

QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF STRUCTURAL CHANGES OF CHONDROCYTES OF ARTICULAR SURFACES OF THE FEMUR AND TIBIA AT EXPERIMENTAL DIABETIC ARTHROPATHY OF THE KNEE JOINT

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine (Ternopil, Ukraine)

hnatjuk@tdmu.edu.ua

Joint damage in patients with diabetes is a fairly common complication that has not been studied enough. The aim of the research was to study the features of structural changes in chondrocytes of the articular surfaces of the femur and tibia in experimental diabetic arthropathy of the knee joint.

Morphological methods were used to study the articular surfaces of the femur and tibia of 60 laboratory mature white male rats, which were divided into 3 groups. The 1st group included 20 intact, almost healthy animals, the 2nd – 20 rats with monthly experimental diabetic arthropathy of the knee joint, the 3rd - 20 experimental animals with two-month specified pathology. Diabetes mellitus was simulated by a single intraperitoneal administration of streptozotocin "Sigma" at 50 mg/kg. One month and two months after the start of the experiment, rats were euthanized by bloodletting under thiopental anesthesia. Diameters of young and mature chondrocytes and their nuclei, nuclear-cytoplasmic relations in these cells, the relative volume of damaged chondrocytes, intercellular-chondrocyte relations were determined on histological micropreparations in cartilaginous tissues of articular surfaces of femur and tibia. Quantitative indicators were processed statistically. It has been established that prolonged hyperglycemia leads to diabetic arthropathy of the knee joint, characterized by atrophy of chondrocytes and changes in their nuclear-cytoplasmic relations, which indicates a violation of cellular structural homeostasis. In diabetic arthropathy, there was a marked increase in the relative volume of damaged chondrocytes and the volume of intercellular substance. The detected changes in quantitative morphological parameters depended on the duration of hyperglycemia and dominated in young chondrocytes and the cartilaginous tissue of the tibia articular surface.

Key words: knee joint, diabetic arthropathy, chondrocytes, femur, tibia.

Relationship of the publication with the planned research works. The article is a fragment of the research work I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine "Structural and functional patterns of adaptive-compensatory processes in organs and systems during surgery on abdominal and thoracic cavities under the toxic influence of endogenous and exogenous factors» (№ state registration 0122U000031).

Introduction. Diabetes is a widespread disease with a steady tendency to increase, often leads to invalidity and mortality, and is a significant medical and social problem [1, 2]. At the specified pathology, joints affected very often. According to many researchers, more than 50% of patients with type 1 and type 2 diabetes are diagnosed with arthropathy, i.e., diabetes-associated osteoarthritis [2, 3, 4]. With diabetes, the human body disrupts protein, carbohydrate, mineral metabolism, hormonal disorders, angio- and neuropathy, changes in blood rheology, and hemodynamics [5, 6]. These factors lead to structural and functional changes in cartilage tissue, which in diabetic arthropathy have not been studied enough [7].

The aim of the study was to determine the features of structural changes of chondrocytes of the articular surfaces of the femur and tibia in experimental diabetic arthropathy of the knee joint.

Object and methods of research. A complex of morphological methods was used to study the articular surfaces of the femur and tibia of 60 laboratory mature white male rats, which were divided into 3 groups. The 1st group included 20 intact, almost healthy animals, the 2nd – 20 rats with monthly experimental diabetic

arthropathy of the knee joint, the 3rd – 20 experimental animals with two-month specified pathology. Diabetes mellitus was simulated by a single intraperitoneal administration of streptozotocin "Sigma" at 50 mg/kg [8]. One month and two months after the start of the experiment, rats were euthanized by bloodletting under thiopental anesthesia. The histological micropreparations [9] in the cartilaginous tissues of the articular surfaces of the femur and tibia determined the diameters of young (Y) and mature (M) chondrocytes (DC) and their nuclei (DNC), nuclear-cytoplasmic ratio in these cells (NCRC), relative damaged chondrocytes (RVDC), intercellular-chondrocyte ratio (ICR) [10]. Quantitative morphological study of chondrocytes was performed using a visual analysis system of histological specimens, images of which were displayed on a computer monitor from a microscope MICROMED SEOSCAN and using a Vision CCD Camera. We used KAAPA Image Dose and Microsoft Excel Video Test-5.0 on a personal computer during morphometric studies.

Morphometric parameters were processed statistically. Statistical processing of quantitative values was carried out in the Department of Statistical Research of the Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine in the software package "Statsoft Statistica". The significance of the difference between the comparative morphometric parameters was determined by the Student's t-test and Mann – Whitney U-test [11].

The research was performed following the provisions of The European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986), Council of Europe

Directive 2010/63 / EU, Law of Ukraine No. 3447 – IV. On the Protection of Animals from Cruelty”, general ethical principles of animal experiments, approved by the First National Congress of Ukraine on Bioethics (2001) [12].

Research results and their discussion. Experimental studies have shown that one month after the introduction of streptozotocin, blood glucose levels in laboratory adult white male rats increased from (3,65±0,03) mmol/l to (17,15±0,18) mmol/l, i.e., increased by 4,7 times compared to control values, and after 2 months this figure was equal to (16,42±0,12) mmol/l and was increased by 4,5 times. Histologically, experimental diabetes mellitus in the knee joint of laboratory adult white male rats revealed degenerative changes in its structures within a month from the start of the experiment, which progressed depending on the duration of diabetes mellitus.

The obtained morphometric parameters of chondrocytes are presented in the **table**. A comprehensive analysis of the morphometric parameters of young and mature chondrocytes presented in this table showed that they did not differ in the articular surfaces of the femur and tibia of the intact knee joint. A pronounced structural difference was found between young and mature chondrocytes. Thus, young chondrocytes were characterized by smaller sizes, larger nuclear-cytoplasmic ratios compared to mature cells [13].

Analysis of the data in this table also showed that the conditions of simulated diabetes changed significantly. Thus, the diameter of young chondrocytes of the articular surface of the femur in month diabetes was statistically significantly ($p<0,01$) decreased from (6,10±0,05) μm to (5,80±0,04) μm , ie by 4,9%, with two-month hyperglycemia – by 17,2% ($p<0,001$). The diameters of the nuclei of young chondrocytes in these experimental conditions were reduced by 2,2% ($p<0,05$) and 12,8% ($p<0,01$), respectively. Uneven, disproportionate changes in the morphometric parameters of chondrocytes and their nuclei led to a violation of nuclear-cytoplasmic relations in these cells, which in monthly experimental hyperglycemia were changed by 5,4% ($p<0,01$), and in two-month – by 11,2% ($p<0,001$). The obtained data indicated a violation of structural cellular homeostasis in the studied chondrocytes [10], and pronounced changes in nuclear-cytoplasmic relations indicated their damage.

Intercellular-chondrocyte ratios in the articular surface of the femur in the 2nd group of observations statistically significantly ($p<0,05$) increased by 6,1%, in the 3rd group of observations – by 13,0% ($p<0,001$), which indicated an increase in cartilage tissue of the articular surface of the intercellular substance. The relative volumes of damaged young chondrocytes increased by 6,5 and 8,9 times, respectively ($p<0,001$).

The diameter of mature chondrocytes of the articular surface of the femur in the control observations was equal to (12,20±0,12) μm , with monthly experimental hyperglycemia, it was statistically significant ($p<0,01$) decreased by 4,1% and reached (11,70±0,12) μm , in two-month diabetes mellitus – by 10,2% ($p<0,001$), which indicated their atrophy. Nuclear-cytoplasmic ratios in these cells in monthly arthropathy of the knee joint changed by 4,7% ($p<0,01$), and in two-month – by 10,6% ($p<0,001$). Intercellular-chondrocyte relations in these experimental conditions increased in monthly diabetic arthropathy by 9,4%, in two-month – by 14,8%

Table – Morphometric parameters of chondrocytes of the articular surfaces of the knee joint of experimental animals (M ± m)

Indicator	Observation group		
	1-st	2-d	3-d
Femoral articular surface			
DCY, μm	6,10±0,05	5,80±0,04**	5,05±0,04***
DNCY, μm	4,07±0,03	3,98±0,03*	3,55±0,02***
NCRCY	0,446±0,003	0,470±0,003**	0,496±0,004***
ICRY	0,115±0,001	0,122±0,001*	0,130±0,001***
RVDCY, %	2,20±0,02	14,30±0,12***	19,60±0,15***
DCM, μm	12,20±0,12	11,70±0,12*	10,95±0,011***
DNCM, μm	6,16±0,04	6,01±0,04*	5,81±0,02***
NCRCM	0,255±0,002	0,267±0,002**	0,282±0,003***
ICRM	0,148±0,001	0,162±0,002 ***	0,170±0,002***
RVDCM, %	2,10±0,02	10,80±0,12***	15,10±0,15***
Tibial articular surface			
DCY, μm	6,08±0,04	5,75±0,04**	4,98±0,04***
DNCY, μm	4,05±0,03	3,95±0,02*	3,52±0,02***
NCRCY	0,445±0,003	0,470±0,004**	0,499±0,004***
ICRY	0,115±0,001	0,124±0,001**	0,132±0,001***
RVDCY, %	2,22±0,02	15,10±0,12***	20,30±0,15***
DCM, μm	12,18±0,12	11,65±0,12*	10,68±0,09***
DNCM, μm	6,10±0,04	6,04±0,04	5,70±0,03***
NCRCM	0,256±0,003	0,269±0,003**	0,285±0,003***
ICRM	0,148±0,001	0,164±0,001***	0,174±0,002***
RVDCM, %	2,15±0,02	14,80±0,15***	16,20±0,18***

Notes: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$, compared with 1 group.

($p<0,001$), and the relative volumes of damaged mature chondrocytes in 5,1 and 7,2 times, respectively ($p<0,001$).

The structural rearrangement of chondrocytes of the articular surface of the tibia in the simulated experimental hyperglycemia was more pronounced than in the above data. Thus, the diameter of young chondrocytes of the articular surface of the tibia in simulated monthly hyperglycemia decreased statistically significantly ($p<0,01$) by 5,4%, at two months – by 18,1% ($p<0,001$), and the diameters of the nuclei, respectively – by 2,5% ($p<0,05$) and 13,1% ($p<0,001$). Nuclear-cytoplasmic ratios in young chondrocytes changed by 5,6% ($p<0,01$) and 12,1% ($p<0,001$).

Intercellular-chondrocyte ratios and the relative volume of damaged young chondrocytes in the studied experimental conditions increased. Thus, in monthly experimental hyperglycemia, intercellular-chondrocyte ratios increased by 2,4% ($p<0,05$), and the relative volume of damaged chondrocytes increased by 6,5 times ($p<0,001$), in two-month diabetes mellitus, studied morphometric parameters changed respectively by 13,0% and 8,9 times ($p<0,001$).

The degree of remodeling of mature chondrocytes of the articular surface of the tibia in diabetic arthropathy of the knee joint was less pronounced than in young chondrocytes. Thus, the diameter of mature chondrocytes of this joint surface in experimental monthly hyperglycemia decreased by 4,3% ($p<0,05$), in two-month – by 12,3% ($p<0,001$), and nuclear-cytoplasmic ratios increased by 5,1% and 11,3% ($p<0,001$). In addition, intercellular-chondrocyte ratios in these experimental conditions were increased in monthly diabetes by 8,1% ($p<0,001$) in two-month – by 17,6% ($p<0,001$), and the

relative volume of damaged chondrocytes increased by 6,9 and 7,5 times ($p < 0,001$).

The presented and analyzed morphometric parameters of chondrocytes indicate that the most pronounced degree of their remodeling was in two months of diabetic arthropathy and dominated the cartilaginous tissue of the articular surface of the tibia of the knee joint. Furthermore, it was found that the degree of remodeling (structural rearrangement) of young chondrocytes was higher compared to mature cartilage cells, which was objectively confirmed by changes in nuclear-cytoplasmic relationships in the studied cells and the relative volumes of damaged chondrocytes.

The obtained morphometric parameters indicate that the degree of chondrocyte remodeling depends on the duration of hyperglycemia. Structural changes of the studied cells in the conditions of simulated pa-

thology predominate in the cartilaginous tissue of the tibia, which is associated with more pronounced loads exerted by this bone [8].

Conclusions. Prolonged hyperglycemia leads to diabetic arthropathy of the knee joint, characterized by atrophy of chondrocytes, violation of their nuclear-cytoplasmic relations, an increase in the relative volumes of damaged chondrocytes. The detected changes in quantitative morphological parameters depended on the duration of hyperglycemia and were dominated in young chondrocytes and cartilage of the articular surface of the tibia.

Prospects for further research. A detailed, comprehensive morphological study of the structural rearrangement of chondrocytes of articular bone surfaces in diabetic arthropathies will significantly improve their diagnosis, correction and prevention.

References

1. Kryzyna OV. Trofichni porushennya tkanyn nyzhnikh kintsivok pry tsukrovomu diabeti 2 typu. Klinichna endokrynolohiya ta endokryнна khirurhiya. 2018;1(6):15-24. [in Ukrainian].
2. Orlenko VL. Hormonalni kharakterystyky diabet-asotsiyovanykh osteoartrityv. Visnyk problem biolohiyi ta medytsyny. 2020;2(159):138-143 [in Ukrainian].
3. Berenbaum F. Diabetes induced osteoarthritis from a new paradigm to a new phenotype. Ann. Rheum. Dis. 2011;70(8):1354-1356.
4. King K, Rosenthal A. The adverse effects of diabetes on osteoarthritis update on clinical evidence and molecular mechanism. Osteoarthritis and Cartilage. 2015;2:841-850.
5. Graham RW. Thyroid hormone actions in cartilage bone. Eur. Thyroid J. 2013;2:3-13.
6. Larkin M, Barnie A, Braffett B. Musculoskeletal complications in type 1 diabetes. Diabetes Care. 2014;37(7):1863-1869.
7. Ribero M, Lopez de Fiqueroa P, Bianco F. Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(4):731-739.
8. Hnatjuk MS, Rubas LV, Tatarchuk LV, Jasinovsky OB. Osoblyvosti mikroelementnoho skladu skronevoyi kistky ta nyzhn'oyi shchelepy za umov diabetichnoyi artropatii skronevo-nyzhn'oshchelepnogo suhloba. Medychna ta klinichna khimiya. 2021;23(2):28-33. [in Ukrainian].
9. Bahrii MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen. Vinnytsia: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
10. Avtandylov GG. Osnovy kolychestvennoy patolohycheskoy anatomii. Moskva: Medytsyna; 2002. 240 s. [in Russian].
11. Gzhibovskiy AI, Ivanov OI, Gorbatova MA. Sravneniye kolichestvennykh dannykh dvukh parnykh vyborok s ispol'zovaniyem programmogo obespecheniya Statistika i SPSS: parametricheskiye i neparametricheskiye kriterii. Nauka i zdravookhraneniye. 2016;3:5-25. [in Ukrainian].
12. Zaporozhan VM, Ariaiev ML. Bioetyka i biobezpeka. Kyiv: Zdorov'ia; 2013. 456 s. [in Ukrainian].
13. Koveshnikov VH, Abakarov MKh, Luzyn VI. Skeletny tkani. Lugansk: Izd-vo meduniversyteta; 2000. 126 s. [in Ukrainian].

КІЛЬКІСНИЙ МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРНИХ ЗМІН ХОНДРОЦИТІВ СУГЛОБОВИХ ПОВЕРХОНЬ СТЕГНОВОЇ ТА ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ АРТРОПАТІЇ КОЛІННОГО СУГЛОБА

Гнатюк М. С., Монастирська Н. Я., Татарчук Л. В., Вадзюк Н. С.

Резюме. Діабетичні артропатії у хворих на цукровий діабет нерідко зустрічаються у клінічній практиці. Особливості структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток і структура колінного суглоба при цукровому діабеті вивчені недостатньо.

Мета дослідження – визначення особливостей структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток при експериментальній діабетичній артропатії колінного суглоба.

Об'єкт і методи дослідження. Комплексом морфологічних методів досліджено суглобові поверхні стегнової та великогомілкової кісток 60 лабораторних статевозрілих білих щурів-самців, які були розділені на 3-и групи. 1-а група включала 20 інтактних практично здорових тварин, 2-а – 20 щурів з місячною експериментальною діабетичною артропатією колінного суглоба, 3-я – 20 експериментальних тварин з двомісячною вказаною патологією. Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» у дозі 50 мг/кг. Через місяць та два місяці від початку експерименту виконували евтаназію щурів кровопусканням в умовах тіопенталового наркозу. На гістологічних мікропрепаратах у хрящових тканинах суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток визначали діаметри молодих і зрілих хондроцитів та їх ядер, ядерно-цитоплазматичні відношення у цих клітинах, відносний об'єм пошкоджених хондроцитів, міжклітинно-хондроцитарні відношення. Кількісні показники обробляли статистично.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що тривала гіперглікемія призводить до діабетичної артропатії колінного суглоба, яка характеризується атрофією хондроцитів і змінами в них ядерно-цитоплазматичних відношень, що вказувало на порушення клітинного структурного гомеостазу. Виявлено, що ядерно-цитоплазматичні відношення в молодих хондроцитах суглобової поверхні стегнової кістки при місячній експериментальній гіперглікемії виявилися зміненими на 5,4% ($p < 0,01$), при двомісячній – на 11,2% ($p < 0,001$), у зрілих хондроцитах – на 4,7% ($p < 0,01$) та 10,6% ($p < 0,001$), у суглобовій поверхні великогомілкової кістки дані морфометричні параметри відповідно змінилися на 5,6%, 12,1% ($p < 0,001$) та 5,1% і 11,3% ($p < 0,001$). При діабетичній артропатії відмічалось виражене зростання відносного об'єму пошкоджених хондроцитів і об'єму міжклітинної речовини. Виявлені зміни кількісних морфологічних показників залежали від тривалості

гіперглікемії і домінували в молодих хондроцитах та в хрящовій тканині суглобової поверхні великогомілкової кістки.

Ключові слова: колінний суглоб, діабетична артропатія, хондроцити, стегнова, великогомілкова кістки.

QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF STRUCTURAL CHANGES OF CHONDROCYTES OF ARTICULAR SURFACES OF THE FEMUR AND TIBIA AT EXPERIMENTAL DIABETIC ARTHROPATHY OF THE KNEE JOINT

Hnatjuk M. S., Monastyrskaya N. Ja., Tatarchuk L. V., Vadzyuk N. S.

Abstract. Diabetic arthropathies in patients with diabetes are often found in clinical practice. Features of structural changes of chondrocytes of articular surfaces of femur and tibia and structure of knee joint at diabetes mellitus are insufficiently studied.

The purpose of research – to study the features of structural changes of chondrocytes of the articular surfaces of the femur and tibia in experimental diabetic arthropathy of the knee joint.

Methods and Material. The articular surfaces of the femur and tibia of 60 laboratory mature white male rats, which were divided into 3 groups were studied by morphological methods. The 1 group included 20 intact practically healthy animals, the 2 – 20 rats with monthly experimental diabetic arthropathy of the knee joint, the 3 – 20 experimental animals with two-month specified pathology. Diabetes mellitus was simulated by a single intraperitoneal injection of streptozotocin by Sigma at a dose of 50 mg/kg. One month and two months after the start of the experiment, rats were euthanized by bloodletting under thiopental anesthesia. Diameters of young and mature chondrocytes and their nuclei, nuclear-cytoplasmic relations in these cells, relative volume of damaged chondrocytes, intercellular-chondrocyte relations were determined on histological micropreparations in cartilaginous tissues of articular surfaces of femur and tibia. Quantitative indicators were processed statistically.

Results and Discussion. It is established that prolonged hyperglycemia leads to diabetic arthropathy of the knee joint, which is characterized by atrophy of chondrocytes and changes in their nuclear-cytoplasmic relations, which indicated a violation of cellular structural homeostasis. It was found that nuclear-cytoplasmic ratios in young chondrocytes of the articular surface of the femur in monthly experimental hyperglycemia were changed by 5.4% ($p < 0.01$), in two-month – by 11.2% ($p < 0.001$), in mature chondrocytes – by 4.7% ($p < 0.01$) and 10.6% ($p < 0.001$), in the articular surface of the tibia these morphometric parameters changed by 5.6%, 12.1% ($p < 0.001$) and 5.1% and 11.3% ($p < 0.001$). It was found that nuclear-cytoplasmic ratios in young chondrocytes of the articular surface of the femur in monthly experimental hyperglycemia were changed by 5.4% ($p < 0.01$), in two-month – by 11.2% ($p < 0.001$), in mature chondrocytes – by 4.7% ($p < 0.01$) and 10.6% ($p < 0.001$), in the articular surface of the tibia these morphometric parameters changed by 5.6%, 12.1% ($p < 0.001$) and 5.1% and 11.3% ($p < 0.001$). In diabetic arthropathy, there was a marked increase in the relative volume of damaged chondrocytes and the volume of intercellular substance. The detected changes in quantitative morphological parameters depended on the duration of hyperglycemia and dominated in young chondrocytes and cartilage of the articular surface of the tibia.

Key words: knee joint, diabetic arthropathy, chondrocytes, femur, tibia.

ORCID and contributionship:

Hnatjuk M. S.: 0000-0002-4110-5568 ^{ADEF}

Monastyrskaya N. Ja.: 0000-0003-2799-0895 ^{ADF}

Tatarchuk L. V.: 0000-0002-4678-4205 ^{CDE}

Vadzyuk N. S.: 0000-0002-3398-1285 ^{BD}

Conflict of interest:

The Authors declare no conflict of interest.

Corresponding author

Hnatjuk Mykhaylo Stepanovych

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine

Ukraine, 46001, Ternopil, M.Voli, 1.

Tel.: +380674765285

E-mail: hnatjuk@tdmu.edu.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article

Received 17.11.2021

Accepted 28.04.2022

КІЛЬКІСНИЙ МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРНИХ ЗМІН ХОНДРОЦИТІВ СУГЛОВОВИХ ПОВЕРХОНЬ СТЕГНОВОЇ ТА ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ АРТРОПАТІЇ КОЛІННОГО СУГЛОБА**Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України
(м. Тернопіль, Україна)****hnatjuk@tdmu.edu.ua**

Пошкодження суглобів у хворих на цукровий діабет є досить частим ускладненням, що вивчені недостатньо. Метою дослідження було вивчення особливостей структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток при експериментальній діабетичній артропатії колінного суглоба.

За допомогою морфологічних методів досліджено суглобові поверхні стегнової та великогомілкової кісток 60 лабораторних статевозрілих білих щурів-самців, які були поділені на 3-и групи. 1-а група включала 20 інтактних практично здорових тварин, 2-а – 20 щурів з місячною експериментальною діабетичною артропатією колінного суглоба, 3-я – 20 експериментальних тварин з двомісячною вказаною патологією. Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» у дозі 50 мг/кг. Через місяць та два місяці від початку експерименту виконували евтаназію щурів кровопусканням в умовах тіопенталового наркозу. На гістологічних мікропрепаратах у хрящових тканинах суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток визначали діаметри молодих і зрілих хондроцитів та їх ядер, ядерно-цитоплазматичні відношення у цих клітинах, відносний об'єм пошкоджених хондроцитів, міжклітинно-хондроцитарні відношення. Кількісні показники обробляли статистично. Встановлено, що тривала гіперглікемія призводить до діабетичної артропатії колінного суглоба, яка характеризується атрофією хондроцитів і змінами в них ядерно-цитоплазматичних відношень, що вказувало на порушення клітинного структурного гомеостазу. При діабетичній артропатії відмічалось виражене зростання відносного об'єму пошкоджених хондроцитів і об'єму міжклітинної речовини. Виявлені зміни кількісних морфологічних показників залежали від тривалості гіперглікемії і домінували в молодих хондроцитах та в хрящовій тканині суглобової поверхні великогомілкової кістки.

Ключові слова: колінний суглоб, діабетична артропатія, хондроцити, стегнова, великогомілкова кістки.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Структурно-функціональні закономірності перебігу адаптаційно-компенсаторних процесів в органах та системах при оперативних втручаннях на органах черевної та грудної порожнин в умовах дії токсичних ендогенних та екзогенних факторів» (№ державної реєстрації 0122U000031).

Вступ. Цукровий діабет є широко розповсюдженою хворобою, яка має стійку тенденцію до зростання, нерідко призводить до інвалідності та смертності населення і є важливою медичною та соціальною проблемою [1, 2]. При вказаній патології нерідко уражаються суглоби. За даними багатьох дослідників пошкодження суглобів більш ніж у 50% хворих на цукровий діабет 1 та 2 типів діагностують артропатії, тобто діабет-асоційований остеоартрит [2, 3, 4]. При цукровому діабеті в організмі людини порушуються білковий, вуглеводний, мінеральний обмін, виникають гормональні розлади, ангіо- і нейропатії, зміни реології крові і гемодинаміки [5, 6]. Перераховані фактори призводять до структурно-функціональних змін хрящової тканини, які при діабетичній артропатії досліджені недостатньо [7].

Мета дослідження – визначення особливостей структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток при експериментальній діабетичній артропатії колінного суглоба.

Об'єкт і методи дослідження. Комплексом морфологічних методів досліджено суглобові поверхні стегнової та великогомілкової кісток 60 лабораторних статевозрілих білих щурів-самців, які були розділені на 3-и групи. 1-а група включала 20 інтактних практично здорових тварин, 2-а – 20 щурів з місячною експериментальною діабетичною артропатією колінного суглоба, 3-я – 20 експериментальних тварин з двомісячною вказаною патологією. Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» у дозі 50 мг/кг [8]. Через місяць та два місяці від початку експерименту виконували евтаназію щурів кровопусканням в умовах тіопенталового наркозу. На гістологічних мікропрепаратах [9] у хрящових тканинах суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток визначали діаметри молодих (М) і зрілих (З) хондроцитів (ДХ) та їх ядер (ДЯХ), ядерно-цитоплазматичні відношення у цих клітинах (ЯЦВХ), відносний об'єм пошкоджених хондроцитів (ВОПХ), міжклітинно-хондроцитарні відношення (МХВ) [10]. Кількісне морфологічне вивчення хондроцитів здійснювали використовуючи систему візуального аналізу гістологічних препаратів, зображення з яких на монітор комп'ютера виводили з мікроскопа MICROMED SEOSCAN та за допомогою відеокамери Vision CCD Camera. При морфометричних дослідженнях використовували програму Відео-Тест-5,0 КАРА Image Dose та Microsoft Excell на персональному комп'ютері.

Морфометричні параметри обробляли статистично. Статистична обробка кількісних величин проведена у відділі статистичних досліджень Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України у програмному пакеті «Statsoft Statistica». Достовірність різниці між порівнювальними морфометричними параметрами визначали за критеріями Стьюдента та Манна-Уїтні [11].

Дослідження виконували згідно з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директивами Ради Європи 2010/63/EU, Законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальними етичними принципами експериментів на тваринах, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики (2001) [12].

Результати дослідження та їх обговорення. Проведеними експериментальними дослідженнями встановлено, що через місяць після введення стрептозоцину рівень глюкози в крові у лабораторних статевозрілих білих щурів-самців зріс з (3,65±0,03) ммоль/л до (17,15±0,18) ммоль/л, тобто у 4,7 рази, порівняно з контрольними величинами, а через 2 місяці даний показник дорівнював (16,42±0,12) ммоль/л і виявився збільшеним у 4,5 рази. Гістологічно при експериментальному цукровому діабеті у колінному суглобі лабораторних статевозрілих білих щурів-самців виявлено дегенеративні зміни його структур вже через місяць від початку експерименту, які прогресували в залежності від тривалості цукрового діабету.

Отримані морфометричні параметри хондроцитів представлені у таблиці. Усестороннім аналізом представлених у вказаній таблиці морфометричних параметрів молодих і зрілих хондроцитів встановлено, що вони у суглобових поверхнях стегнової та великогомілкової кісток неушкодженого колінного суглоба між собою не відрізнялися. Виражена структурна різниця виявлена між молодими та зрілими хондроцитами. Так, молоді хондроцити характеризувалися меншими розмірами, більшими ядерно-цитоплазматичними відношеннями порівняно із зрілими клітинами [13].

Аналізом даних вказаної таблиці також встановлено, що в умовах змодельованого цукрового діабету вони суттєво змінювалися. Так, діаметр молодих хондроцитів суглобової поверхні стегнової кістки при місячному цукровому діабеті статистично достовірно ($p < 0,01$) зменшився з (6,10±0,05) мкм до (5,80±0,04) мкм, тобто на 4,9%, при двомісячній гіперглікемії – на 17,2% ($p < 0,001$). Діаметри ядер молодих хондроцитів у даних експериментальних умовах виявилися відповідно зниженими на 2,2% ($p < 0,05$) та 12,8% ($p < 0,01$). Нерівномірні, диспропорційні зміни морфометричних параметрів хондроцитів та їх ядер призводили до порушення в цих клітинах ядерно-цитоплазматичних відношень, які при місячній експериментальній гіперглікемії виявилися зміненими на 5,4% ($p < 0,01$), а при двомісячній – на 11,2% ($p < 0,001$). Виявлене свідчило про порушення структурного клітинного гомеостазу у досліджуваних хондроцитах [10], а виражені зміни ядерно-цитоплазматичних відношень вказували на їх ураження.

Міжклітинно-хондроцитарні відношення у суглобовій поверхні стегнової кістки у 2-й групі спостережень статистично достовірно ($p < 0,05$) зросли на 6,1%.

Таблиця – Морфометричні показники хондроцитів суглобових поверхонь колінного суглоба експериментальних тварин (M±m)

Показник	Група спостереження		
	1-а	2-а	3-я
Суглобова поверхня стегнової кістки			
ДХМ, мкм	6,10±0,05	5,80±0,04**	5,05±0,04***
ДЯХМ, мкм	4,07±0,03	3,98±0,03*	3,55±0,02***
ЯЦВМ	0,446±0,003	0,470±0,003**	0,496±0,004***
МХВМ	0,115±0,001	0,122±0,001*	0,130±0,001***
ВОПХМ, %	2,20±0,02	14,30±0,12***	19,60±0,15***
ДХЗ, мкм	12,20±0,12	11,70±0,12*	10,95±0,011***
ДЯХЗ, мкм	6,16±0,04	6,01±0,04*	5,81±0,02***
ЯЦВЗ	0,255±0,002	0,267±0,002**	0,282±0,003***
МХВЗ	0,148±0,001	0,162±0,002***	0,170±0,002***
ВОПХЗ, %	2,10±0,02	10,80±0,12***	15,10±0,15***
Суглобова поверхня великогомілкової кістки			
ДХМ, мкм	6,08±0,04	5,75±0,04**	4,98±0,04***
ДЯХМ, мкм	4,05±0,03	3,95±0,02*	3,52±0,02***
ЯЦВМ	0,445±0,003	0,470±0,004**	0,499±0,004***
МХВМ	0,115±0,001	0,124±0,001**	0,132±0,001***
ВОПХМ, %	2,22±0,02	15,10±0,12***	20,30±0,15***
ДХЗ, мкм	12,18±0,12	11,65±0,12*	10,68±0,09***
ДЯХЗ, мкм	6,10±0,04	6,04±0,04	5,70±0,03***
ЯЦВЗ	0,256±0,003	0,269±0,003**	0,285±0,003***
МХВЗ	0,148±0,001	0,164±0,001***	0,174±0,002***
ВОПХЗ, %	2,15±0,02	14,80±0,15***	16,20±0,18***

Примітки: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, порівняно з 1 групою.

у 3-й групі спостережень – на 13,0% ($p < 0,001$), що свідчило про збільшення у хрящовій тканині суглобової поверхні міжклітинної речовини. Відносні об'єми пошкоджених молодих хондроцитів при цьому збільшилися відповідно у 6,5 та 8,9 рази ($p < 0,001$).

Діаметр зрілих хондроцитів суглобової поверхні стегнової кістки у контрольних спостереженнях дорівнював (12,20±0,12) мкм, при місячній експериментальній гіперглікемії він статистично достовірно ($p < 0,01$) зменшився на 4,1% і досягав (11,70±0,12) мкм, при двомісячному цукровому діабеті – на 10,2% ($p < 0,001$), що вказувало на їх атрофію. Ядерно-цитоплазматичні відношення у цих клітинах при місячній артропатії колінного суглоба змінилися на 4,7% ($p < 0,01$), а при двомісячній – 10,6% ($p < 0,001$). Міжклітинно-хондроцитарні у даних експериментальних умовах зросли при місячній діабетичній артропатії на 9,4%, при двомісячній – на 14,8% ($p < 0,001$), а відносні об'єми пошкоджених зрілих хондроцитів відповідно у 5,1 та 7,2 рази ($p < 0,001$).

Структурна перебудова хондроцитів суглобової поверхні великогомілкової кістки в умовах змодельованої експериментальної гіперглікемії виявилася більш вираженою порівняно з наведеними вище даними. Так, діаметр молодих хондроцитів суглобової поверхні великогомілкової кістки при змодельованій місячній гіперглікемії статистично достовірно ($p < 0,01$) зменшився на 5,4%, при двомісячній – на 18,1% ($p < 0,001$), а діаметри ядер відповідно – на 2,5% ($p < 0,05$) та 13,1% ($p < 0,001$). Ядерно-цитоплазматичні відношення у молодих хондроцитах при цьому змінилися на 5,6% ($p < 0,01$) та 12,1% ($p < 0,001$).

Міжклітинно-хондроцитарні відношення та відносний об'єм пошкоджених молодих хондроцитів у

досліджуваних експериментальних умовах зростали. Так, при місячній експериментальній гіперглікемії міжклітинно-хондроцитарні відношення збільшилися на 2,4% ($p < 0,05$), а відносний об'єм пошкоджених хондроцитів у 6,5 рази ($p < 0,001$), при двомісячному цукровому діабеті досліджувані морфометричні параметри змінилися відповідно на 13,0% та у 8,9 рази ($p < 0,001$).

Ступінь ремоделювання зрілих хондроцитів суглобової поверхні великогомілкової кістки при діабетичній артропатії колінного суглоба виявився менш вираженим порівняно з молодими хондроцитами. Так, діаметр зрілих хондроцитів вказаної суглобової поверхні при експериментальній місячній гіперглікемії зменшився на 4,3% ($p < 0,05$), при двомісячній – на 12,3% ($p < 0,001$), а ядерно-цитоплазматичні відношення зросло відповідно на 5,1% та 11,3% ($p < 0,001$). Міжклітинно-хондроцитарні відношення у даних експериментальних умовах виявилися збільшеними при місячному цукровому діабеті на 8,1% ($p < 0,001$) при двомісячному – на 17,6% ($p < 0,001$), а відносний об'єм пошкоджених хондроцитів зріс відповідно у 6,9 та 7,5 рази ($p < 0,001$).

Наведені та проаналізовані морфометричні параметри хондроцитів свідчать, що найбільш вираженим ступінь їх ремоделювання виявився при двомісячній діабетичній артропатії та домінував у хрящовій тканині суглобової поверхні великогомілкової кістки колінного суглоба. Встановлено, що ступінь ремоде-

лювання (структурної перебудови) молодих хондроцитів при цьому був більшим порівняно із зрілими хрящовими клітинами, що об'єктивно підтверджувалося змінами ядерно-цитоплазматичних відношень у досліджуваних клітинах та відносними об'ємами пошкоджених хондроцитів.

Отримані морфометричні параметри свідчать, що ступінь ремоделювання хондроцитів залежить від тривалості гіперглікемії. Структурні зміни досліджуваних клітин в умовах змодельованої патології переважають у хрящовій тканині великогомілкової кістки, що пов'язують з більш вираженими навантаженнями, які виконує дана кістка [8].

Висновки. Тривала гіперглікемія призводить до діабетичної артропатії колінного суглоба, яка характеризується атрофією хондроцитів, порушенням у них ядерно-цитоплазматичних відношень, зростанням відносних об'ємів пошкоджених хондроцитів. Виявлені зміни кількісних морфологічних показників залежали від тривалості гіперглікемії та домінували у молодих хондроцитах і хрящовій тканині суглобової поверхні великогомілкової кістки.

Перспективи подальших досліджень. Детальне, всестороннє комплексне морфологічне вивчення особливостей структурної перебудови хондроцитів суглобових поверхонь кісток при діабетичних артропатіях дозволить суттєво покращити їх діагностику, корекцію та профілактику.

Література

1. Kryzyna OV. Trofichni porushennya tkanyn nyzhnikh kintsivok pry tsukrovomu diabeti 2 typu. Klinichna endokrynolohiya ta endokrynna khirurhiya. 2018;1(6):15-24. [in Ukrainian].
2. Orlenko VL. Hormonalni kharakterystyky diabet-asotsiyovanykh osteoartytiv. Visnyk problem biolohiyi ta medytsyny. 2020;2(159):138-143 [in Ukrainian].
3. Berenbaum F. Diabetes induced osteoarthritis from a new paradigm to a new phenotype. Ann. Rheum. Dis. 2011;70(8):1354-1356.
4. King K, Rosenthal A. The adverse effects of diabetes on osteoarthritis update on clinical evidence and molecular mechanism. Osteoarthritis and Cartilage. 2015;2:841-850.
5. Graham RW. Thyroid hormone actions in cartilage bone. Eur. Thyroid J. 2013;2:3-13.
6. Larkin M, Barnie A, Braffett B. Musculoskeletal complications in type 1 diabetes. Diabetes Care. 2014;37(7):1863-1869.
7. Ribero M, Lopez de Fiqueroa P, Bianco F. Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. Osteoarthritis Cartilage. 2016;24(4):731-739.
8. Hnatjuk MS, Rubas LV, Tatarchuk LV, Jasinovsky OB. Osoblyvosti mikroelementnoho skladu skronevoyi kistky ta nyzhn'oyi shchelepy za umov diabetichnoyi artropatii skronevo-nyzhn'oshchelepnogo suhloba. Medychna ta klinichna khimiya. 2021;23(2):28-33. [in Ukrainian].
9. Bahrii MM, Dibrova VA, Popadynets OH, Hryshchuk MI. Metodyky morfolohichnykh doslidzhen. Vinnytsia: Nova knyha; 2016. 328 s. [in Ukrainian].
10. Avtandylov GG. Osnovy kolychestvennoy patolohycheskoy anatomii. Moskva: Medytsyna; 2002. 240 s. [in Russian].
11. Gzhibovskiy AI, Ivanov OI, Gorbatova MA. Sravneniye kolichestvennykh dannykh dvukh parnykh vyborok s ispol'zovaniyem programmogo obespecheniya Statistika i SPSS: parametricheskiye i neparametricheskiye kriterii. Nauka i zdravookhraneniye. 2016;3:5-25. [in Ukrainian].
12. Zaporozhan VM, Ariaiev ML. Bioetyka i biobezpeka. Kyiv: Zdorovia; 2013. 456 s. [in Ukrainian].
13. Koveshnikov VH, Abakarov MKh, Luzyn VI. Skeletny tkani. Lugansk: Izd-vo meduniversityteta; 2000. 126 s. [in Ukrainian].

КІЛЬКІСНИЙ МОРФОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ СТРУКТУРНИХ ЗМІН ХОНДРОЦИТІВ СУГЛОБОВИХ ПОВЕРХОНЬ СТЕГНОВОЇ ТА ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТОК ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ДІАБЕТИЧНІЙ АРТРОПАТІЇ КОЛІННОГО СУГЛОБА

Гнатюк М. С., Монастирська Н. Я., Татарчук Л. В., Вадзюк Н. С.

Резюме. Діабетичні артропатії у хворих на цукровий діабет нерідко зустрічаються у клінічній практиці. Особливості структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток і структура колінного суглоба при цукровому діабеті вивчені недостатньо.

Мета дослідження – визначення особливостей структурних змін хондроцитів суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток при експериментальній діабетичній артропатії колінного суглоба.

Об'єкт і методи дослідження. Комплексом морфологічних методів досліджено суглобові поверхні стегнової та великогомілкової кісток 60 лабораторних статевозрілих білих щурів-самців, які були розділені на 3-и групи. 1-а група включала 20 інтактних практично здорових тварин, 2-а – 20 щурів з місячною експериментальною діабетичною артропатією колінного суглоба, 3-я – 20 експериментальних тварин з двомісячною вказаною патологією. Цукровий діабет моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» у дозі 50 мг/кг. Через місяць та два місяці від початку експерименту виконували евтаназію щурів кровопусканням в умовах тіопенталового наркозу. На гістологічних мікропрепаратах у хрящових тканинах суглобових поверхонь стегнової та великогомілкової кісток визначали діаметри молодих

і зрілих хондроцитів та їх ядер, ядерно-цитоплазматичні відношення у цих клітинах, відносний об'єм пошкоджених хондроцитів, міжклітинно-хондроцитарні відношення. Кількісні показники обробляти статистично.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що тривала гіперглікемія призводить до діабетичної артропатії колінного суглоба, яка характеризується атрофією хондроцитів і змінами в них ядерно-цитоплазматичних відношень, що вказувало на порушення клітинного структурного гомеостазу. Виявлено, що ядерно-цитоплазматичні відношення в молодих хондроцитах суглобової поверхні стегнової кістки при місячній експериментальній гіперглікемії виявилися зміненими на 5,4% ($p < 0,01$), при двомісячній – на 11,2% ($p < 0,001$), у зрілих хондроцитах – на 4,7% ($p < 0,01$) та 10,6% ($p < 0,001$), у суглобовій поверхні великогомілкової кістки дані морфометричні параметри відповідно змінилися на 5,6%, 12,1% ($p < 0,001$) та 5,1% і 11,3% ($p < 0,001$). При діабетичній артропатії відмічалось виражене зростання відносного об'єму пошкоджених хондроцитів і об'єму міжклітинної речовини. Виявлені зміни кількісних морфологічних показників залежали від тривалості гіперглікемії і домінували в молодих хондроцитах та в хрящовій тканині суглобової поверхні великогомілкової кістки.

Ключові слова: колінний суглоб, діабетична артропатія, хондроцити, стегнова, великогомілкова кістки.

QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF STRUCTURAL CHANGES OF CHONDROCYTES OF ARTICULAR SURFACES OF THE FEMUR AND TIBIA AT EXPERIMENTAL DIABETIC ARTHROPATHY OF THE KNEE JOINT

Hnatjuk M. S., Monastyrsk N. Ja., Tatarchuk L. V., Vadzyuk N. S.

Abstract. Diabetic arthropathies in patients with diabetes are often found in clinical practice. Features of structural changes of chondrocytes of articular surfaces of femur and tibia and structure of knee joint at diabetes mellitus are insufficiently studied.

The purpose of research – to study the features of structural changes of chondrocytes of the articular surfaces of the femur and tibia in experimental diabetic arthropathy of the knee joint.

Methods and Material. The articular surfaces of the femur and tibia of 60 laboratory mature white male rats, which were divided into 3 groups were studied by morphological methods. The 1 group included 20 intact practically healthy animals, the 2 – 20 rats with monthly experimental diabetic arthropathy of the knee joint, the 3 – 20 experimental animals with two-month specified pathology. Diabetes mellitus was simulated by a single intraperitoneal injection of streptozotocin by Sigma at a dose of 50 mg/kg. One month and two months after the start of the experiment, rats were euthanized by bloodletting under thiopental anesthesia. Diameters of young and mature chondrocytes and their nuclei, nuclear-cytoplasmic relations in these cells, relative volume of damaged chondrocytes, intercellular-chondrocyte relations were determined on histological micropreparations in cartilaginous tissues of articular surfaces of femur and tibia. Quantitative indicators were processed statistically.

Results and Discussion. It is established that prolonged hyperglycemia leads to diabetic arthropathy of the knee joint, which is characterized by atrophy of chondrocytes and changes in their nuclear-cytoplasmic relations, which indicated a violation of cellular structural homeostasis. It was found that nuclear-cytoplasmic ratios in young chondrocytes of the articular surface of the femur in monthly experimental hyperglycemia were changed by 5.4% ($p < 0,01$), in two-month – by 11.2% ($p < 0,001$), in mature chondrocytes – by 4.7% ($p < 0,01$) and 10.6% ($p < 0,001$), in the articular surface of the tibia these morphometric parameters changed by 5.6%, 12.1% ($p < 0,001$) and 5.1% and 11.3% ($p < 0,001$). It was found that nuclear-cytoplasmic ratios in young chondrocytes of the articular surface of the femur in monthly experimental hyperglycemia were changed by 5.4% ($p < 0,01$), in two-month – by 11.2% ($p < 0,001$), in mature chondrocytes – by 4.7% ($p < 0,01$) and 10.6% ($p < 0,001$), in the articular surface of the tibia these morphometric parameters changed by 5.6%, 12.1% ($p < 0,001$) and 5.1% and 11.3% ($p < 0,001$). In diabetic arthropathy, there was a marked increase in the relative volume of damaged chondrocytes and the volume of intercellular substance. The detected changes in quantitative morphological parameters depended on the duration of hyperglycemia and dominated in young chondrocytes and cartilage of the articular surface of the tibia.

Key words: knee joint, diabetic arthropathy, chondrocytes, femur, tibia.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Hnatjuk M. S.: 0000-0002-4110-5568^{ADEF}

Monastyrsk N. Ja.: 0000-0003-2799-0895^{ADF}

Tatarchuk L. V.: 0000-0002-4678-4205^{CDE}

Vadzyuk N. S.: 0000-0002-3398-1285^{BD}

Конфлікт інтересів:

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Гнатюк Михайло Степанович

Тернопільський національний медичний університет

імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Адреса: Україна, 46001, м. Тернопіль, вул. Майдан Волі 1

Тел.: +380674765285

E-mail: hnatjuk@tdmu.edu.ua

А – концепція роботи та дизайн, В – збір та аналіз даних, С – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, Е – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Стаття надійшла 17.11.2021 року
Стаття прийнята до друку 28.04.2022 року