

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-386-394

UDC 616.72-002-092.9:611.018.3:616.15

¹Vvedenskyi D. B., ¹Volkova N. O., ²Ashukina N. O., ¹Yukhta M. S., ¹Goltsev A. M.

DYNAMICS OF HISTOSTRUCTURE OF CARTILAGE TISSUE AND HEMATOLOGICAL INDICATORS OF BLOOD IN RATS WITH ADJUVANT ARTHRITIS

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

²Sytenko Institute of Spine and Joint Pathology National Academy of Medical Sciences of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

volkovana781@gmail.com

Rheumatoid arthritis is a multisystem, immune-mediated inflammatory disease that predominantly affects the diarthrodial joints, causing their destruction and progressive disability. Its presentation is heterogeneous, and the current view of its etiopathogenesis suggests that both genetic and environmental factors may be involved in its initiation. Despite significant progress in understanding the pathophysiology of rheumatoid arthritis, its aetiology remains unknown. The study aimed to determine the timing of adjuvant arthritis development in rats based on the study of the dynamics of degenerative changes in cartilage tissue and inflammatory markers in the blood of rats. The adjuvant arthritis model was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant. A group of intact animals was also formed. On days 7, 21, and 35 after the adjuvant arthritis model, the tarsometatarsal joints of the experimental groups were isolated for histological examination. The number of leukocytes and erythrocyte sedimentation rate were determined in the blood at the indicated time points, and the total protein and rheumatoid factor content in the serum. The analysis of the results showed that on day 7 of the adjuvant arthritis modelling, there were signs of degenerative changes in articular cartilage, which corresponded to acute arthritis and correlated with the investigated haematological parameters of inflammation. With an increase in the observation period to 35 days, the process was chronicised, leading to severe arthrosis disorders in articular cartilage and the absence of normalisation of blood parameters. The data obtained can be used to substantiate and develop effective methods of treating arthritis in clinical practice.

Key words: arthritis, osteoarthritis, modelling, histological structure, inflammatory markers.

Connection of the publication with planned research works.

The work was carried out following the plan of research work of the Department of Cryopathophysiology and Immunology of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine within the framework of the departmental theme: "The use of modern cellular nanobiotechnologies in the treatment of rheumatoid arthritis", state registration number 0120U102974.

Introduction.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic autoimmune disease, usually characterised by synovial inflammation, cartilage and bone destruction, and progressive joint deformity [1]. Patients with advanced RA are more likely to die prematurely, primarily from cardiovascular and pulmonary complications. In the early stages, the disease mainly affects synovial joints but eventually spreads to the lungs, blood vessels and other body parts. Thus, RA seriously reduces long-term quality of life and requires long-term clinical treatment [2].

The main goal of RA treatment is to completely or partially reduce the activity of the disease [3]. It used to be that treatment with anti-rheumatic drugs was "good enough", and cure was considered as desirable as it was unattainable. According to clinicians, basic therapy can slow the progression of the disease and induce sustained remission, especially if it is started with a symptom duration of less than three months. It should be noted that the development of RA is primarily due

to the presence of primary immunodeficiency, which contributes to the transition of the acute inflammatory process to the chronic stage. At the same time, a prolonged inflammatory process leads to a decrease in the body's immunological reactivity. Experimental models of inflammation can be used both to assess the impact of various etiological factors and to study the effectiveness of its treatment [2-5]. Thus, it is recommended to use an adjuvant arthritis model at the screening stage of RA-related research [1, 2, 4-5]. However, this model is used on many experimental animals of different ages and sexes. Therefore, in many cases, the experimental data obtained are contradictory, and the indicators of inflammatory markers vary [1-5]. It necessitated the determination of the dynamics of articular cartilage and haematological markers of inflammation as one of the main indicators in the study of the development of the inflammatory process to select the most optimal time for cell therapy of the adjuvant model of RA in rats.

The aim of the study.

To determine the timing of adjuvant arthritis development in rats (acute and chronic phases) based on the study of the dynamics of degenerative changes in cartilage tissue and inflammatory markers in the blood of rats.

Object and research methods.

Experimental animals were kept in plastic cages (five animals per cage) at the vivarium of the Institute of Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine under con-

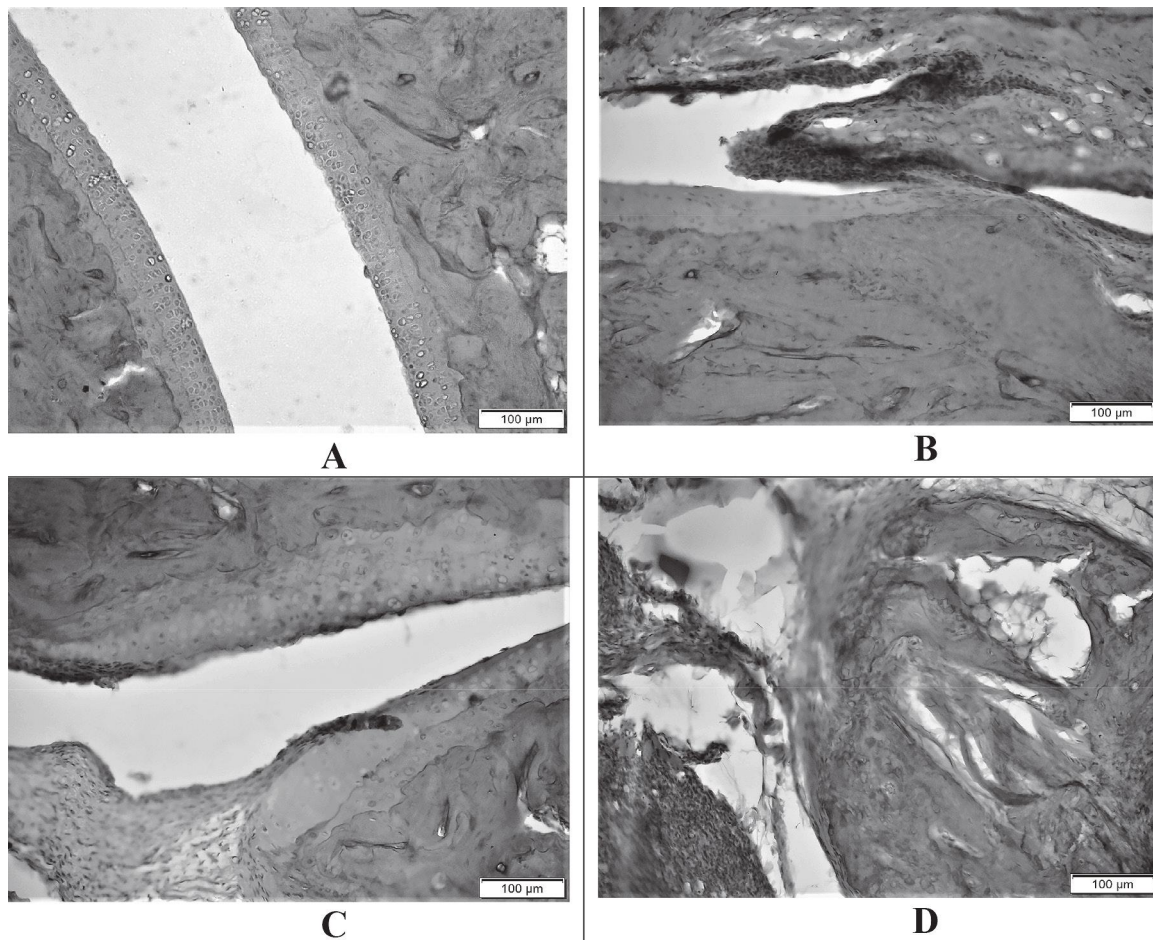


Figure 1 – Fragments of the ankle joint of intact rats (A) and on days 7 (B), 21 (C) and 35 (D) of adjuvant arthritis modelling. Hematoxylin and eosin staining.

trolled temperature (18-22°C), humidity (30%-70%) and lighting (light was switched on from 8 am to 8 pm) with a standard diet and free access to food and water. The experiments were conducted following the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 2005), the Law of Ukraine "On Protection of Animals from Cruelty" (2006, Article 26), and the "General Ethical Principles for Animal Experiments" adopted by the Fifth National Congress on Bioethics (Kyiv, 2013).

The adjuvant arthritis (AA) model in male rats was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant (SantaCruz, USA) at a dose of 0.25 ml (n=15). A group of intact animals was also formed (n=15).

On days 7, 21 and 35, local signs of inflammation and the arthritis index were determined. The last one was the ratio of the circumference of the experimental paw joint on the corresponding day of the study to the circumference of the control joint of the same animal.

For histological examination, the ankle joints of rats of the experimental groups were isolated within the timeframe mentioned above. The material was fixed in a 10% neutral formalin solution, decalcified in a 4% formic acid solution, dehydrated in ethyl alcohols of increasing concentration (from 70° to 96°), in a solution of 96° alcohol with chloroform (1:1), and embedded in paraffin [6]. Axial histological sections of the joints were stained with Weigert's haematoxylin and eosin using a Reichert sledge microtome (Austria).

The material was analysed using an Olympus BX63 light microscope (Japan). A digital camera DP73 (Olympus, Japan) and the software "Cell Sens Dimension 1.8.1" (Olympus, 2013) were used for photography. Changes in the structure of cells and intercellular substance in articular cartilage were assessed according to the general recommendations for determining the degree of cartilage damage developed by the Osteoarthritis Research Society International (OARSI) [7], modified for rats [8].

On days 7, 21, and 35, the number of leukocytes and erythrocyte sedimentation rate (ESR) were determined in the blood and the total protein and rheumatoid factor (RF) content in the serum. The measurements were performed on a CHEM 7 biochemical analyser (ERBA, Czech Republic) using appropriate Randox test systems (UK).

The significance of differences between groups was assessed using the Kruskal-Wallis analysis of variance and the Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons using Microsoft Excel and Statistika 8 software packages. The critical value of the significance level was 0.05.

Research results and their discussion.

Assessment of the local state of the joints of experimental animals with the AA model showed that on day 7 of the simulation, they showed signs of inflammation – oedema and hyperaemia, as well as an increase in the arthritis index by 1.4 times compared to intact animals. It should be noted that this trend was maintained throughout the experiment. Microphotographs of histological sections shown in **fig. 1A**, showed that the ankle

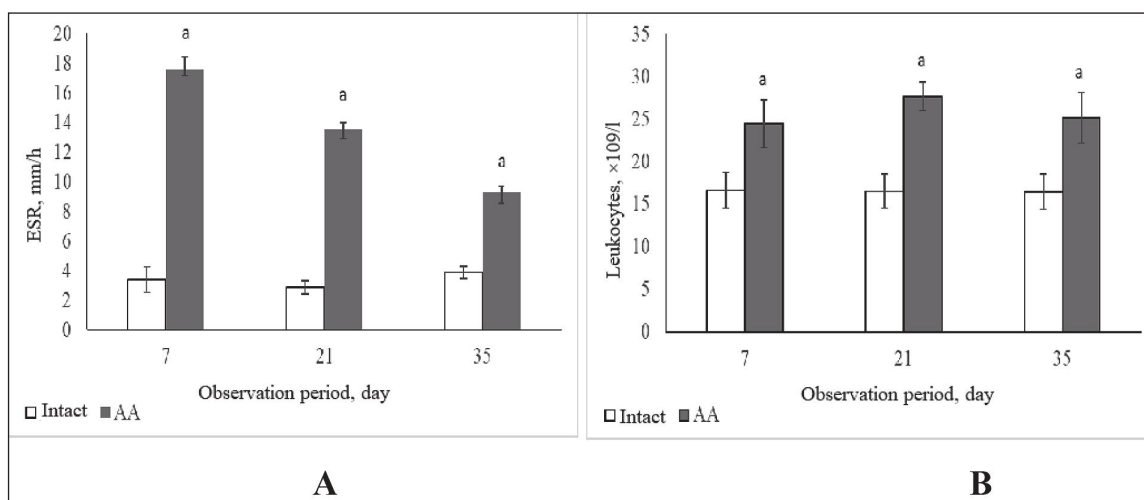


Figure 2 – Dynamics of ESR (A) and leukocytes (B) in the blood of intact rats and rats with adjuvant arthritis (x±SD; n=5).

Note: ^a – p<0.05 compared to the intact group of animals.

joint of intact animals was normal throughout the experiment.

Seven days after AA modelling, histological examination of the articular surface of both the tibia and talus revealed articular cartilage with destructive changes (fig. 1B). In particular, a single layer of elongated cells with large oval hyperchromatic nuclei and a narrow cytoplasmic rim was observed in the surface zone. The long axis of these chondrocytes was oriented parallel to the articular surface. However, there were areas without cells, unevenness of the surface zone, eosinophilic staining of the matrix, and surface stratification. The basophilic line was indistinct and sometimes double or triple. The synovial membrane was thickened due to oedema and synoviocyte proliferation. Dilated full-blooded capillaries and diffuse lymphoid and leukocyte infiltration were detected, typical of reactive arthritis. The described structural features are characteristic of 2-3 degrees of articular cartilage damage according to the OARSI scale.

Twenty-one days after AA modelling, the articular cartilage covering the tibia and talus showed increased manifestations of destructive changes (fig. 1C). The superficial zone was represented by a layer of fibrous cartilage. In some areas, it was sometimes absent. In the middle zone, there was an uneven distribution of

chondrocytes, areas without cells, desolate lacunae, and cells in a state of necrosis. The extracellular matrix was unevenly stained, ranging from sharply eosinophilic to slightly basophilic. The area of calcified cartilage was uneven, with vessels sprouting into it, and the absence of cells in the capsules was characteristic. The general area of the synovial membrane was represented by connective tissue of varying degrees of maturity, with elongated fibroblasts between the tortuous bundles of collagen fibres. The documented structural disorders of articular cartilage can be classified as 3-4 degrees of articular cartilage damage according to the OARSI scale.

At 35 days after the modelling, the congruence of the articular surfaces was impaired (fig. 1D). The cartilage coating was absent on most of the articular ends of the bones forming the ankle joint. The remaining islands of cartilage did not contain cells, were unevenly coloured, and had a loose surface corresponding to OARSI grade 4-5 articular cartilage damage. Deep vascular slits penetrated from the subchondral bone into the thickness of the cartilage remnants, sometimes opened into the joint cavity and replaced by connective tissue. The intertrabecular spaces were dilated and filled with fat or connective tissue. The joint capsule was thick due

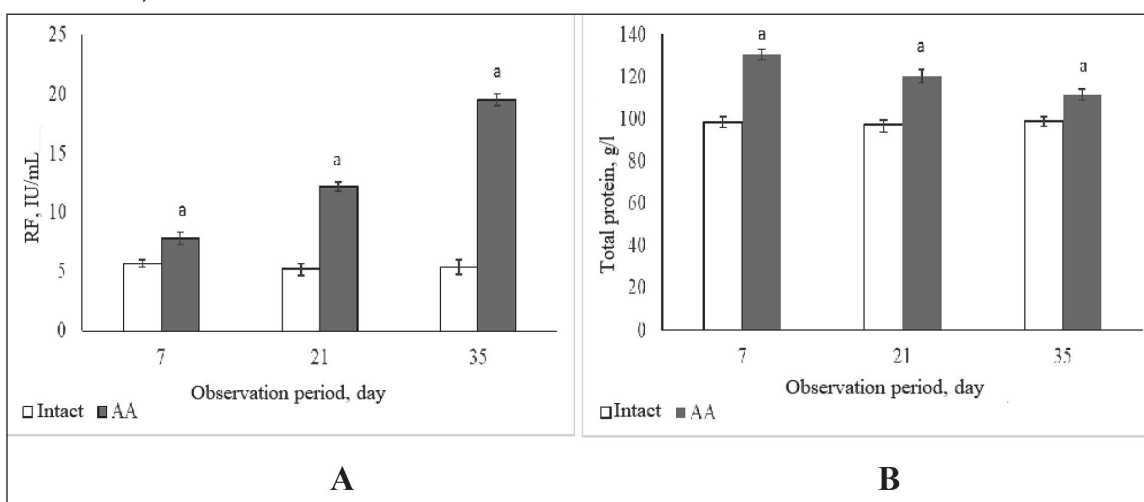


Figure 3 – Dynamics of rheumatoid factor (A) and total protein (B) content in the blood serum of intact and adjuvant arthritic rats (x±SD; n=5).

Note: ^a – p<0.05 compared to the intact group of animals.

to the growth of dense connective tissue. The described structural changes are characteristic of osteoarthritis.

Thus, in the group of rats with AA, histological examination at the early stages of observation (day 7) revealed changes consistent with arthritis. Subsequently, there was a progression of changes in the components of the joint – articular cartilage, subchondral bone and synovial membrane, which led to severe arthrosis disorders on days 21 and 35.

Haematological parameters are of great importance for both diagnostic and prognostic criteria for rheumatoid arthritis. One of the key indicators reflecting the presence of an inflammatory process in the body is ESR (fig. 2A). In the blood of rats with AA, an increase in ESR was observed compared to intact animals during the entire observation period, namely, 5.2-fold on day 7, 4.7-fold on day 21, and 2.4-fold on day 35.

The results obtained in our study showed that the number of leukocytes in AA animals was increased throughout the experiment, namely on day 7 by 1.5 times, on day 21 by 1.7 times and on day 35 by 1.6 times compared to the corresponding values in intact animals (fig. 2B).

The next stage of the work was to determine the dynamics of changes in RF in the blood serum of animals of the experimental groups (fig. 3A). An increase in RF in AA rats was observed throughout the study period, namely on day 7 by 1.4 times, on day 21 by 2.3 times and on day 35 by 3.6 times compared with the corresponding value in intact animals.

In animals with the AA model, the total protein content also exceeded the values of intact animals throughout the experiment (fig. 3B), namely on day 7 by 1.3

times, on day 21 by 1.2 times and on day 35 by 1.1 times compared with the corresponding value in intact animals.

The dynamics of the studied haematological parameters of inflammation (leukocyte content, total protein, rheumatoid factor, and erythrocyte sedimentation rate) in the group of AA animals showed the presence of two distinct phases: «acute» on day 7 and «chronic» on day 35 of observation.

According to the authors, treatment at the early stages of disease detection can slow down the progression of the disease. If the initiation of therapy is delayed, not all basic drugs may have time to show their effect [3, 9-11]. The longer the duration of the disease, the worse the response to «basic» drugs compared to patients who receive this therapy at an early stage of the disease, namely immediately after diagnosis. Based on the results obtained in our work, we chose the early phase of experimental adjuvant arthritis (day 7) to further evaluate the effectiveness of cell therapy.

Conclusions.

The analysis of the results shows that on day 7 of AA modelling there were signs of degenerative changes in articular cartilage that corresponded to acute arthritis, which correlates with the studied haematological indicators of inflammation. With an increase in the observation period to 35 days, the process chronifies, leading to severe arthrosis disorders in articular cartilage and the absence of normalisation of blood parameters.

Prospects for further research.

The data obtained can be used to substantiate and develop effective methods of treating arthritis in clinical practice.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-386-394

УДК 616.72-002-092.9:611.018.3:616.15

¹Введенський Д. Б., ²Волкова Н. О., ²Ашукіна Н. О., ¹Юхта М. С., ¹Гольцев А. М.

ДИНАМІКА ГІСТОБУДОВИ ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ ТА ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ У ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

²ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» (м. Харків, Україна)

volkovana781@gmail.com

Ревматоїдний артрит – мультисистемне, імуніопосередковане запальне захворювання, яке переважно вражає діартродіальні суглоби, викликаючи їх руйнування та прогресуючу інвалідність. Його форма прояву неоднорідна, і сучасний погляд на його етіопатогенез припускає, що при ініціації можуть бути залучені як генетичні фактори так і навколишнє середовище. Незважаючи на значний прогрес у розумінні патофізіології ревматоїдного артриту, його етіологія залишається невідомою. Метою роботи було визначення строків розвитку ад'ювантного артриту у щурів на основі дослідження динаміки дегенеративних змін в хрящовій тканині та показники маркерів запалення в крові щурів. Модель ад'ювантного артриту індукували субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда. Також була сформована група інтактних тварин. На 7, 21 та 35 добу після моделювання ад'ювантного артриту для гістологічного дослідження виділяли надп'яtkово-гомiлкові суглоби щурів дослідних груп. В крові на зазначених строках визначали кількість лейкоцитів та швидкість осідання еритроцитів, в сироватці – вміст загального білку та ревматоїдний фактор. Аналіз отриманих результатів свідчив, що на 7 добу моделювання ад'ювантного артриту спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриті та корелювали з дослідженими гематологічними показниками запалення. При збільшенні строку спостереження до 35 дiб відбувалася хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі та відсутності нормалізації показників крові. Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик лікування артритів у клінічній практиці.

Ключові слова: артрит, остеоартроз, моделювання, гістобудова, маркери запалення.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Роботу виконано згідно з планом науково-дослідної роботи відділу кріопатофізіології та імунології ІПКіК НАН України у рамках відомчої тематики: «Використання сучасних клітинних нанобіотехнологій в терапії ревматоїдного артриту», № державної реєстрації 0120U102974.

Вступ.

Ревматоїдний артрит (РА) — це хронічне системне аутоімунне захворювання, яке зазвичай характеризується синовіальним запаленням, руйнуванням хрящів і кісток та прогресуючою деформацією суглобів [1]. Пацієнти з прогресуючим РА частіше помирають передчасно, насамперед від серцево-судинних і легеневих ускладнень. На ранніх стадіях хвороба вражає переважно синовіальні суглоби, але з часом поширюється на легені, кровоносні судини та інші частини тіла. Таким чином, РА серйозно знижує довгострокову якість життя та вимагає тривалого клінічного лікування [2].

Основною метою лікування РА є повне або часткове зниження активності захворювання [3]. Раніше вважалося, що лікування протиревматичними препаратами «достатньо добре», а одужання вважалося настільки ж бажаним, наскільки недосяжним. На думку клініцистів, базова терапія може уповільнити прогресування захворювання та викликати стійку ремісію, особливо якщо вона розпочата з тривалістю симптомів менше 3 місяців. Слід зазначити, що розвиток РА у великій мірі зумовлено наявністю первинного імунodefіциту, який сприяє переходу гострого запального процесу в хронічну стадію. У той же час тривалий запальний процес призводить до зниження імунологічної реактивності організму. Експериментальні моделі запалення можуть використовуватися як для оцінки впливу різних етіологічних факторів, так і для дослідження ефективності його лікування [2-5]. Так на скринінговому етапі дослідження, пов'язаного з РА, рекомендується використовувати модель ад'ювантного артриту [1, 2, 4-5]. Проте ця модель використовується на багатьох експериментальних тваринах різного віку та статі. Тому у багатьох випадках отримані експериментальні дані носять суперечливий характер, а показники маркерів розвитку запалення різняться [1-5]. Це обумовило необхідність визначення динаміки стану суглобового хряща та гематологічних маркерів запалення, як одних з головних показників при вивченні розвитку запального процесу, з метою вибору найбільш оптимального строку для проведення клітинної терапії ад'ювантною моделі РА на щурів.

Мета дослідження.

Визначення строків розвитку ад'ювантного артриту у щурів (гострої та хронічної фази) на основі дослідження динаміки дегенеративних змін в хрящовій тканині та показників маркерів запалення в крові щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

Експериментальних тварин утримували на базі віварію ІПКіК НАН України в пластикових клітинах (по п'ять тварин на клітку) при контрольованій температурі (18–22° С), вологості (30%–70%) та освітленні (світло вмикалося з 8 ранку до 8 вечора) зі стандартною дієтою та вільним доступом до їжі та води. Експе-

рименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Модель ад'ювантного артриту (АА) у щурів-самців індукували субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда (SantaCruz, США) в дозі 0,25 мл (n=15). Також була сформована група інтактних тварин (n=15).

На 7, 21 та 35 добу визначали наявність місцевих ознак запалення та індекс артриту. Останній являв собою співвідношення окружності експериментального суглоба лапи на відповідний день дослідження до окружності контрольного суглоба тієї ж тварини.

Для гістологічного дослідження в зазначені вище терміни виділяли надп'яtkово-гомілкові суглоби щурів дослідних груп. Матеріал фіксували в розчині 10% нейтрального формаліну, декальцинували в 4% розчині мурашиної кислоти, зневоднювали в етилових спиртах збільшеної концентрації (від 70° до 96°), у розчині 96° спирту з хлороформом (1:1), заливали матеріал у парафін [6]. Виготовлені на санному мікромомі «Reichert» (Австрія) аксіальні гістологічні зрізи суглобів забарвлювали гематоксиліном Вейгерта та еозинном.

Аналізували матеріал у світловому мікроскопі Olympus BX63 (Японія). Для фотографування використано цифрову камеру DP73 (Olympus, Японія) і програмне забезпечення «Cell Sens Dimension 1.8.1» (Olympus, 2013). Зміни у структурі клітин та міжклітинної речовини в суглобовому хрящі оцінювали згідно із загальними рекомендаціями щодо визначення ступенів ураження хряща, розробленими Міжнародним товариством з дослідження остеоартрозу (Osteoarthritis Research Society International – OARSI) [7], модифікованими для щурів [8].

На 7, 21 та 35 добу в крові визначали кількість лейкоцитів та швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), в сироватці – вміст загального білку та ревматоїдний фактор (РФ). Вимірювання проводили на біохімічному аналізаторі CHEM 7 (ERBA, Чеська Республіка) за допомогою відповідних тест-систем «Randox» (Великобританія).

Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою аналізу дисперсії за рангами Крускала-Уолліса та тесту Ст'юдента-Ньюмана-Кейлса для множинного порівняння з використанням пакетів програм «Microsoft Excel» та «Statistika 8». Критичне значення рівня значущості приймалося рівним 0,05.

Результати дослідження та їх обговорення.

Оцінка локального стану суглобів експериментальних тварин з моделлю АА показала, що на 7 добу моделювання в них спостерігались ознаки запального процесу – набряк і гіперемія, а також збільшення індексу артриту в 1,4 рази відносно інтактних тварин. Слід зазначити, що ця тенденція зберігалася протягом усього строку експерименту.

Мікрофотографії гістологічних зрізів, представлені на **рис. 1А**, показали, що надп'яtkово-гомілковий

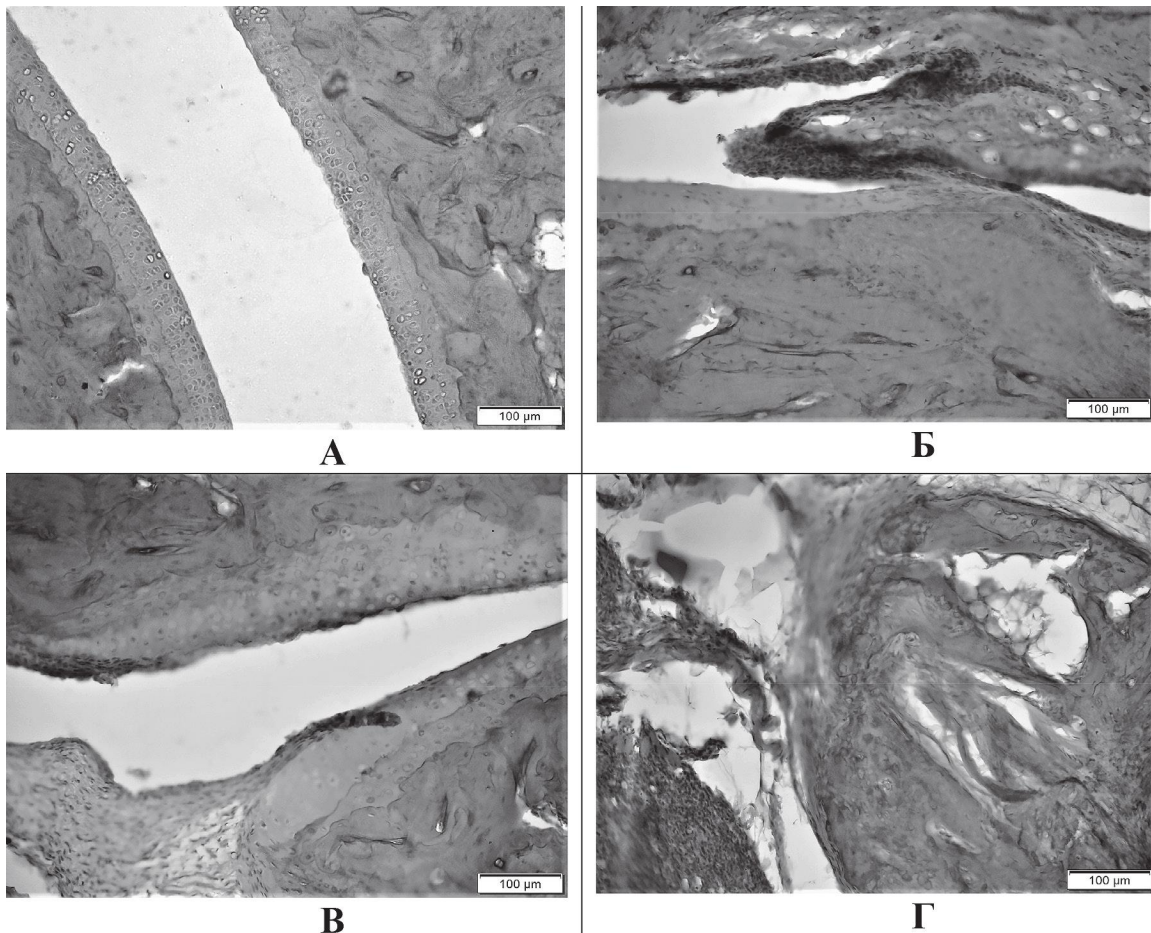


Рисунок 1 – Фрагменти надп'яtkово-гомiлкового суглоба щурів інтактної групи (А) та на 7 (Б), 21 (В) та 35 (Г) добу моделювання ад'ювантного артриту. Забарвлення гематоксилином та еозином.

суглоб інтактних тварин був нормальним на протязі всього строку експерименту.

Через 7 дiб після моделювання АА під час гістологічного дослідження на суглобовій поверхні як великогомiлкової, так і надп'яtkової кісток виявляли суглобовий хрящ, у якому були відмічені деструктивні зміни (рис. 1Б). Зокрема, у поверхневій зоні спостерігали один шар витягнутих клітин з великими овальними гіперхромними ядрами та вузьким обідком цитоплазми. Довга вісь цих хондроцитів була орієнтована паралельно суглобовій поверхні. Проте спостерігали території без клітин, нерівність поверхневої зони, еозинофільне забарвлення матриксу, розшарування поверхні. Базофільна лінія була нечіткою, а на деяких – була подвійною або потрійною. Синовіальна оболонка була потовщеною за рахунок набряку та проліферації синовіоцитів. У ній визначали розширені повнокровні капіляри, дифузну лімфоїдно-лейкоцитарну інфільтрацію, що характерно для реактивного артриту. Описані структурні особливості характерні для 2-3 ступеня ураження суглобового хряща за шкалою OARSI.

Через 21 добу після моделювання АА в суглобовому хрящі, який вкривав великогомiлкову та надп'яtkову кістки, збільшувалися прояви деструктивних змін (рис. 1В). Поверхнева зона була представлена шаром волокнистого хряща, а на окремих ділянках вона подекуди була відсутньою. У середній зоні було виявлено нерівномірність розташування хондроцитів, території без клітин, запустілі лаку-

ни, клітини в стані некробіозу. Екстрацелюлярний матрикс був забарвлений нерівномірно – від різко еозинофільного до слабо базофільного. Зона кальцифікованого хряща була нерівномірною, в неї проростали судини, характерною була відсутність клітин у капсулах. Загальна територія синовіальної оболонки була представлена сполучною тканиною різного ступеня зрілості, де між звивистими пучками колагенових волокон містилися видовжені фібробласти. Зафіксовані структурні порушення суглобового хряща можна класифікувати як 3-4 ступінь ураження суглобового хряща за шкалою OARSI.

Через 35 дiб після моделювання конгруентність суглобових поверхонь була порушеною (рис. 1Г). На більшій частині суглобових кінців кісток, які утворюють надп'яtkово-гомiлковий суглоб, хрящове покриття було відсутнім. Острівці хряща, які залишилися, не містили клітин, були нерівномірно забарвленими, із розволокненням поверхні, що відповідає за шкалою OARSI 4-5 ступеню ураження суглобового хряща. Глибокі судинні щілини проникали з боку субхондральної кістки в товщу залишків хряща, подекуди відкривалися в порожнину суглоба та заміщувалися сполучною тканиною. Міжтрабекулярні простори були розширеними, заповненими жировою або сполучною тканиною. Капсула суглоба була товстою за рахунок розростання щільної сполучної тканини. Описані структурні зміни характерні для остеоартрозу.

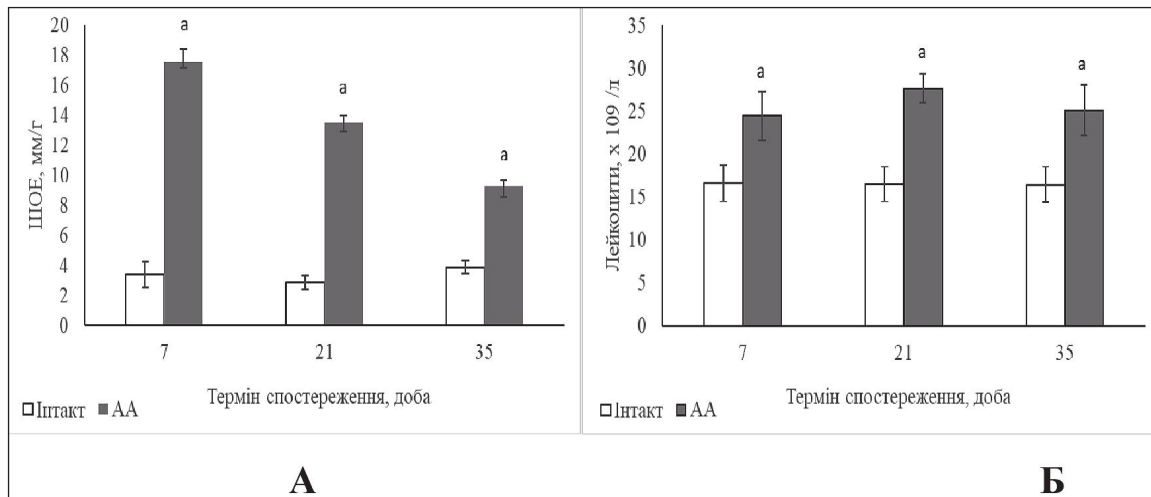


Рисунок 2 – Динаміка ШОЕ (А) та лейкоцитів (Б) в крові щурів інтактної групи та з ад'ювантним артритом ($\bar{x} \pm SD$; $n=5$).

Примітка: ^a – $p < 0,05$ по відношенню до інтактної групи тварин.

Таким чином, у групі щурів з АА під час гістологічного дослідження на ранніх термінах спостереження (7-ма доба) були виявлені зміни, що відповідають артрити. У подальшому відбувалося прогресування змін у складових суглоба — суглобовому хрящі, субхондральній кістці та синовіальній оболонці, які на 21-му та 35-ту добу призвели до розвитку виражених артрозних порушень.

Гематологічні показники мають велике значення як для діагностичних, так і прогностичних критеріїв перебігу ревматоїдного артрити. Одним з ключових показників, які відображають наявність запального процесу в організмі, є ШОЕ (рис. 2А). У крові щурів з АА відзначалося підвищення показнику ШОЕ в порівнянні з інтактними тваринами протягом всього строку спостереження, а саме: на 7 добу в 5,2 рази, на 21 добу в 4,7 рази та на 35 добу в 2,4 рази.

Отримані у нашому дослідженні результати свідчили, що кількість лейкоцитів у тварин з АА була підвищена протягом усього строку експерименту, а саме: на 7 добу в 1,5 рази, на 21 добу в 1,7 рази та на 35 добу 1,6 рази стосовно відповідних показників у інтактних тварин (рис. 2Б).

Наступним етапом роботи було визначення динаміки зміни РФ в сироватці крові тварин дослідних

груп (рис. 3А). Підвищення показнику РФ у щурів з АА спостерігали протягом всього строку дослідження, а саме: на 7 добу в 1,4 рази, на 21 добу в 2,3 рази та на 35 добу в 3,6 рази порівняно з відповідним показником у інтактних тварин.

У тварин з моделлю АА показник вмісту загального білку також перевищував значення інтактних тварин протягом усього строку експерименту (рис. 3Б), а саме: на 7 добу в 1,3 рази, на 21 добу в 1,2 рази та на 35 добу в 1,1 рази порівняно з відповідним показником у інтактних тварин.

Динаміка досліджених гематологічних показників запалення (вміст лейкоцитів, загального білку, ревматоїдного фактору, а також швидкість осадження еритроцитів) в групі тварин з АА свідчила про наявність двох чітко вираженими фаз: «гострої» на 7 добу та «хронічної» на 35 добу спостереження.

За даними авторів, проведення лікування на ранніх стадіях виявлення хвороби, може уповільнити прогресування захворювання. Якщо призначення терапії запізнюється, то не всі базові препарати можуть «встигнути» проявити свою дію [3, 9-11]. Чим більше тривалість захворювання, тим гірша реакція на «базові» препарати в порівнянні з пацієнтами, які отримують цю терапію на ранній стадії захворювання, а

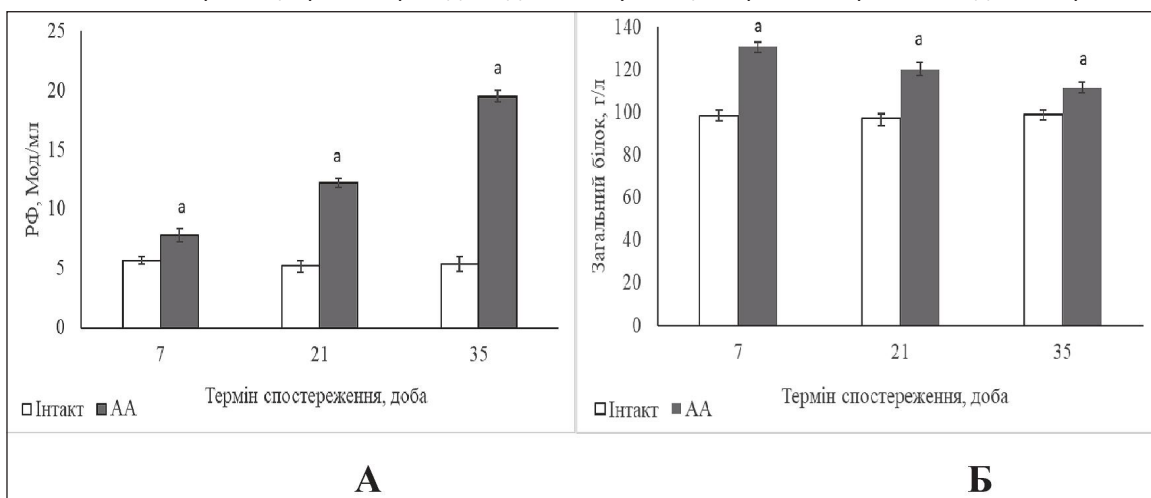


Рисунок 3 – Динаміка вмісту ревматоїдного фактору (А) та загального білку (Б) в сироватці крові щурів інтактної групи та з ад'ювантним артритом ($\bar{x} \pm SD$; $n=5$).

Примітка: ^a – $p < 0,05$ по відношенню до інтактної групи тварин.

саме відразу після постановки діагнозу. Базуючись на результатах отриманих в нашій роботі, ми обрали ранню фазу експериментального ад'ювантного артриту (7 доба) для подальшої оцінки ефективності проведення клітинної терапії.

Висновки.

Аналіз отриманих результатів свідчить, що на 7 добу моделювання АА спостерігалися ознаки дегенеративних змін у суглобовому хрящі, які відповідали гострому артриту, що корелює з дослідженими

гематологічними показниками запалення. При збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувається хронізація процесу, що призводить до розвитку виражених артрозних порушень у суглобовому хрящі та відсутністю нормалізації показників крові.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик лікування артритів у клінічній практиці.

References / Література

1. Bullock J, Rizvi S, Saleh AM, Ahmed SS, Do DP, Ansari RA, et al. Rheumatoid arthritis: A brief overview of the treatment. Med Princ Pract. 2018;27(6):501-507. DOI: <https://doi.org/10.1159/000493390>.
2. Perez L. Acute phase protein response to viral infection and vaccination. Arch Biochem Biophys. 2019;671:196-202. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abbb.2019.07.013>.
3. Aho OM, Finnilä M, Thevenot J, Saarakkala S, Lehenkari P. Subchondral bone histology and grading in osteoarthritis. PloS one. 2017;12(3):e0173726. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173726>.
4. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. Lancet London, England, 2017;389(10086):2338-2348. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31491-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31491-5).
5. Volkova NO, Yukhta MS, Yurchuk TO, Stepanyuk LV, Ivanova OD, Pavlovych OV. Modelyuvannya khronichnoho zapalennya yayechnykh. Patolohiia. 2014;1:100-104. [in Ukrainian].
6. Dey P. Basic and advanced laboratory techniques in histopathology and cytology. Singapore: Springer; 2018. 275 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8>.
7. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis and Cartilage. 2006;14:13-29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>.
8. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. Osteoarthritis and cartilage. 2010;18(3):24-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2010.05.030>.
9. Roubenoff R, Freeman LM, Smith DE, Abad LW, Dinarello CA, Kehayias JJ. Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology. 1997;40(3):534-539. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.1780400320>.
10. Volkova NA, Yukhta MS, Yurchuk TA, Ivanova ED, Stepanuk LV, Pavlovich EV, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries. Biotechnol Acta. 2014;7(5):35-42. DOI: <https://doi.org/10.15407/biotech7.05.035>.
11. Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016;4(64):277-284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.06.008>.

ДИНАМІКА ГІСТОБУДОВИ ХРЯЩОВОЇ ТКАНИНИ ТА ГЕМАТОЛОГІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ КРОВІ У ЩУРІВ З АД'ЮВАНТНИМ АРТРИТОМ

Введенський Д. Б., Волкова Н. О., Ашукіна Н. О., Юхта М. С., Гольцев А. М.

Резюме. Проблема лікування ревматичних захворювань актуальна в усьому світі. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я у розвинених країнах світу запальні захворювання суглобів і сполучної тканини посідають друге місце після серцево-судинної патології серед причин інвалідності та смертності. Метою роботи було визначення строків розвитку ад'ювантного артриту у щурів на основі дослідження динаміки дегенеративних змін в хрящовій тканині та показники маркерів запалення в крові щурів. Модель ад'ювантного артриту індукували субплантарним введенням повного ад'юванта Фрейнда. Також була сформована група інтактних тварин. На 7, 21 та 35 добу після моделювання ад'ювантного артриту для гістологічного дослідження виділяли надп'яtkово-гомількові суглоби щурів дослідних груп. В крові на зазначених строках визначали кількість лейкоцитів та швидкість осідання еритроцитів, в сироватці – вміст загального білку та ревматоїдний фактор. Оцінка локального стану суглобів експериментальних тварин показала, що у щурів з моделлю ад'ювантного артриту на 7 добу моделювання спостерігались ознаки запального процесу в суглобі – набряк і гіперемія, а також збільшення індексу артриту в 1,4 рази відносно інтактних тварин. У суглобовому хрящі на цей термін спостереження визначалися ознаки дегенеративних змін, які відповідали гострому артриту та корелювали з дослідженими гематологічними показниками запалення (вміст лейкоцитів, загального білку, ревматоїдного фактору, а також швидкість осадження еритроцитів). При збільшенні строку спостереження до 35 діб відбувалась хронізація процесу, що призводило до розвитку виражених артрозних порушень, що мало прояв у відсутності хрящового покриття на більшій частині суглобових кінців кісток, які утворюють надп'яtkово-гомільковий суглоб та відсутністю нормалізації показників крові. Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик лікування артритів у клінічній практиці.

Ключові слова: артрит, остеоартроз, моделювання, гістобудова, маркери запалення.

DYNAMICS OF HISTOSTRUCTURE OF CARTILAGE TISSUE AND HEMATOLOGICAL INDICATORS OF BLOOD IN RATS WITH ADJUVANT ARTHRITIS

Vvedenskyi D. B., Volkova N. O., Ashukina N. O., Yukhta M. S., Goltsev A. M.

Abstract. The problem of treatment of rheumatic diseases is relevant all over the world. According to the World Health Organization, in the developed countries of the world, inflammatory diseases of the joints and connective tissue rank second place after cardiovascular pathology among the causes of disability and mortality. The aim of the work was to determine the terms of the development of adjuvant arthritis in rats based on the study of the dynamics of degenerative changes in cartilage tissue and indicators of inflammatory markers in the blood of

rats. The adjuvant arthritis model was induced by subplantar injection of complete Freund's adjuvant. A group of intact animals was also formed. On the 7th, 21st and 35th day after modeling of adjuvant arthritis, ankle joints of the rats of experimental groups were isolated for histological examination. At the indicated terms the number of leukocytes and the sedimentation rate of erythrocytes were determined in the blood, and the content of total protein and rheumatoid factor were measured in the serum. The assessment of the local condition of the joints of the experimental animals showed that in rats with the model of adjuvant arthritis on the 7th day of modeling signs of the inflammatory process in the joints, namely edema and hyperemia, were observed as well as the index of arthritis was increased by 1.4 times compared to intact animals. In the articular cartilage during this period of observation, signs of degenerative changes corresponded to acute arthritis were determined correlating with the investigated hematological indicators of inflammation (the content of leukocytes, total protein, rheumatoid factor, as well as the rate of erythrocyte sedimentation). When the observation period increased to 35 days, the process became chronic, which led to the development of pronounced arthrosis disorders, which appeared in the absence of a cartilage coating on most of the articular ends of the bones that form the ankle joint and the lack of normalization of blood parameters. The obtained data can be used to justify and develop effective methods of treatment of arthritis in clinical practice.

Key words: arthritis, osteoarthritis, modeling, histostructure, markers of inflammation.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Vvedenskyi D. B.: [0000-0002-0169-9592](https://orcid.org/0000-0002-0169-9592)^{ABCD}

Volkova N. O.: [0000-0003-1832-6116](https://orcid.org/0000-0003-1832-6116)^{ABDEF}

Ashukina N. O.: [0000-0002-0478-7440](https://orcid.org/0000-0002-0478-7440)^{BCDF}

Yukhta M. S.: [0000-0001-9124-8455](https://orcid.org/0000-0001-9124-8455)^{BCDF}

Goltsev A. M.: [0000-0002-5289-5876](https://orcid.org/0000-0002-5289-5876)^{AF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Volkova Nataliia Oleksandrivna / Волкова Наталія Олександрівна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61016, Kharkiv, 23 Pereyaslavska str. / Адреса: Україна, 61016, м. Харків, вул. Переяславська 23

Tel.: +380661298597 / Тел.: +380661298597

E-mail: volkovana781@gmail.com

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 / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 20.03.2023 / Стаття надійшла 20.03.2023 року

Accepted 28.08.2023 / Стаття прийнята до друку 28.08.2023 року

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-394-402

UDC 616.36-089.87-06:616-091]-092.9

Hnatyuk M. S., Nesteruk S. O., Tatarchuk L. V., Monastyrskaya N. Ya., Jasynovsry O. B.

QUANTITATIVE MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE STRUCTURAL RECONSTRUCTION OF THE HEMOMICROCIRCULATORY BED OF THE TESTIS IN THE CONDITIONS POSTRESECTION PORTAL HYPERTENSION

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

hnatjuk@tdmu.edu.ua

Resections of large liver volumes are often complicated by the development of post-resection portal hypertension, which is complicated by bleeding from varicose veins of the oesophagus, stomach, rectum, ascites, splenomegaly, secondary hypersplenism, parenchymal jaundice, portosystemic encephalopathy, and multiple organ failure. The reproductive system organs are extremely vulnerable to various changes in haemodynamics, but to date, there is no complete understanding of the morphological and pathophysiological processes occurring in the testes under conditions of prolonged hypertension in the hepatic portal vein. When exposed to endogenous and exogenous negative factors, the haemomicrocirculatory bed plays an essential role in developing damage to organs and systems. The study aimed to investigate the peculiarities of the structural changes in the hemomicrocirculatory bed of the testes in the conditions of postresection portal hypertension using quantitative morphological methods. Morphological methods were used to study the vessels of the hemomicrocirculatory bed of the left and right testes of 62 laboratory mature male rats divided into three groups. Group 1 - 15 control animals, group 2 - 30 rats with postresection portal hypertension, and group 3 - 17 animals with postresection portal hypertension who developed multiple organ