гр. – 90, 4 гр. – 120, 5 гр. – 150, 6 гр. – 180 діб. Отримані показники щурів експериментальної групи порівнювали з показниками тварин контрольної групи. Щурів виводили з експерименту на кожну 30 добу шляхом декапітації під легким тіопентал-натрієвим наркозом. Для проведення електронно-мікроскопічного аналізу в піддослідних щурів після декапітації у визначені терміни видаляли обидві стегнові та плечові кістки. Після цього фрагменти діяфізів та епіфізів розміром близько 1 мм<sup>3</sup> фіксували у фіксаторі Карновського. Фрагменти кісткової тканини декальцинували в розчині трилону Б, потім використовували фіксатор чотириокис осмію, з подальшою дегідратацією у серії етилових спиртів зростаючої концентрації та ацетону. Зразки просочували в суміші епоксидних смол – арадиту та епону, а потім заливали в блоки [17]. Отримані блоки заточували та виготовляли ультратонкі зрізи товщиною 0,04 мкм на ультрамікроскопі УМТП-3М (Суми, Україна). Зрізи

контрастували розчином Рейнольдса та уранілацетатом [18]. Контрастовані зрізи аналізували та фотографували за допомогою електронного мікроскопа ЕМВ-100БР (Суми, Україна), що просвічувався.

Досліджуючи остеогенні клітини, оцінювали такі критерії: цілісність клітинних елементів і мембранних органел, ступінь вакуолізації цитоплазми та наявність мінералізації кісткового матриксу.

Імуногістохімічне (ІГХ) дослідження проводили на парафінових зрізах (4×10–6м) декальцинованої кісткової тканини стегнових і плечових кісток щурів після депарафінації та зневоднення у ксилолі й спиртах у послідовних знижуючих концентраціях. Демаскування антигенів проводили з застосуванням водяної бані «ВБ-4» при відносній температурі 97–98 °С у цитратному буфері (рН – 7,0). Наявність клітинної реакції антиген - антитіло було візуалізовано за допомогою системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen», яка включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, пригнічення неспецифічного фонового забарвлення за допомогою «Ultra V block», підсилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцеву візуалізацію діамінобензидином (ДАБ) та забарвленням ядер гематоксиліном Маєра. У дослідженнях використана така панель антитіл:

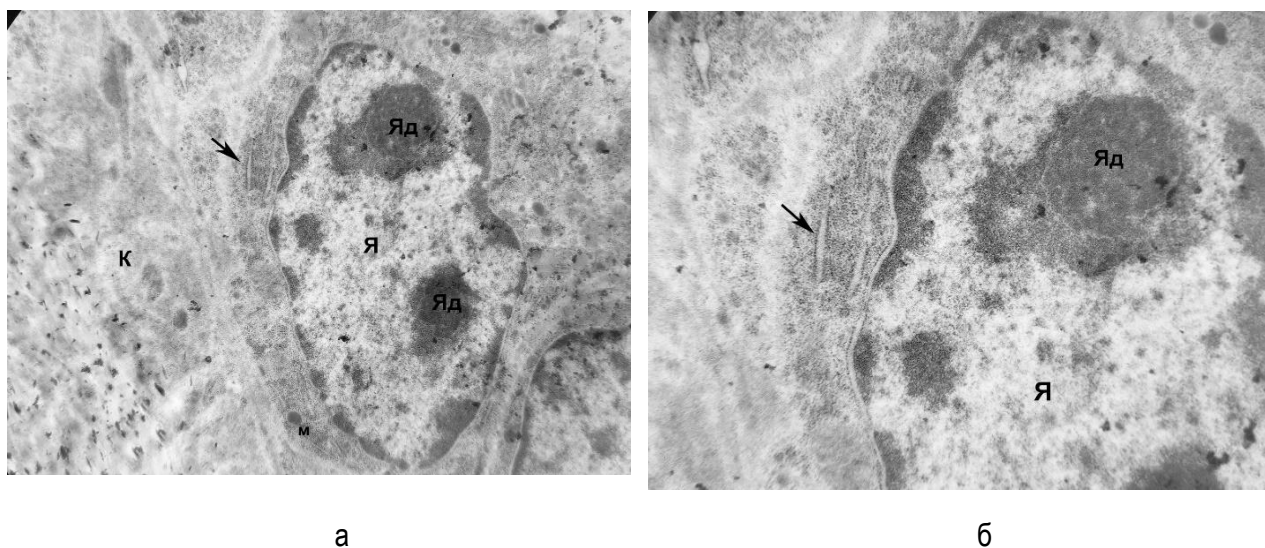
Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині
Остеопонтін	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма
RANKL	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма+мембрана

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програми Statistica v.10 («StatSoft Inc.», США). Для оцінки достовірності різниць між показниками використовували непараметричний Mann-WhitneyU-test. Значимість вірогідних значень приймалась p<0.05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У щурів старечого віку на 30 добу експерименту особливістю структури остеобластів було збільшення кількості ядерець у ядрі (рис. 1, а). Це

свідчить про гіперфункцію клітини, спрямовану на синтез білка та нуклеїнових кислот. Одночасно з цим мембранні органели були слабо розвинені: поодинокі профілі гЕПС, та зрідка – мітохондрії (рис. 1). Клітини розміщувалися щільно на поверхні кісткових трабекул. Також траплялись поодинокі загиблі остеоцити та остеобласти. Кістковий матрикс мав рівномірну електронну щільність. Остеоцити мали слабкорозвинені органели та розміщувались нерівномірно у кістковому матриксі. Відповідні зміни остеобластів спостерігались також на 60 та 90 добу і були більш вираженими.



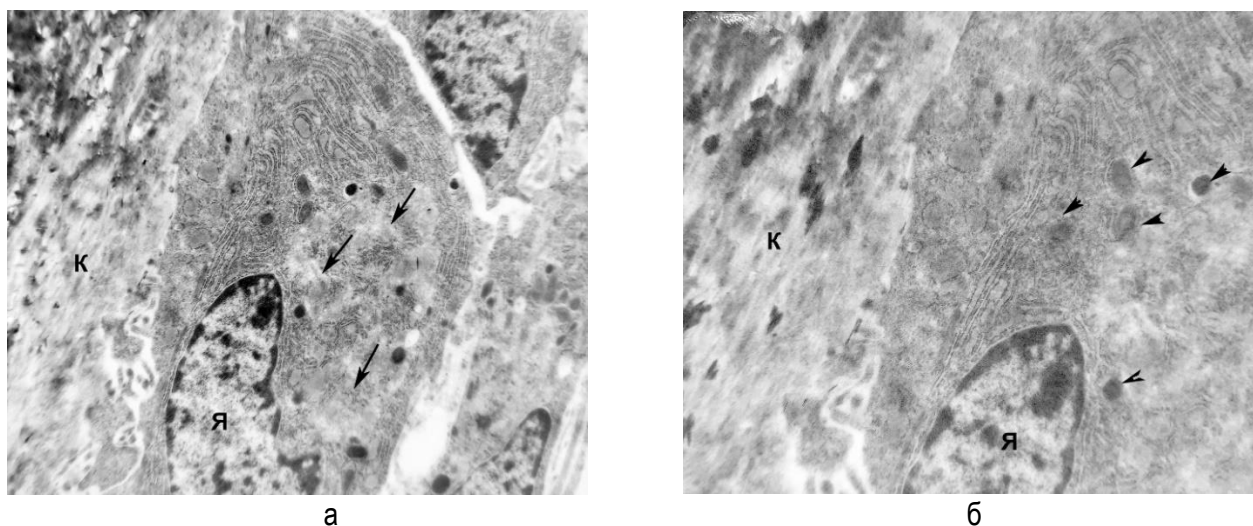
**Рис. 1.** Остеобласт з двома ядерецьми (Яд) у ядрі (Я) на поверхні кісткової трабекули (К): а) остеобласт з гЕПС (стрілка) та мітохондрією (м); б) фрагмент остеобласта, одиничні профілі гЕПС (стрілка). 30 доба спостереження. Зб.: а) 8000; б) 16800. Контрастування за Рейнольдсом.

Експресія остепонтину в діяфізі в експериментальних щурів становила  $15,06 \pm 1,48\%$ , у щурів групи контролю показники склали  $16,21 \pm 1,39\%$ , різниця показників становить  $7,6\%$ . Інтенсивність позитивно забарвлених клітин – слабка (+), в епіфізі відповідні показники склали  $17,26 \pm 1,44\%$  та  $19,10 \pm 1,41\%$  ( $p < 0,05$ ), різниця становить  $10,6\%$ , інтенсивність позитивно забарвлених клітин – слабка (+). Це може свідчити про гальмування процесів мінералізації кістки. RANKL - позитивні клітини виявлено як у діялізі, так і в епіфізі обох кісток. Експресія цього показника в діяфізі була більш інтенсивнішою за вище згаданий та становила  $26,58 \pm 1,40\%$  у щурів експериментальної групи та  $24,33 \pm 1,53\%$  ( $p < 0,05$ ) у щурів групи контролю, в епіфізі  $28,61 \pm 1,64\%$  та  $25,98 \pm 1,49\%$  ( $p < 0,05$ ) відповідно, інтенсивність позитивно забарвлених клітин – помірна (++) . На 90 добу спостереження резорбційні процеси проявлялись у звуженні шарів діяфізу з одночасним збільшенням діаметрів остеонів. В епіфізі спостерігалась відсутність контакту між трабекулами, деякі з них мали сліпі закінчення та не

контактували один з одним. Експресія остепонтину в діяфізі достовірно показників не відзначалась та становила  $14,73 \pm 1,68\%$  та  $16,08 \pm 1,36\%$ , різниця показників склала  $9,2\%$ . Показники експресії RANKL дещо збільшились та становили  $26,92 \pm 0,76\%$  у щурів експериментальної групи та  $24,70 \pm 0,87\%$  у щурів групи контролю ( $p < 0,001$ ) відповідно, різниця  $9\%$ .

На 120 та 150 добу спостереження у щурів старечого віку в остеобластах виявлено зміну форми ядра (утворення вигинів), що свідчить про гіперфункцію клітини шляхом збільшення ядерної поверхні та посилення біосинтезу білків (рис. 2, а). У цитоплазмі остеобластів виявлені дегенеративні зміни – ділянки гомогенізації та набухлі мітохондрії. гЕПС у клітинах була добре розвинена, що вказує на активний синтез компонентів матриксу (рис. 2).

Остеоцити мали слабкорозвинені органели та розміщувались у лакунах з нерівномірним контуром, зрідка траплялись клітини з вираженими дегенеративними змінами. Кістковий матрикс мав осередки нерівномірної мінералізації.

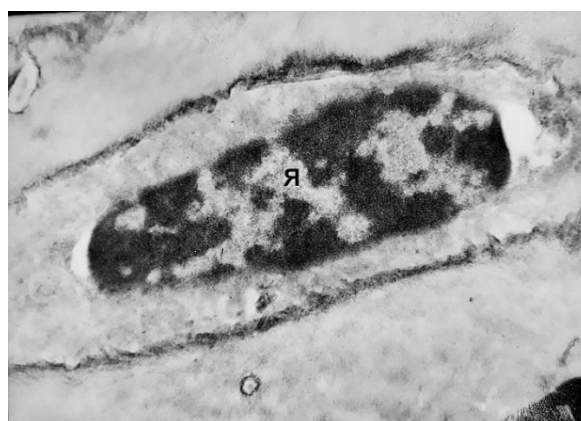


**Рис. 2.** Остеобласт із підковоподібним ядром (Я) на поверхні кісткової трабекули (К): а) остеобласт; ділянки гомогенізації цитоплазми (стрілка); б) фрагмент остеобласта; набухлі мітохондрії (стрілка). 120 доба спостереження. Зб.: а) 6000; б) 10000. Контрастування за Рейнольдсом.

Експресія остепонтину в діяфізі обох досліджуваних кісток на 120 добу спостереження була слабковираженою та не відзначалась достовірністю показників. У щурів експериментальної групи вона становила  $14,51 \pm 1,49\%$  та  $15,92 \pm 1,61\%$  у щурів групи контролю, інтенсивність забарвлення цитоплазми слабка (+). Можна також відзначити резорбцію періосту, що відзначається в його потоншенні. В епіфізах обох кісток містилися поодинокі клітини з проявами реакції. Частка позитивно забарвлених клітин становила  $16,53 \pm 1,47\%$  та  $18,64 \pm 1,58\%$  ( $p < 0.05$ ) відповідно, різниця показників склала 12,7%. Інтенсивність забарвлення цитоплазми слабко виражена (+). Спостерігаються численні ділянки немінералізованого матриксу. Показник експресії RANKL у епіфізах обох кісток значно переважав над показниками діяфізу та становив  $29,74 \pm 1,63\%$  у щурів експериментальної групи та  $26,70 \pm 1,56\%$  у щурів

групи контролю ( $p < 0.05$ ), показники діяфізу спостерігались на рівні  $27,50 \pm 1,45\%$  та  $24,92 \pm 2,10\%$  ( $p < 0.05$ ) відповідно, інтенсивність забарвлення цитоплазми сильна (+++). Це говорить про переважання процесів резорбції над кісткоутворенням. Аналогічні зміни експресії відповідних показників спостерігались і на 150 добу, проте з більш вираженим проявом.

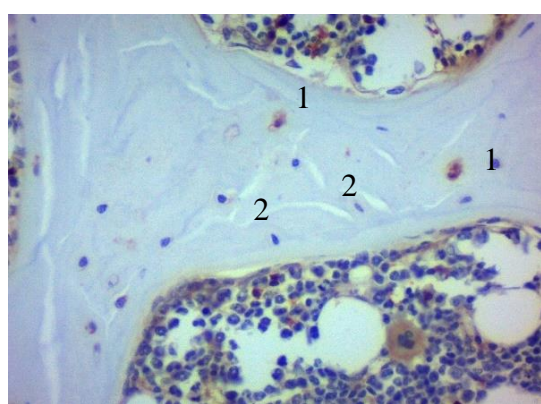
На 180 добу спостереження було зафіксовано гіперфункцію остеобластів у вигляді розширення цистерн гЕПС та набухання мітохондрій. Проте також було виявлено утворення деструктивних порожнин, що свідчить про неуспішність компенсаторної реакції клітин у відповідь на високий рівень глюкози. У кістковому матриксі виявлено загиблі остеоцити, які знаходились у розширених лакунах із нерівномірними контурами, що може бути результатом остеоцитарного остеолізу (рис. 3).



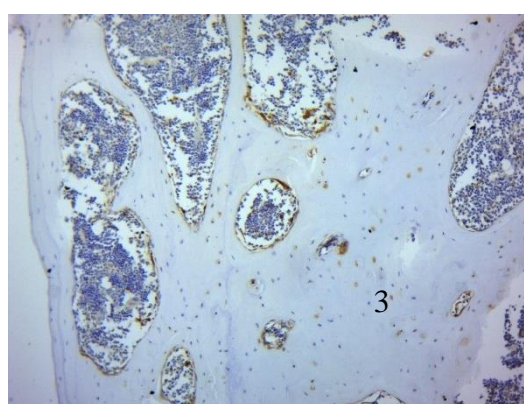
**Рис. 3.** Загиблий остеоцити у лакуні з зазубреними краями. 180 доба спостереження. Зб. 16800. Контрастування за Рейнольдсом.

ІГХ дослідження зафіксувало значні порушення структури кісткової тканини як стегнової кістки, так і плечової. У діафізах обох кісток остеопонтин експресували поодинокі клітини. Частка позитивно забарвлених клітин у щурів експериментальної групи становила  $14,13 \pm 1,45\%$ , у щурів групи контролю  $15,26 \pm 1,13\%$ , проте достовірністю показників не відзначалась, різниця показників склала  $7,9\%$ . Інтенсивність забарвлення цитоплазми переважно слабка (+). Відповідний показник епіфізу становив  $16,02 \pm 1,42\%$  та  $18,12 \pm 1,59\%$  ( $p < 0,05$ ) відповідно, різниця склала  $13\%$ . Аналіз інтенсивності показників RANKL засвідчує його посилену експресію. Відсоток

позитивно забарвлених клітин у діафізі становив  $28,16 \pm 1,56\%$  у щурів експериментальної групи та  $25,50 \pm 0,74\%$  ( $p < 0,05$ ) у щурів групи контролю, різниця показників збільшилась до  $10,4\%$ , інтенсивність забарвлення цитоплазми сильна (+++). В епіфізах досліджуваних кісток цей показник становив  $30,38 \pm 1,77\%$  та  $27,33 \pm 1,43\%$  ( $p < 0,05$ ) відповідно, різниця показників –  $11,2\%$ . Потрібно також відзначити значне зменшення щільності трабекул, наявність численних щілин, тріщин, деструктивних ділянок та наявність зруйнованих без'ядерних клітин (рис. 4). Це все може свідчити про пригнічення ремоделювання кісткової тканини в цих ділянках.



а



б

**Рис. 4.** Експресія Остеопонтин (а) 1. Поодинокі прореаговані клітини. 2. Наявність численних щілин, тріщин, деструктивних ділянок; RANKL (б) 3. Наявність посиленої експресії показника.

## ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що підвищений рівень глюкози порушує процес мінералізації у кістках, що може бути пов'язано зі зниженням активності остеобластів [5,8]. Це узгоджується з отриманими нами даними про порушення мінералізації кісткової тканини у щурів експериментальної групи. А також з виявленими патологічними порушеннями остеобластів, що призводить до поступового порушення процесів остеокластогенезу. Особливістю є те, що на всі терміни спостереження у щурів старечого віку гіперфункція остеобластів проявлялася у вигляді гіпертрофії гЕПС та зміною структури ядра – появою ядерця та зміною форми ядра для збільшення периметру ядерної мембрани. Ми також виявили загибель остеоцитів у щурів експериментальної групи починаючи з 30 доби експерименту, з подальшим активним прогресуванням аж до 180 доби.

Одним із важливих факторів впливу на клітини кісткової тканини за умов хронічної гіперглікемії є експресія маркерів остеокластичної резорбції та кісткоутворення, які секретуються остеобластами. Експериментально на щурах встановлено, що підвищення рівня глюкози пригнічує рівень експресії остеопонтину, як наслідок порушується нормальне кісткоутворення [6]. На наш погляд, посилена інтенсивність показника кісткової резорбції RANKL у щурів експериментальної групи відображає посилення проявів деструктивних змін у досліджуваних кістках під час дії хронічної гіперглікемії.

## ВИСНОВКИ

Отже, в результаті електронно-мікроскопічного аналізу встановлено, що гіперглікемія викликає дегенеративні зміни в клітинах кісткової тканини обох досліджуваних кісток щурів старечого

віку починаючи вже з 30 доби спостереження, які поступово посилюються зі збільшенням терміну дії патологічного чинника.

В експериментальному дослідженні було виявлено виражену реакцію остеобластів на високий рівень глюкози, що проявлялась у вигляді значної гіпертрофії гЕПС, деструкції органел у цитоплазмі, набуханні мітохондрій та зміні структури і форми ядра. Також у щурів старечого віку було встановлено формування залишкових тілець, що може бути ознакою компенсаторної реакції організму. Експериментально встановлено, що дегенеративні зміни остеобластів порушують нормальний рівень експресії остеопонтину та RANKL, як наслідок порушується нормальне формування кісткової тканини. Імуногістохімічний аналіз показав низький рівень експресії остеопонтину як в діалізі, так і в епіфізах досліджуваних кісток у щурів старечого віку. В подальшому інтенсивність прояву тільки зменшувалась із найменшим проявом на 180 добу експерименту. Показники експресії RANKL, навпаки, збільшувались – найменший показник прояву спостерігався на 30 добу експерименту з подальшим посиленням до 180 доби, що вказує на посилення резорбційних процесів у кістковій тканині. В результаті імуногістохімічного дослідження визначено, що в умовах хронічної гіперглікемії у щурів старечого віку експресія остеопонтину та RANKL виявлена як у діалізі, так і в епіфізах обох досліджуваних кісток, проте з різною інтенсивністю і з переважанням у трабекулярній кістковій тканині.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Williams, J. P.; Blair, H. C.; Mc Donald, J. M. Regulation of osteoclastic bone resorption by glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 235, 646–651.
2. Karim, L.; Bouxsein, M. L. Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. *Bone.* 2016; 82, 21–27.
3. Cunha, J. S.; Ferreira, V. M.; Maquigussa, E.; Naves, M. A.; Boim, M. A. Effects of high glucose and high insulin concentrations on osteoblast function in vitro. *Cell and tissue research.* 2014; 358(1), 249–256. DOI: 10.1007/s00441-014-1913-x.
4. Gennari, L.; Merlotti, D.; Valenti, R.; Ceccarelli, E.; Ruvio, M.; Pietrini, M. G.; Nuti, R. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and*

*metabolism.* 2012; 97(5), 1737–1744. DOI:10.1210/jc.2011-2958.

5. Kanazawa, I.; Sugimoto, T. Diabetes Mellitus-induced Bone Fragility. *Internal medicine* (Tokyo, Japan). 2018; 57(19), 2773–2785. DOI: 10.2169/internalmedicine.0905-18.

6. Ogawa, N.; Yamaguchi, T.; Yano, S.; Yamauchi, M.; Yamamoto, M.; Sugimoto, T. The combination of high glucose and advanced glycation end-products (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs. *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung. Hormones et metabolism.* 2007; 39(12), 871–875. DOI:10.1055/s-2007-991157.

7. Pacicca, D. M.; 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. DOI: 10.1038/s41598-019-52224-3.

8. Portal-Núñez, S.; Lozano, D.; de Castro, L. F.; de Gortázar, A. R.; Nogués, X.; Esbrit, P. Alterations of the Wnt/beta-catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS letters.* 2010; 584(14), 3095–3100. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.05.047.

9. Abdalrahman, N.; McComb, C.; Foster, J. E. et al. Deficits in trabecular bone microarchitecture in young women with type 1 diabetes mellitus. *Journal of Bone and Mineral Research.* 2015; 30(8), 1386–1393. DOI: 10.1002/jbmr.2465.

10. Wang, J. F.; Lee, M. S.; Tsai, T. L. et al. Bone Morphogenetic Protein-6 Attenuates Type 1 Diabetes Mellitus-Associated Bone Loss. *Stem Cells Translational Medicine.* 2019; 522–534. DOI:10.1002/sctm.18-0150.

11. Iki, M.; Fujita, Y.; Kouda, K. et al. Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and decreased trabecular bone score in elderly Japanese men: The Fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (Formen) study. *Bone.* 2017; 105, 18–25. DOI.org/10.1016/j.bone.2017.08.007.

12. Wu, M.; Ai, W.; Chen, L. et al. Bradykinin receptors and EphB2/EphrinB2 pathway in response to high glucose-induced osteoblast dysfunction and hyperglycemia-induced bone deterioration in mice. *International Journal of Molecular Medicine.* 2016; 37, 565–574. DOI.org/10.3892/ijmm.2016.2457.

13. Li, K. H.; Liu, Y. T.; Yang, Y. W. et al. A positive correlation between blood glucose level and bone mineral density in Taiwan. *Archives of Osteoporosis*. 2018; 78. DOI.org/10.1007/s11657-018-0494-9.
14. 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. *The Journal of Physiological Sciences*. 2017; 67(1), 71–81. DOI. 10.1007/s12576-016-0487-7.
15. Shah, V. N.; Joshee, P.; Sippl, R. et al. Type 1 diabetes onset at young age is associated with compromised bone quality. *Bone. Official Journal of the International Bone and Mineral Society*. 2019; 123, 260–264. DOI.org/10.1016/j.bone.2019.03.039.
16. Villarino, M. E.; Sánchez, L. M.; Bozal, C. B.; Ubios, A. M. Influence of short-term diabetes on osteocytic lacunae of alveolar bone. A histomorphometric study. *Acta odontologica latinoamericana: AOL*. 2006; 19(1), 23–28.
17. Uikly, B. Elektronnaya mikroskopiya dlya nachinayushchikh. Mir. [Electron microscopy for beginners]. 1975; 328 s.
18. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol*. 1963; 17, 208–212.