

**Summary.** *An effect of the adamantane KVM-97 derivative on the Candida albicans yeasts-like fungus cell ultrastructure is presented in the manuscript. The study was carried out with transmission electron microscopy. It was shown that the fungicidal concentration of compound caused changes of the ultrastructure of cytoplasm and mitochondria starting from 1 h of treatment, that indicates possible disorder in fungal cells energy process.*

**Key words:** *adamantine derivative, Candida albicans, antifungal action, ultrastructure.*

*Рецензент: д.мед.н., професор Шарикіна Н.І.*

*Стаття надійшла до редакції 11.06.2015 р.*

*Дудікова Дар'я Маратівна - мол. наук. сп. відділу фармакології протимікробних засобів ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України"; +38 044 456-83-32; dudikova@ift.org.ua*

*Войчук Сергій Іванович - к.біол.н., ст.наук.співроб. відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України; +38 096 758-09-96; svoychuk@hotmail.com*

*Вринчану Ніна Олексіївна - д.мед.н., завідуючий відділом фармакології протимікробних засобів ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України"; +38 044 456-78-62*

© Калашніков А.В., Бруско А.Т., Кузів Є.Л., Вільцанюк О.О., Апуховська Л.І.

УДК: 616.72: 616.71-018.3: 615.357

**Калашніков А.В.<sup>1</sup>, Бруско А.Т.<sup>1</sup>, Кузів Є.Л.<sup>4</sup>, Вільцанюк О.О.<sup>2</sup>, Апуховська Л.І.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України" (вул. Воровського, 27, м.Київ, 04053, Україна); <sup>3</sup>Інститут біохімії ім. В.О.Паладіна НАН України (вул. Леонтовича, 6, м.Київ, 01030, Україна); <sup>2</sup>Вінницький національний медичний університет імені М.І.Пирогова (вул. Пирогова, 56, м.Вінниця, 21018, Україна); <sup>4</sup>Військово-медичний клінічний центр Центрального регіону (вул. Свердлова, 185, м.Вінниця, 21021, Україна)

## МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СУГЛОБОВОГО І ПРОКСИМАЛЬНОГО ЕПІФІЗАРНОГО ХРЯЩІВ ТА ДІАФІЗА СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ПРИ КОРОТКОТРИВАЛОМУ ВВЕДЕННІ ПРЕДНІЗОЛОНУ

**Резюме.** *В експерименті на 34 щурах лінії Вістар проведено вивчення морфологічних змін в кістковій тканині при введенні преднізолону короткотривалим курсом протягом 30 діб. В результаті проведених досліджень встановлено, що у тварин на фоні прийому преднізолону виникають дегенеративно-некротичні зміни в суглобовому та епіфізарному хрящах, у компактній та губчастій кістковій тканині епіфізу та метафізу. Ці зміни супроводжуються порушенням їх структур, сповільненням перебування компактною кістковою тканиною та росту кістки в довжину та її товщину.*

**Ключові слова:** *остеопороз, преднізолон, морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині при прийомі преднізолону.*

### Вступ

Сучасні підходи до комплексного лікування різних патологічних станів пов'язані з прийомом глюкокортикоїдів. Поряд із позитивним впливом на перебіг основного захворювання такої терапії внаслідок прийому глюкокортикоїдів може виникати цілий ряд ускладнень, особливо при довготривалій гормонотерапії. Одним із таких ускладнень є остеопороз, який виникає внаслідок прийому глюкокортикоїдів [Беловол, Князькова, 2012]. Проблемі профілактики остеопорозу при прийомі глюкокортикоїдів присвячена велика кількість робіт, в яких вивчені механізми розвитку ускладнень, методи профілактики та їх лікування [Наумов, 2010; Дыдыкина, Алексеева, 2011]. Сьогодні в медичній практиці крім довготривалого призначення глюкокортикоїдів використовують призначення їх короткими курсами, але робіт щодо вивчення впливу на організм короткотривалого прийому глюкокортикоїдів обмаль. Тому виникла необхідність у вивченні впливу короткотривалого прийому глюкокортикоїдів на морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині.

*Мета* дослідження - вивчити в експерименті морфологічні зміни в кістковій та хрящовій тканині при короткотривалому прийомі преднізолону.

### Матеріали та методи

Експериментальні дослідження проведені у відповідності до основних біоетичних норм Гельсінської декларації про права людини та біомедицину (1975, 1977), Ванкуверської конвенції (1979, 1994) про біомедичні експерименти, відповідних положень ВООЗ, міжнародної ради медичних наукових товариств, міжнародного кодексу медичної етики (1983) та Закону України №3447-IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

Експериментальні дослідження проведено на 34 щурах-самцях лінійної породи Вістар масою тіла 100,0±5,0г, які знаходились у віварії Інституту біохімії ім.В.О.Паладіна НАН України і утримувались відповідно до загальноприйнятих норм [Шалимов и др., 1989; Западнюк и др., 2003]. Перед проведенням дослідження відібрані для експерименту тварини знаходились 2 тижні на карантині на стандартному харчовому режимі віварію.

Експериментальні тварини були розділені на 2 серії дослідів. У 1 серії дослідів (контрольна) тваринам у шлунок за допомогою зонда вводили 0,5 мл води. В 2 серії дослідів (для визначення впливу преднізолону на зміни в організмі та його впливу на структурно-функціональну організацію тканинних структур кістки та суг-

лобового хряща) тваринам вводили 0,5 мг преднізолону.

В обох серіях дослідів спостерігали за тваринами протягом 30 діб. На 30 добу від початку експерименту, тварин зважували та виводили з досліду шляхом передозування ефіру для наркозу, після чого забирали матеріал для морфологічних та морфометричних досліджень. Стегнову кістку одразу після забору звільняли від м'яких тканин та проводили остеометрію: вимірювали її загальну довжину та товщину у фронтальній площині середньої третини діафіза. Для цього застосовували штангенциркуль із допустимою помилкою 0,1 мм. Стегнові кістки після остеометрії розпилювали на повздовжні та поперечні шматочки, які фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, а після зневоднення і знежирювання в спиртах наростаючої міцності заливали у целоїдин. Отримували на мікротомі тонкі повздовжні у фронтальній площині проксимального відділу стегнової кістки зрізи та поперечні і повздовжні зрізи середньої третини діафіза, фарбували їх гематоксиліном та еозинном, а також пікрофуксином за ван Гізеном.

Для визначення структурно-функціонального стану суглобового хряща головки стегнової кістки та епіфізарного хряща проксимального відділу стегнової кістки у фронтальній площині під впливом преднізолону нами на стандартних ділянках проведено морфометричні дослідження для вивчення активності проліферативних процесів. У центральному відділі суглобового хряща головки стегнової кістки, у стандартній ділянці, шириною 20 мм на усю глибину зрізу від його поверхні до підхрящової кісткової пластинки, оцінювали структурно-функціональний стан та підраховували кількість хондроцитів, за якою визначали їх проліферативну активність. Для цього використовували світловий мікроскоп фірми "ZEISS Axiostar plus" з об'єктивом x20 (рис. 1).

Крім цього, на поперечних гістологічних зрізах на межі середньої та нижньої третин діафіза стегнової кістки на стандартних ділянках підраховували кількість поширених центральних судинних каналів, які свідчать про активність ремоделювання кісткової тканини діафіза в умовах дії преднізолону [Меркулов, 1986; Автандилов, 1990; Микроскопическая техника ..., 2002].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням методів варіаційної статистики з визначенням середніх величин. Отримані результати порівнювали у різних серіях дослідів. Для визначення достовірності їх відмінностей використовували t - критерій Стьюдента [Боровиков, 2003; Реброва, 2003].

Статистичні розрахунки було проведено за допомогою інтегральної системи STATISTICA® 5.5 (STAT+SOFT® Snc, USA), ліцензія за № А ХХ 910А374605FA.

### Результати. Обговорення

Вивчення морфологічної будови суглобового і проксимального епіфізарного хрящів та діафіза стегнової кістки тварин у контрольній серії дослідів показу-

ли, що зональна гістологічна будова суглобового хряща головки стегнової кістки щурів-самців 2-місячного віку контрольних тварин була без наявних ознак її порушення. Чіткого послідовного переходу поверхової зони суглобового хряща в проміжну та з проміжної у глибоку не спостерігалось. У формуванні поверхневої та проміжної зон суглобового хряща брали участь дрібні типові сплюснені хондроцити та їх ізогенні групи. Зона кальцинованого хряща, котра межувала з підхрящовою кістковою пластинкою, містила дрібні хондроцити, які, порівняно з клітинами поверхневої та проміжної зон суглобового хряща, були з ознаками слабкого фарбування та пікнозу. Структура підхрящової кісткової пластинки була з явищами активної перебудови, що пов'язано з віковими особливостями (незакінченим ростом) тварин (рис. 2).

Загальний вигляд структурно-функціональної організації проксимального епіфізарного хряща у тварин контрольної серії дослідів стегнової кістки в нормі наведено на рис. 3. На гістологічних препаратах спостерігалось активне формування первинних на поверхні шару

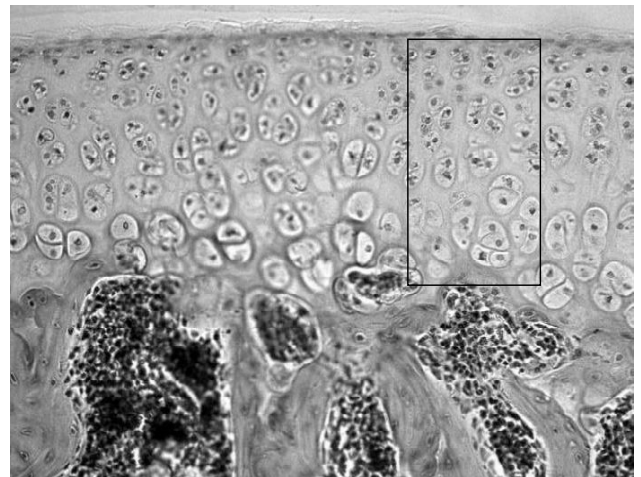


Рис. 1. Стандартна ділянка в центрі поверхні головки суглобового хряща стегнової кістки щура, у якій підраховували кількість хондроцитів.

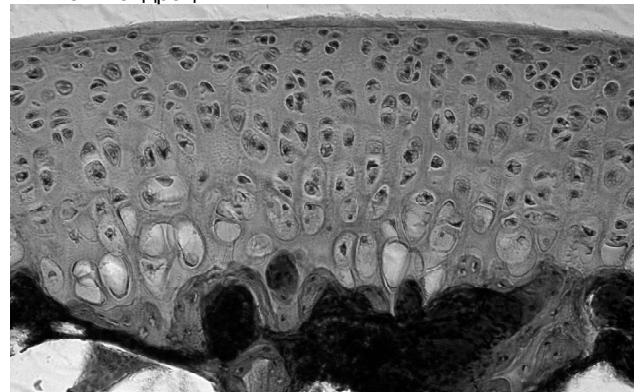


Рис. 2. Структура клітинних елементів та основна речовина центральної частини суглобового хряща головки стегнової кістки щура, контрольної серії дослідів. Гематоксилін-еозин. x20.

вторинних кісткових перекладок. На рис. 4. чітко просліджується зональна, типова для епіфізарного хряща будова, що складається із зони збереженого хряща, зони проліферації з формуванням колонок хондроцитів, зони гіпертрофії, що побудована шарами гіпертрофованих хондроцитів, зони резорбції та зони окостеніння, яка включає первинні та вторинні кісткові перекладки.

Кісткова тканина епіфіза мала звичайні, характерні для кісткової тканини цієї локалізації, будову та вигляд кісткових перекладок, оточених по периферії епіфіза замикаючою кістковою пластинкою.

У метафізі кісткові перекладки були переважно по-вздовжньої спрямованості та склалися з проксимального шару первинних тонких перекладок, що тільки формуються, та дистального - потовщених вторинних перекладок (рис. 2, рис. 3).

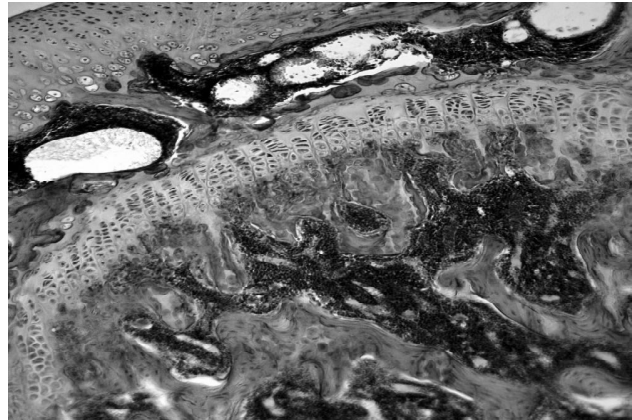
У компактній кістковій тканині діафіза стегнової кістки щурів-самців 2-місячного віку на поперечному зрізі середньої третини діафіза чітко виявляли два прошарки, які умовно розділяли на ендостальний та періостальний (рис. 4).

Між ендостальним та періостальним прошарками у 3 тварин просліджували прошарок незакінченої перебудови попередніх остеонних структур, які були утворенні до цього в процесі потовщення діафізарного відділу кістки (ріст у товщину).

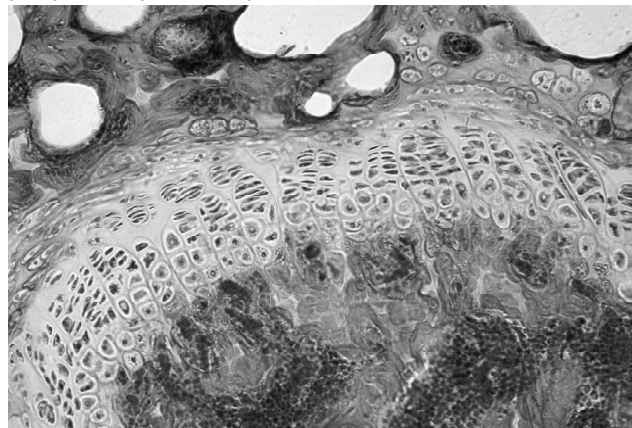
У двохмісячному віці майже в усіх тварин періостальний прошарок компактної кісткової тканини був найтовстіший, ендостальний прошарок за товщиною був тонший, ніж періостальний, і тільки у 2 спостереженнях дорівнював товщині останнього. Проміжний шар компактної кісткової тканини просліджувався у вигляді невеликих, нерівномірної за товщиною циркулярної форми витончених ділянок та тільки у 2 випадках спостерігали по усьому периметрі діафіза. Шари зовнішніх оточуючих, або генеральних пластинок, та внутрішніх генеральних пластинок, у щурів 2-місячного віку повністю сформовані не були.

Отримані нами дані про будівлю суглобового та епіфізарного хрящів, компактного шару та губчастої кісткової тканини діафіза, а також епіметафіза проксимально-го відділу стегнової кістки у щурів 2-місячного віку використані в якості контрольних показників для визначення впливу преднізолону, котрий широко застосовується при лікуванні захворювань та ушкоджень органів та систем організму на структурно-функціональну організацію компактної кісткової тканини діафіза та на процес росту кісток, що має не тільки клінічне, але й теоретичне значення.

Результати проведеного гістологічного дослідження структури та кількісної оцінки хондроцитів суглобового хряща другої групи тварин, яким протягом 30 діб щоденно призначали преднізолон у дозировці 0,5 мг, дозволили виявити зміни, які свідчать про негативний вплив препарату преднізолон на структурно-функціональну організацію тканин стегнової кістки щурів. Гістологічні зміни суглобового хряща за місяць застосован-



**Рис. 3.** Проксимальний епіфізарний хрящ стегнової кістки в нормі. Активне формування первинних кісткових перекладок на поверхні шару вторинних кісткових перекладок утварин контрольної серії дослідів. Гематоксилін-еозин. x10.

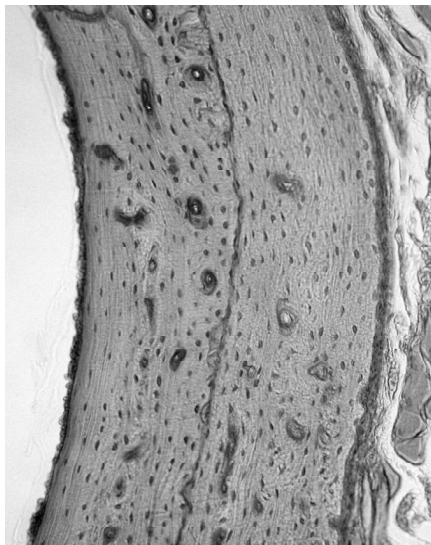


**Рис. 4.** Зональна будова проксимального епіфізарного хряща стегнової кістки на ділянці активного кісткоутворення у тварин контрольної серії дослідів. Гематоксилін-еозин. x40.

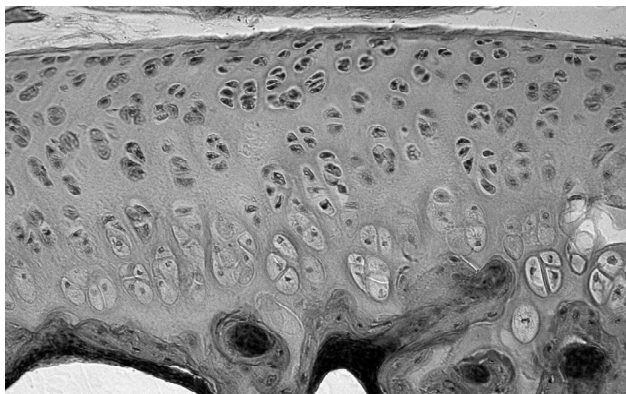
ня препарату характеризувалися зниженням інтенсивності фарбування клітинних елементів й основної речовини кісткової тканини, а також змінами проліферативної активності хондроцитів у його поверхневій зоні. Крім того, виявлені розширені ділянки основної речовини, що не містили хондроцити (рис. 5).

Виразні зміни відбувалися також з боку зональної будови епіфізарного хряща (рис. 6). Виявлені зміни характеризувались зменшенням кількості та нерівномірними дегенеративно-некротичними змінами клітин епіфізарного хряща та кісткової тканини епіфіза та метафіза. Ці процеси на більшому протязі епіфізарного хряща супроводжувалися повним зупиненням ендохондріального окостеніння та повздовжнього росту. Змінювалось також формування структури кісткових перекладок епіфіза та метафіза. Шар новоутворених первинних перекладок на поверхні шару вторинних кісткових перекладок був відсутнім.

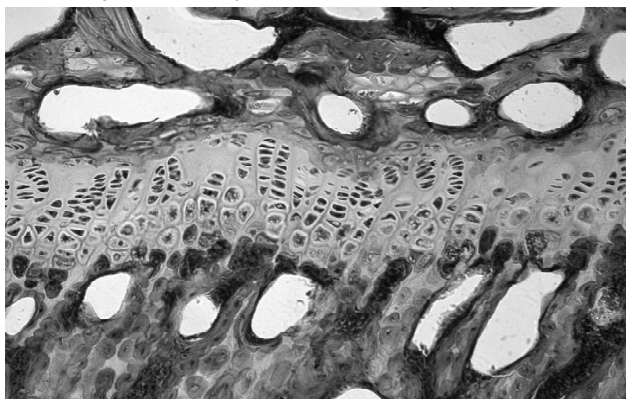
На гістологічних зрізах з боку компактної кісткової тканини та остеонних структур діафіза виявляли порушення процесів формування, що визначалося знижен-



**Рис. 5.** Структура компактного шару середньої третини діяфіза стегнової кістки щура контрольної групи. Гематоксилін-еозин. x20.



**Рис. 6.** Структура клітинних елементів та основної речовини центральної частини суглобового хряща головки стегнової кістки щура, що отримував преднізолон. Зональна будова суглобового хряща зберігається. Поширені безклітинні ділянки суглобового хряща. Гематоксилін-еозин. x20.



**Рис. 7.** Зміни зональної структури епіфізарного хряща на фоні прийому преднізолону. Поширені ділянки зникнення колонок хрящових клітин. Прояви ендохондріального кісткового утворення та шару первинних кісткових перекладок відсутні. Гематоксилін-еозин. x20.

ням щільності, виникненням ділянок з численними щілинами та порожнинами, а також втратою можливості ап-

позиційного росту і формуванням систем пластинчастої будови кісткової тканини, шарів внутрішніх та зовнішніх генеральних кісткових пластинок, характерних для діяфізарного відділу кісток. У компактній кістці, особливо на ендостальній та періостальній поверхнях діяфіза, спостерігали дистрофічні та некротичні зміни, що супроводжувалися зниженням проліферативної активності клітин ендосту та періосту. У компактній кістковій тканині, цей процес проявлявся збільшенням кількості поширених центральних судинних каналів (рис. 7).

Отже, застосування у щурів місячного віку преднізолону у вищезазначеній дозирівці протягом 30 діб, викликає дегенеративно-некротичні зміни з боку суглобового та епіфізарного хрящів, компактної (рис. 8) та глибокої кісткової тканини епіфіза і метафіза, які супроводжуються порушенням їх структури унаслідок розладів формування кісткової тканини та її пластинчатих структур, уповільненням перебудови компактної кісткової тканини та росту кістки в довжину та товщину.

Отримані результати свідчать про необхідність розробки профілактичних заходів при застосуванні преднізолону, насамперед медикаментозних, з метою попередження порушень структурно-функціональної організації суглобового та епіфізарного хрящів, формування та перебудови кісткової тканини.

Отримані дані гістологічного дослідження підтверджувались і даними остеометричного дослідження. Як показали результати остеометрії, проведені у тварин контрольної серії дослідів, довжина стегнової кістки щурів складала  $31,01 \pm 0,05$  мм, а товщина -  $3,49 \pm 0,26$  мм, в той час як у серії дослідів, де тварини отримували преднізолон, ці показники були на наступному рівні: довжина стегнової кістки складала  $28,81 \pm 0,25$  мм, а товщина була  $3,07 \pm 0,04$  мм, що було достовірно ( $p < 0,05$ ) меншою, ніж у контрольній групі тварин і свідчило про негативний вплив преднізолону.



**Рис. 8.** Порушення структури та сповільнення перебудови компактної кісткової тканини діяфіза щура на фоні прийому преднізолону. Гематоксилін-еозин. x20.

Дослідження кількості центральних судинних каналів на ділянці переднього відділу гістологічного зрізу середньої третини діяфіза стегнової кістки показали, що в контрольній серії дослідів їх кількість складала  $20,43 \pm 0,841$  мм, тоді як в серії дослідів, де тваринам вводили преднізолон, їх кількість складала  $37,43 \pm 1,100$  мм, що було достовірно ( $p < 0,05$ ) більше, ніж у контрольній серії дослідів.

### Висновки та перспективи подальших розробок

Дані морфологічного дослідження свідчать, що прийом преднізолону короткотривалим курсом викли-

кає дегенеративно-некротичні зміни в суглобовому та епіфізарному хрящах, в компактній та губчастій кістковій тканині епіфізу і метафізу. Ці зміни супроводжуються порушенням їх структури внаслідок розладів формування кісткової тканини та її пластинчастих структур, уповільненням перебудови компактною кістковою тканиною та росту кістки в довжину та товщину.

Отримані дані свідчать про необхідність розробки методів корекції цих розладів, насамперед медикаментозних, які б дозволили профілакувати порушення структурно-функціональної організації суглобового та епіфізарного хрящів, формування та перебудову кісткової тканини.

### Список літератури

- Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия / Автандилов Г.Г.- М.: Медицина, 1990.- 383с.
- Беловол А.Н. Глюкокортикоидиндуцированный остеопороз /А.Н.Беловол, И.И.Князькова //Здоров'я України.- 2012.- №5.- С.72-75.
- Боровиков В. STATISTIKA. Искусство анализа данных на компьютере: для профессионалов.- 2-е изд. / В.Боровиков.- СПб.: Питер, 2003.- 688с.
- Дыдыкина И.С. Остеопороз при ревматоидном артрите: диагностика, факторы риска, переломы, лечение / И.С.Дыдыкина, Л.И.Алексеева // Научно-практич. ревматология.- 2011.- №5.- С.13-17.
- Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / [Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захарина Е.А., Западнюк Б.В.]: под. ред. И.П.Западнюка.- К.Вища школа, 1983.- 381с.
- Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники /Меркулов Г.А.- М.: Медгиз, 1986.- 342с.
- Микроскопическая техника: под. ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова.- М.: Медицина, 2002.- 744с.
- Наумов А.В. Распространенность и течение остеопороза у пациентов с соматическими заболеваниями /А.В. Наумов //Міжн. ендокринолог. журнал.- Донецк: Мир, 2010.- №6.- С.107-115.
- Реброва О.Ю. Статистический анализ данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA: Монография / Реброва О.Ю.- М.: Медиа Сфера, 2003.- 312с.
- Руководство по экспериментальной хирургии /Шалимов С.А., Радзиховский А.П., Кейсевич Л.В.- М.: Медицина, 1989.- 270с.

### Калашников А.В., Бруско А.Т., Кузів Е.Л., Вильцанюк О.А., Апуховская Л.И. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СУСТАВНОГО И ПРОКСИМАЛЬНОГО ЭПИФИЗАРНЫХ ХРЯЩЕЙ И ДИАФИЗА БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫС ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ ВВЕДЕНИИ ПРЕДНИЗОЛОНА

**Резюме.** В эксперименте на 34 крысах линии Вистар проведено изучение морфологических изменений в костной ткани при введении преднизолона коротким курсом в течение 30 суток. В результате проведенных исследований установлено, что у животных на фоне приема преднизолона возникают дегенеративно-некротические изменения в суставном и эпифизарном хряще, в компактной и губчатой костной ткани эпифиза и метафиза. Эти изменения сопровождаются нарушением их структур, замедлением перестройки компактной костной ткани и роста кости в длину и толщину.

**Ключевые слова:** остеопороз, преднизолон, морфологические изменения в костной и хрящевой ткани при приеме преднизолона.

### Kalashnikov A.V., Brusko A.T., Kuziv E.L., Viltzanyuk O.O., Apuhovska L.I. MORPHOLOGICAL CHANGES OF JOINTS, PROXIMAL EPIPHYSEAL CARTILAGE AND DIAPHYSIS OF RATS FEMORAL BONE WITH SHORT-TERM PREDNISONONE APPLICATION

**Summary:** In the experiment on 34 Wistar rats studied the morphological changes in the bone tissue during 30 days short-term courses of prednisolone administration. As a result of studies found that animals while taking prednisolone having degenerative - necrotic changes in articular epiphyseal cartilage and, in a compact and spongy bone epiphysis and metaphysis. These changes are accompanied by violation of their structures, deceleration restructuring compact bone and stimulation bone growth in length and thickness.

**Key words:** osteoporosis, prednisolone, morphological changes in bone and cartilage during prednisone therapy.

**Рецензент:** д.мед.н., професор Гумінський Ю.Й.

Стаття надійшла до редакції 23.06.2015 р.

Калашніков Андрій Валерійович - д.мед.н., професор, завідувач науково-організаційним відділом ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України"; +38 044 486-31-97

Бруско Антон Тимофійович - д.мед.н., професор, завідувач відділу патоморфології з експериментально-біологічним відділенням ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України"; +38 044 486-31-97

Кузів Євген Любомирович - лікар ортопед-травматолог Військово-медичного клінічного центру Центрального регіону; +38 093 460-46-05

Вильцанюк Оксана Олександрівна - к.мед.н., доцент кафедри пропедевтики внутрішньої медицини ВНМУ ім.М.І.Пирогова; +38 067 727-42-91

Апуховська Лариса Іванівна - к.біол.н., ст. наук. сп. лабораторії медичної біохімії Інституту біохімії ім.О.В.Паладіна НАН України; +38 044 234-63-14