

УДК 616.71–007.234–092.9 : 615.916'175

Б. В. Сорокін, І. І. Старченко, В. О. Костенко  
Полтава, Україна

## ВПЛИВ L-СЕЛЕНОМЕТІОНІНУ НА ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ КІСТОК ПРИ ВІДТВОРЕННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ

*В експерименті на білих щурах досліджено вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на патоморфологічні зміни кісткової тканини різних відділів скелету (великогомілкова кістка, хребці) при відтворенні експериментального глюкокортикоїдного остеопорозу за умов надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію). Показано, що призначення за цих умов L-селенометіоніну попереджує порушення гістологічної структури великогомілкової кістки та хребців (потоншення кісткових трабекул, збільшення відстані між окремими трабекулами, спонгіозування кортикальної кістки, мікропереломи трабекул), підвищує середню щільність клітинних елементів та відносну кількість остеобластів у кістковій тканині.*

**Ключові слова:** експериментальний остеопороз, хронічна інтоксикація нітратом натрію, оксид азоту, пероксинітрит, L-селенометіонін, кісткова тканина.

**Постановка проблеми.** Остеопороз (ОП), за визначенням експертів ВООЗ, – системне захворювання, що характеризується метаболічними змінами в структурі кісткової тканини, які призводять до зниження маси кістки та її міцності, що істотно підвищує ризик переломів при мінімальній травмі або без неї [7]. ОП в Україні, як і в усьому світі, є однією з найважливіших проблем охорони здоров'я, оскільки частота його в останні десятиліття постійно збільшується.

Значною медичною проблемою є вторинний остеопороз, що виникає при різних захворюваннях (ревматоїдному артриті, цукровому діабеті 2-го типу, целіакії, хронічних запальних захворюваннях кишечника), трансплантації органів, тривалому введенні низки лікарських засобів, зокрема, глюкокортикоїдів [5]. Повідомляється про негативний вплив чинників навколишнього середовища на розвиток остеопорозу [3].

Треба визнати, що значних успіхів у вирішенні проблеми остеопорозу не досягнуто. Однією з основних причин незадовільного положення у терапії хворих

на остеопороз є недостатнє вивчення патогенезу цього захворювання, внаслідок чого неможливо оптимально впливати на основні ланки розвитку патологічних процесів, які призводять до розрідження кісток і зниження кісткової маси [12].

**Аналіз останніх досліджень та публікацій.** Залишається недостатньо з'ясованою роль деяких біорегуляторів у механізмах розвитку остеопенії. В літературі наводиться суперечлива інформація щодо ефектів оксиду азоту (NO) на метаболізм, функціонування та структуру кісток [9,13]. Виявлена роль NO як медіатора дії цитокінів на активність кісткових клітин, причому стимулююча або пригнічуюча дія на кісткову тканину залежить від концентрації метаболітів NO.

Раніше нами показано, що за умов моделювання експериментального глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію, яка супроводжується утворенням великої кількості продукту метаболізму нітрат- і нітрит-іонів – оксиду азоту (NO), значно посилюються у кістковій тканині процеси колагенолізу та деполімерізації

протеогліканів. Ці зміни у значній мірі пов'язані з функціональним станом NO-синтази, зокрема, її індукційної ізоформи [8].

У той же час у літературі наводиться суперечлива інформація щодо ефектів NO на метаболізм, функціонування та структуру кісток [9,13]. Повідомляється, що високий рівень NO пригнічує обмін речовин у кістковій тканині та формування кісток. Існує точка зору, що ефекти NO опосередковуються через утворення у реакції з супероксидним аніон-радикалом високоактивної вільно радикальної сполуки – пероксинітриту [11]. Проте механізми дії цієї сполуки та його скевенджерів на кісткову тканину з'ясовані недостатньо.

**Постановка завдання.** З'ясувати вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на патоморфологічні зміни кісткової тканини різних відділів скелету (великогомілкова кістка, хребці) білих щурів при відтворенні експериментального ОП за умов надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію).

**Матеріали і методика досліджень.** Дослідження були проведені на 15 білих щурах лінії Вістар масою 180-230 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварин; у другій – відтворювали експериментальний глюкокортикоїдний ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію (200 мг/кг); у третій – тваринам на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію тваринам та моделювання ОП вводили скевенджер пероксинітриту – L-селенометіонін.

Для моделювання ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію щурам через добу (протягом 45 діб) внутрішньом'язово вводили 2,5% розчин гідрокортизону ацетату в дозі та 50 мг/кг маси тіла [2], починаючи з 16 доби інтоксикації.

L-селенометіонін виробництва "Sigma-Aldrich, Inc." (США) вводили у дозі 3 мг/кг [10] внутрішньоочеревинно 2 рази на тиждень протягом часу відтворення глюкокортикоїдного ОП.

Після закінчення терміну експерименту тварин декапітували під

ефірним наркозом. Виділяли і скелетували великогомілкові кістки (ВГК) та 3-ті поперекові хребці. Перед виготовленням мікропрепаратів проводили фіксацію фрагментів кісток у 10% розчині нейтрального формаліну протягом 48 годин. Декальцінацію проводили у 4% розчині трилону Б (етилендіамінтетраацетату) [6]. Після цього матеріал проводили через батарею спиртів зростаючої концентрації, через хлороформ та заливали у парафін. З парафінових блоків виготовляли зрізи 4-6 мкм завтовшки, які забарвлювали гематоксиліном та еозином за загальноприйнятою методикою.

Морфометричне дослідження було проведено у відповідності з принципами системного кількісного аналізу. Визначали такі морфометричні показники: густину клітинних елементів за методом стандартних площ ( $S=0,1 \text{ мм}^2$ ); відносну кількість остеобластів серед усіх клітинних елементів тканини [1].

Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

**Результати досліджень та їх обговорення.** У щурів у другій серії дослідів визначаються виражені зміни гістоструктури великогомілкової кістки, а саме: потоншення кісткових трабекул, збільшення відстані між окремими трабекулами у порівнянні з контрольною групою, спонгізування кортикальної кістки, а також спостерігаються явища мікропереломів трабекул.

Остеоцити, розташовані у кісткових порожнинах, мають різну форму (частіше подовжену, овальну або кутасту). Ядра цих клітин базofilні, хроматин щільний і на цьому тлі ядерця не визначаються. Цитоплазма остеоцитів також має базofilний відтінок.

Періодично зустрічаються остеоцити з вираженими дистрофічними та некротичними змінами, що проявляється зміною тинкторіальних властивостей цитоплазми, та ознаками каріопікнозу, каріолізису або каріорексису в ядрах.

Окремі ділянки кісткових перекладок позбавлені остеоцитів, в переважній більшості кісткові клітини розподіляються

хаотично в кісткових порожнинах, частина остеоцитів розташовується поверхнево в кісткових трабекулах. Періодично зустрічаються ділянки кісткової тканини з базофільно вираженим остеомукоїдом, при цьому базофілія міжклітинної речовини розподіляється нерівномірно по ходу кісткових пластинок. Слід зазначити, що серед звапненої міжклітинної речовини зустрічаються невеликі ділянки кісткової тканини з ознаками деструкції, при цьому в центральній частині таких ділянок міжклітинна речовина слабо сприймає барвники, внаслідок чого такі ділянки мають вигляд світлих острівців. Клітинні елементи, розташовані в таких зонах, мають округлу або овальну форму, відносно великі розміри. Ядра таких клітин ущільнені, містять щільний хроматин, цитоплазма слабо сприймає барвники, але виявляється досить чітко. Навколо дістрофічно змінених остеоцитів розташовані остеоцити з базофільною цитоплазмою. Ядра таких клітин також мають підвищену базофілію.

У розширених міжбалкових просторах періодичновизначаються малоспеціалізовані

клітини фібробластичного ряду, що мають округлі або овальні ядра, базофільну цитоплазму. В описаних ділянках також спостерігається збільшення кількості судин кровоносного мікроциркуляторного русла, у яких спостерігаються явища повнокрів'я, маргінації формених елементів крові, періодично зустрічаються дрібні тромби.

Наведені вище морфологічні дані дозволяють припустити, що в осередку деструкції відбуваються два протилежні процеси: у відповідь на руйнування кісткової тканини одночасно йде процес її регенерації.

За даними морфометричного дослідження зразків діяфізу великогомілкових кісток (табл. 1), відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується зменшенням середньої щільності розташування клітинних елементів та відносної кількості остеобластів – відповідно на 25.1% ( $p < 0.001$ ) та 29.2% ( $p < 0.001$ ) у порівнянні з даними першої серії.

Таблиця 1

**Вплив скевенджеру пероксинітриту L-селенометіоніну на морфометричні показники тканини великогомілкових кісток при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію (M±m, n=15)**

Характер досліджень	Показники	
	Щільність клітинних елементів	Відносна кількість остеобластів
Інтактна група	35.0±0.8	72.6±2.0
Введення нітрату натрію (60 діб) + відтворення ОП	36.2±1.0 *	51.4±1.5 *
+ L-селенометіонін	32.2±0.3 */**	60.6±1.0 */**

Примітки (у табл. 1-2): \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з даними першої серії (інтактні тварини); \*\* –  $p < 0,05$  у порівнянні з даними другої серії.

При дослідженні тіл 3-х поперекових хребців тварин другої дослідної групи також визначаються певні деструктивні процеси. Останні виявляються потоншенням компактною кісткової речовини, розташованої в периферійних відділах тіл хребців, зменшенням кількості остеоцитів, розширенням міжбалкових просторів губчастої кісткової речовини, які

в окремих спостереженнях були заповнені волокнистою сполучною тканиною. Самі кісткові пластинки губчастої кісткової речовини були переважно стоншені у порівнянні з контрольною групою, мали явища перфорації та частково переривались.

За даними морфометричного дослідження 3-х поперекових хребців (табл. 2), при моделюванні ОП на тлі хронічної

інтоксикації нітратом натрію середня щільність клітинних елементів і відносна кількість остеобластів зменшуються –

відповідно на 39.4% ( $p < 0.001$ ) та 37.6% ( $p < 0.001$ ) у порівнянні з даними першої серії.

Таблиця 2

**Вплив скевенджера пероксинітриту L-селенометіоніну на морфометричні показники тканини третього поперекового хребця при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію (M+m, n=15)**

Характер досліджень	Показники	
	Щільність клітинних елементів	Відносна кількість остеобластів
Інтактна група	20.8±0.8	65.4±1.1
Введення нітрату натрію (60 діб) + відтворення ОП	12.6±0.7 *	40.8±1.4 *
+ L-селенометіонін	17.4±0.6 **/**	50.2±1.0 **/**

Наведені вище зміни структурної організації кісткової тканини, порушують її механічні властивості і створюють передумови для деформації та переломів кісток.

У щурів, яким за умов експерименту вводили L-селенометіонін, у тканині великогомілкових кісток щільність розташування судинних каналів практично не відрізняється від відповідного показника інтактних тварин. Розподіл остеоцитів на поверхні кістки відносно більш рівномірний у порівнянні з тваринами другої дослідної групи. Також у меншій мірі спостерігаються деструктивні зміни гістологічної структури кістки (потоншення кісткових трабекул, спонгіозування кортикальної кістки). Число мікропереломів трабекул в середньому на 15% поступається даним другої серії.

За даними морфометричного дослідження зразків великогомілкових кісток (див. табл. 1) призначення L-селенометіоніну призводить до збільшення у тканині діафізу середньої щільності розташування клітинних елементів та відносної кількості остеобластів, які відповідно на 22.9% ( $p < 0.001$ ) та 17.9% ( $p < 0.001$ ) перевищують результати другої серії.

Призначення L-селенометіоніну також підвищує середню щільність клітинних елементів та відносну кількість остеобластів у кістковій тканині 3-х поперекових хребців (див. табл. 2), які відповідно на 38.1%

( $p < 0.001$ ) та 23.0% ( $p < 0.001$ ) перевищують дані другої серії.

Таким чином, отримані результати підтверджують точку зору, що утворення пероксинітриту істотно змінює спрямованість фізіологічних ефектів NO за умов відтворення хронічної нітратної інтоксикації, призводить до негативних наслідків [4].

**Висновки і перспективи подальших досліджень.** Призначення скевенджера пероксинітриту L-селенометіоніну попереджує порушення гістологічної структури великогомілкової кістки та хребців (потоншення кісткових трабекул, збільшення відстані між окремими трабекулами, спонгіозування кортикальної кістки, мікропереломи трабекул), підвищує середню щільність клітинних елементів та відносну кількість остеобластів у кістковій тканині при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію.

Отримані результати вказують на небезпечність застосування препаратів-донаторів NO для лікування остеопорозу у осіб, які мешкають у забруднених азотовмісними сполуками регіонах, через можливість утворення високотоксичного пероксинітриту та залежних від нього порушень у кістковій тканині, що потребує додаткового дослідження. L-селенометіонін також доцільно вивчати як ефективний засіб

корекції кісткової тканини за умов її пероксинітрит-залежного ушкодження.

### Література

1. Автандилов Г. Г. Основы количественной патологической анатомии / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.

2. Батура І. О. Морфологічні характеристики остеонних конструкцій в умовах високих концентрацій глюкокортикоїдів в організмі експериментальних тварин / І. О. Батура // Укр. морфол. альм. – 2005. – № 1. – С. 107.

3. Инволюционный остеоартроз и остеопороз / [Казимирко В. К., Коваленко В. Н., Флегонтова В. В.] – Донецк : Издатель Заславский А.Ю., 2011. – 724 с.

4. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В. О. Костенко, Н. В. Соловійова, О.В. [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, №3. – С. 150-154.

5. Остеопороз / под ред. О. М. Лесняк, Л. И. Беневоленской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с. – (Серия «Клинические рекомендации»).

6. Пикалюк В.С. Методичні аспекти дослідження скелету людини і тварин / В.С. Пикалюк.–Сімферополь, 2007.– 272 с.

7. Сагаловски С. Остеопороз и его клеточно-молекулярные механизмы

развития: поиск молекул-мишеней для новых средств лечения заболевания / С. Сагаловски, М. Шёнерт // Мед. перспективи. – 2012. – Т. 17, №1. – С.1-13.

8.Сорокін Б. В. Зміни компонентів органічного матриксу кісткової тканини щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б. В. Сорокін, В. О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. - 2013. – Т. 13, №2. – С. 220-224.

9.van't Hof R. J. Nitric oxide and bone / R. Jvan't Hof., S.H. Ralston // Immunology. – 2001. – V.103, №3. – P. 255-261.

10. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – V.284, №6. – P. H2053-H2060.

11. Mancini L. Nitric oxide superoxide and peroxynitrite modulate osteoclast activity / L. Mancini, N. Moradi-Bidhendi, M.L. Brandi, I. MacIntyre // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – V.243, №3. – P. 785-790.

12.Raisz L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects / L. G. Raisz // J. Clin. Invest. – 2005. –V.115, №12. – P. 3318-3325.

13.Wimalawansa S. J. Nitric oxide and bone / S.J. Wimalawansa // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2010. – V. 1192. – P. 391-403.

**Сорокин Б. В., Старченко И. И., Костенко В. А.**

### ВЛИЯНИЕ L-СЕЛЕНОМЕТИОНИНА НА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОСТЕЙ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА НА ФОНЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НИТРАТА НАТРИЯ

*В эксперименте на белых крысах исследовано влияние скэвенджера пероксинитрита L-селенометионина на патоморфологические изменения костной ткани различных отделов скелета (большеберцовая кость, позвонки) при воспроизведении экспериментального глюкокортикоидного остеопороза на фоне избыточного образования оксида азота из экзогенного предшественника (модель хронической интоксикации нитратом натрия). Показано, что назначение в этих условиях L-селенометионина предупреждает нарушение гистологической структуры большеберцовой кости и позвонков (истончение костных трабекул, увеличение расстояния между отдельными трабекулами, спонгиозирование кортикальной кости, микропереломы трабекул), повышает среднюю плотность клеточных элементов и относительное количество остеобластов в костной ткани.*

**Ключевые слова:** экспериментальный остеопороз, хроническая интоксикация нитратом натрия, оксид азота, пероксинитрит, L-селенометионин, костная ткань.

**Sorokin B. V., Starchenko I. I., Kostenko V. A.**

EFFECTS PRODUCED BY L-SELENOMETHIONINE ON PATHOLOGICAL CHANGES IN BONES UNDER MODELED OSTEOPOROSIS AND CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

*The experiment carried out on white rats was aimed to study the effect of L-selenomethionine peroxynitrite scavenger on the pathomorphological changes in bone tissue of different skeletal areas (tibia, vertebrae) in modeled glucocorticoid osteoporosis and excess production of sodium nitrate induced exogenously (model of chronic sodium nitrate intoxication). It has been found out the introduction of L-selenomethionine prevents the disturbances in histological structure of the tibia and vertebrae (thinning of bone trabeculae, enlarging the distance between individual trabeculae, cortical bone spongiosation, trabecular microfractures), increases the average density of cellular elements and the relative number of osteoblasts in bone tissue.*

**Key words:** modeled osteoporosis, chronic sodium nitrate intoxication, nitric oxide, L-selenomethionine, bone tissue.

УДК378.147.227

**І. О. Стахорська, Н. В. Вичалковська**  
Миколаїв, Україна

ОРГАНІЗАЦІЯ САМОСТІЙНОЇ РОБОТИ СТУДЕНТІВ ПРИ  
ВИВЧЕННІ КУРСУ «ОХОРОНА ПРИРОДИ» ЗА КРЕДИТНО-  
ТРАНСФЕРНОЮ СИСТЕМОЮ

*Стаття присвячена дослідженню організації самостійної роботи студентів при вивченні курсу «Охорона природи» за кредитно-трансферною системою. В результаті дослідження проведено аналіз сутності поняття «самостійна робота» та визначено її роль в навчально-виховному процесі. За умови впровадження у вищому навчальному закладі розробленої методики організації самостійної роботи студентів підвищився рівень якості знань студентів.*

**Ключові слова:** навчально-виховний процес, самостійна робота студентів, інформаційна спрямованість, мобільність, компетентний фахівець.

**Постановка проблеми.** Поступова інтеграція вітчизняної системи освіти до європейської потребує нових підходів у підготовці кваліфікованих фахівців, що базуватиметься на збільшенні організаційного, дидактичного та методичного ресурсу самостійної роботи. Процес реформування та розвитку системи вищої професійної освіти на сучасному етапі характеризується посиленням акцентів на підвищенні ролі самостійної роботи суб'єктів навчального процесу, що підтверджується основоположними засадами та вимогами Болонського процесу [5, с. 4-6].

Аналіз основних проявів цієї проблеми дозволяє дійти обґрунтованого висновку, що цілі, зміст і характер вищої