

ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ СТРУКТУР МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКУ НА РІЗНИХ ТЕРМІНАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПІОЇДНОГО ВПЛИВУ ТА ПРИ ЙОГО ВІДМІНІ

Хворі з дегенеративними захворюваннями хребта - "складні пацієнти". Часто, змучені багаторічними болями, вони мають залежність, а часом і толерантність до різних анальгетиків, що сильно знижує ефективність консервативного лікування.

За умов тотальної гіподинамії, надмірних фізичних навантажень в поєднанні із впливом зовнішнього середовища, що продовжує забруднюватись внаслідок техногенних катастроф, токсично-наркотичних чинників, господарської діяльності людини, патології хребта посідають одне з чисельних місць серед проблем сучасної медицини (1-8)

Мета роботи полягала у вивченні особливостей патоморфологічних змін структурних компонентів міжхребцевого диска на різних термінах опіоїдного впливу та при його відміні на ультраструктурному рівні в експерименті.

Матеріал та методи дослідження. Матеріалом дослідження слугували білі статеві зрілі, нелінійні щури – самці в кількості 90 тварин, масою 92 - 103 г, віком 4,5 місяців. Тваринам здійснювали ін'єкції препарату Налбуфін дом'язево, щоденно 1 раз на добу в одному проміжку часу (10-11 година ранку) впродовж 42 діб. Початкова доза Налбуфіну становила 8 мг/кг впродовж першого тижня, 15 мг/кг впродовж другого тижня; 20 мг/кг впродовж третього тижня; 25 мг/кг впродовж четвертого тижня; 30 мг/кг впродовж п'ятого тижня та 35 мг/кг впродовж шостого тижня експериментального опіоїдного впливу. Таким чином створювали умови хронічного опіоїдного впливу[9]. В подальшому впродовж двох тижнів тварини знаходилися без впливу опіоїду.

Тварини були поділені на 6 груп. Перша група контрольна, яка впродовж 42 діб отримувала ін'єкції фізіологічного розчину дом'язево в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку); друга група тварин отримувала Налбуфін впродовж 21 доби в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку) з наступним забором матеріалу дослідження (кінець третього тижня експериментального опіоїдного впливу); третя група тварин отримувала Налбуфін впродовж 28 діб в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку) з наступним забором матеріалу дослідження (кінець четвертого тижня експериментального опіоїдного впливу); четверта група тварин отримувала Налбуфін впродовж 35 діб в одному проміжку часу (10 - 11 годин ранку) з наступним забором матеріалу дослідження (кінець п'ятого тижня експериментального опіоїдного впливу); п'ята група тварин отримувала Налбуфін впродовж 42 діб в одному проміжку часу (10 - 11

годин ранку) з наступним забором матеріалу дослідження (кінець шостого тижня експериментального опіїдного впливу); шоста група тварин, яка впродовж двох тижнів знаходилась без впливу опіїдного препарату з кінця 42 доби.

Усі тварини знаходились в умовах віварію, експеримент проведено згідно з принципами біоетики у відповідності до положення Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001), що підтверджено висновком членів комісії з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол № 10 від 15 грудня 2019 р.). Перед проведенням забору матеріалу тварин виводили з експерименту за допомогою дибутилового ефіру. Як матеріал для ультраструктурного дослідження використали міжхребцеві диски шурів. Ультраструктурні препарати готували за загальноприйнятою методикою [10- 12].

Результати дослідження. У результаті проведеного забору експериментального матеріалу через **21 добу** у шурів, що знаходилися під впливом опіїдного анальгетика в дозі 20 мг/кг на субмікроскопічному рівні виявлено виникнення альтеративних змін клітинних елементів драглистого ядра, що характеризувались розвитком явищ некрозу нотохондральних клітин, а також виникненням хондроптозу хондроцитів. Збережені нотохондральні клітини візуалізувались рідко. Місцями траплялись нотохондральні клітини в яких ядро розпадалось на окремі фрагменти, що були заповнені гетерохроматином, а в просвітленій цитоплазмі локалізувались залишки мембран органел. Виражені деструктивні зміни виявили в хондроцитах. Зокрема, у цитоплазмі більшості хондроцитів з'являлись об'ємні та чисельні вакуолі, заповнені гетерогенним, переважно просвітленим, осміофільним вмістом.

В окремих хондроцитах з інтенсивноосміофільною цитоплазмою більшість цитоплазматичних відростків зазнавали деструкції.

В окремих хондроцитах з інтенсивно осміофільною цитоплазмою більшість цитоплазматичних відростків зазнавали деструкції.

Лише місцями візуалізувались тонкі, неоднорідно розташовані цитоплазматичні ніжки з гетерогенним, переважно інтенсивно осміофільним вмістом. В цитоплазмі краще збережених хондроцитів була більша кількість вільних рибосом, спостерігалась гіпертрофія комплексу Гольджі та розширених фрагментів каналців гранулярної ендоплазматичної сітки з неоднорідно фіксованими рибосомами. У хондроцитах з помірно осміофільною цитоплазмою виявили накопичення вакуолей та вкорочення цитоплазматичних ніжок.

У колагенових волокнах фіброзного кільця відзначали наростання деструктивних змін. У зовнішньому шарі волокнистого кільця реєстрували руйнування та розшарування фібрил колагенових волокон.

В окремих ділянках матриксу волокнистого кільця знаходили нагромадження просвітлених осміофільних мас.

У результаті проведеного аналізу експериментального матеріалу через **28 діб** у шурів, що знаходилися під впливом опіюючого анальгетика в дозі 25 мг/кг на ультраструктурному рівні виявлено, що у пульпозному ядрі виникли обширні безклітинні зони, заповнені значною кількістю зернистої інтенсивно осміофільної маси. Зазначені зерна були різних розмірів, розташовувались нерівномірно, подекуди формуючи поодинокі скупчення. Також зауважили потовщення окремих фібрил колагенових волокон пульпозного ядра.

Нотохондральні клітини та більшість хондроцитів зазнавали некротичних змін. У таких хондроцитах цитоплазматичні відростки були зруйновані. Цитоплазма у більшості хондроцитів була інтенсивно осміофільна, неоднорідно набрякла, у ній подекуди зустрічались вакуолі з просвітленим вмістом. Ядра в деяких клітинах з вираженими деструктивними змінами, не мало контурів, органели зазнавали дезінтеграції. Цитоплазматична мембрана була неоднорідною та зазнавала локальної фрагментації.

У цитоплазмі фібробластів з'являлись вакуолі. Відзначали неоднорідне потовщення фібрил колагенових волокон. У потовщених колагенових волокнах та у матриксі драглистого ядра іноді нагромаджувались інтенсивно осміофільні маси. На окремих ділянках фіброзного кільця колагенові волокна лежали хаотично, частина з них зазнавала деструкції. В інших ділянках відзначали неоднорідне потовщення та фрагментацію колагенових волокон. Між ними з'являлись чисельні проміжки, які були заповнені просвітленими масами.

У результаті аналізу експериментального матеріалу через **35 діб** у шурів, що знаходилися під впливом опіюючого анальгетика в дозі 30 мг/кг на ультраструктурному рівні виявлено суттєві ультраструктурні зміни в різних компонентах драглистого ядра та волокнистого кільця. У драглистому ядрі знаходились обширні безклітинні зони, з дещо ущільненим матриксом у якому накопичувалась інтенсивноосміофільна дрібнозерниста глибока маса. У периферичних зонах драглистого ядра з'являлись невеликі ділянки з матриксом низької електронної щільності.

Переважає більшість хондроцитів зазнавала глибоких деструктивних змін. Такі клітини мали інтенсивноосміофільну цитоплазму, у якій привертала увагу розширені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі, а також вакуолі з електронноосвітлим вмістом.

Подібні дегенеративні зміни розвивались в фібробластах. Зокрема, в їх ядрах збільшувався вміст гетерохроматину, в цитоплазмі з'являлись різних розмірів вакуолі округлої форми зі світлим слабоосміофільним вмістом. Матрикс волокнистого кільця навколо фібробластів часто був просвітленим, фібрили колагенових волокон розташовувались некомпактно.

Досить часто спостерігали неоднорідне потовщення фібрил колагенових волокон. У таких фібрилах поперечна посмугованість була нечіткою і стертою. Між фібрилами колагенових волокон подекуди з'являлися неоднорідно розширені проміжки протеогліканового матриксу, який був заповнений дрібнозернистою масою середньої електронної щільності.

У результаті вивчення експериментального матеріалу через **42 доби** у шурів, що знаходилися під впливом опіюючого анальгетика в дозі 35 мг/кг, виявлено значні ультраструктурні зміни як у драглистому ядрі, так і у структурних елементах волокнистого кільця. Нотохондральні клітини зустрічалися рідко, деякі перебували у стані некрозу. Більшість хондроцитів також зазнавали альтеративних змін. Проте поряд з некротизованими хондроцитами зустрічались клітини з більш збереженою структурою у яких виявляли розвиток деструкції лише цитоплазматичних органел. У таких хондроцитах спостерігали вкорочення та фрагментація цитоплазматичних відростків. У хондроцитів, що перебували на початкових етапах дегенерації посилювалась осміофільність цитоплазми, у ній виявляли значну кількість каналців гранулярної ендоплазматичної сітки з рибосомами на їх поверхні, розширені цистерни комплексу Гольджі, що є характерним для початкових етапів розвитку хондроптозу. Також спостерігали розширення каналців гранулярної ендоплазматичної сітки хондроцитів, що були заповнені помірно осміофільною дрібнозернистою масою.

У волокнистому кільці зустрічались активні фібробласти з добре розвиненою гранулярною ендоплазматичною сіткою на каналцях якої фіксувались чисельні рибосоми. Також у цитоплазмі візуалізувались вільні рибосоми та полісоми. Мітохондрії у цитоплазмі розташовувались хаотично, кристи окремих мітохондрій зазнавали дискомплексації, а матрикс просвітлювався. Фібрили колагенових волокон часто розташовувались безладно. Відзначали розшарування та неоднорідне потовщення фібрил колагенових волокон. У зовнішніх відділах волокнистого кільця траплялись ділянки із зруйнованими колагеновими фібрилами.

Через **56 діб** у шурів, що знаходилися впродовж **двотижневої відміни** опіюю на ультраструктурному рівні виражені альтеративні зміни реєстрували у нотохондральних клітинах та у переважній більшості хондроцитів. Матрикс драглистого ядра ущільнювався, у ньому виявляли потовщені колагенові фібрили. Більшість клітинних елементів драглистого ядра перебували на різних стадіях некрозу, а деякі хондроцити – хондроптозу.

Через **56 діб** у шурів, що знаходилися впродовж **двотижневої відміни** опіюю на ультраструктурному рівні виражені альтеративні зміни реєстрували у нотохондральних клітинах та у переважній більшості хондроцитів. Матрикс драглистого ядра ущільнювався, у ньому виявляли потовщені колагенові фібрили. Більшість клітинних елементів драглистого ядра перебували на різних стадіях некрозу, а деякі хондроцити – хондроптозу.

Колагенові фібрили волокнистого кільця на багатьох ділянках значно потовщувались. У проміжках між колагеновими волокнами виявляли просвітлені електроннонещільні маси. У фіброблестах, що розташовувались у волокнистому кільці виявляли розвиток дегенеративних процесів. Зокрема, значна частина мітохондрій фібробластів збільшувалась в об'ємі, набухала, їх матрикс просвітлювався, кристи вкорочувались або зазнавали руйнування. Також у цитоплазмі з'являлись вакуолі, що були заповнені просвітленим вмістом. Ядро ущільнювалось, спостерігали конденсацію хроматину. Відзначали фрагментацію ядра фібробластів. У таких клітинах ядро розпадалось на окремі грудки.

Позаклітинний матрикс волокнистого кільця просвітлювався, у ньому нагромаджувались вакуолі, що були заповнені гомогенним вмістом середньої електронної щільності. У таких ділянках фібрили колагенових волокон розташовувались нещільно, розшаровувались, розпадались та зазнавали лізису.

Висновки:

1. Наприкінці **21 доби** нами виявлено появу альтеративних змін клітинних елементів драглистого ядра, що характеризувались розвитком некротичних змін нотохондральних клітин, а також хондроптозу хондроцитів. Збережені нотохондральні клітини зустрічались рідко. Інколи траплялись нотохондральні клітини, в яких ядро розпадалось на окремі фрагменти, що були заповнені гетерохроматином, а в просвітленій цитоплазмі перебували залишки мембран органел.

2. Через **28 діб** зміни прогресували у вигляді появи у пульпозному ядрі обширних безклітинних зон, заповнених значною кількістю зернистої, інтенсивно осміюфільної маси. Вказані зерна були різного розміру, розташовувались нерівномірно, іноді формували невеликі скупчення. Також було знайдено потовщення окремих фібрил колагенових волокон пульпозного ядра. Нотохондральні клітини та більшість хондроцитів зазнавали некротичних змін.

3. Через **35 діб** на ультраструктурному рівні виявлено достатньо глибокі зміни в структурних елементах драглистого ядра та волокнистого кільця. У драглистому ядрі локалізувались обширні безклітинні зони, з ущільненим матриксом, у якому нагромаджувалась інтенсивноосміюфільна дрібнозерниста маса. У периферичних зонах драглистого ядра з'являлись невеликі ділянки з матриксом низької електронної щільності. Переважна більшість хондроцитів зазнавала суттєвих деструктивних змін. Такі дегенеративні зміни розвивались в фіброблестах. Зокрема, в їх ядрах зростав вміст гетерохроматину, в цитоплазмі з'являлись вакуолі округлої форми заповнені світлим слабоосміюфільним матеріалом. Матрикс волокнистого кільця навколо фібробластів досить часто був просвітленим, фібрили колагенових волокон розташовувались нещільно.

4. Наприкінці **42 доби** нотохондральні клітини візуалізувались рідко, перебували у стані некрозу. Більшість хондроцитів також зазнавали альтеративних змін. Проте поряд з некротизованими хондроцитами

зустрічались клітини з більш збереженою структурою у яких виявляли розвиток дегенерації цитоплазматичних органел.

5. На **ультраструктурному** рівні при відміні опіоїдного впливу наприкінці 56 доби нами було виявлені значні альтеративні зміни у нотохондральних клітинах та у переважній більшості хондроцитів. Матрикс драглистого ядра ущільнювався, на тлі якого виявляли потовщені колагенові фібрили. Більшість клітинних елементів драглистого ядра перебували на різних стадіях некрозу, а деякі хондроцити – хондроптозу. Також у цитоплазмі з'являлись вакуолі, що були заповнені просвітленим вмістом. Ядро ущільнювалось, спостерігали конденсацію хроматину. У деяких ділянках хондроматриксу фібрили колагенових волокон розташовувались нещільно, розширювались з лізисом окремих їхніх ділянок.

Література/References

1. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006 Feb;20(1):3-25. DOI: 10.1016/j.berh.2005.09.007
2. Petrovsky VV, Pykalyuk VS. [Ways of lymph outflow from the lumbosacral plexus]. *Ukrainian Medical Almanac*. 2012; 15(6): 206-211. Ukrainian.
3. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for international Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, et al *Ann Rheum Dis*. 2003 Dec;62(12):1145-1155.
4. Povoroznyuk VV. [Osteoporosis is a problem of the XXI century]. *The art of healing*. 2005; 10: 16-20. Ukrainian.
5. Kevin Phan, Alan Lackey, Nicholas Chang, et.al. Anterior lumbar interbody fusion (ALIF) as an option for recurrent disc herniations: a systematic review and meta-analysis. *J. Spine Surg*. 2017; 3(4): 587-595. doi: 10.21037/jss.2017.11.04
6. Kosterin SB, Dedukh NV, Maltseva VE. [Morphology of the intervertebral disc and bone tissue of the apophyses of the vertebral bodies in the simulation of osteoporosis]. *Bulletin of problems of biology and medicine*. 2018; 1((1)142):285-291. DOI 10.29254/2077-4214-2018-1-1-142-285-291 Ukrainian.
7. Systematic review of cortical bone trajectory versus pedicle screw techniques for lumbosacral spine fusion. Kevin Phan, Vignesh Ramachandran, Tommy M. Tran et al. *J. Spine Surg*. 2017. 3(4). 679-688. doi: 10.21037/jss.2017.11.03.
8. Findlay DM, Atkins GJ. Osteoblast-Chondrocyte Interactions in Osteoarthritis *Curr. Osteoporos Rep*. 2014 Mar;12(1):127-34. DOI: 10.1007/s11914-014-0192-5
9. Onysko R, Paltov Ye, Fik. B, Vilkhova I, Kryvko Yu, Yakymiv N, Fitkalo O. [Declarative patent of Ukraine for invention]. 76564; 2013. Ukrainian.
10. Glauert AM. Fixation, dehydration and embedding of

biologicalspecimens.-In: Practical methods in electron microscpi. American Elsevier. 1975: 207 p.

11. Stempac JG, Ward RT. An improved staining method for electron microscopy. J. Cell Biology. 1964; 22: 697-701.

12. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in tlectron microscopy. J. Cell Biology. 1963; 17: 208-212.

Привроцька І.Б.

**Тернопільський національний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського, м.Тернопіль**

ЗМІНИ АМІНОКИСЛОТНОГО ВМІСТУ СИРОВАТКИ КРОВІ ТА ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ У ЩУРІВ

В останні роки отримані нові дані щодо механізмів розвитку гострого панкреатиту, що свідчать про взаємодію оксиду азоту та супероксидних радикалів. Згідно даних літератури, у дослідженнях, проведених на моделі гострого панкреатиту (ГП) індукованого L-аргініном, було показано значне підвищення рівня маркерів ендogenous NO - нітрат / нітритів та активності iNOS. На основі аналізу даних літератури стає очевидним, що у патогенезі ГП значну роль відіграють не тільки активні форми кисню, а також нітрогену, що утворюються при активації NOS та ізоформ оксидази NADPH, або є побічними продуктами мітохондріального електронно-транспортного ланцюга.

З досліджень останніх років відомо, що метаболізм аргініну здійснюється переважно двома шляхами: через орнітиновий цикл з утворенням сечовини за участі аргіназ, або з утворенням оксиду азоту та цитруліну за участі NO-синтаз. Тому доцільним було вивчити амінокислотний вміст у крові та печінці щурів з експериментальним гострим панкреатитом (ГП), індукованим L-аргініном, оскільки оцінка вмісту амінокислот може слугувати інтегральним показником функціонального стану регуляторних систем всього організму.

На основі проведених експериментів виявлено, що сумарний вміст амінокислот сироватки крові у тварин підвищується вже через 1 добу розвитку патології на 25 %, однак вже через три доби спостерігається достовірне зниження сумарного вмісту незамінних та напівнезамінних амінокислот на 12 % та 30 %, відповідно, в той час, як сумарний амінокислотний вміст печінки підвищується через три доби його розвитку на 55 %.

При аналізі вмісту замінних амінокислот за умов розвитку ГП виявлені достовірні зміни практично всіх амінокислот у сироватці крові. Серед напівнезамінних амінокислот через три доби розвитку ГП виявлено зниження вмісту аргініну у сироватці крові на 46 % у порівнянні із контролем, що може