

УДК 619:616-07:615.828:636.98

Степаненко Г.О., аспірант, лікар клініки ветеринарної медицини «Пес+Кіт»
(doctor_aska@mail.ru) ©

Харківська державна зооветеринарна академія

ВИКОРИСТАННЯ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ У ДІАГНОСТИЦІ ТА ЛІКУВАННІ МЕТАБОЛІЧНИХ ОСТЕОПАТІЙ У РЕПТИЛІЙ

Проведено аналіз лікування метаболічних остеопатій в експерименті у рептилій за схемою, що включала загальноприйнятую кальційвмісну терапію та препарат міакальцик – антагоніст паратиреоїдного гормону, що містить тиреокальцитонін. За допомогою клінічних, клініко-біохімічних (визначення сироваткових глікозаміногліканів) та денситометричних методів досліджень обґрунтована доцільність використання подібних препаратів для лікування остеопатій у рептилій.

Ключові слова: рептилії, остеопатії, глікозаміноглікани, діагностика, лікування.

Вступ. Термін "метаболічні хвороби кісток" зазвичай використовують для позначення генералізованого ураження скелета, частіше на тлі порушень гомеостазу кальцію. Порушення кісткового метаболізму часто проявляються больовим синдромом, деформацією і патологічними переломами кісток [1,2,10].

Кісткова тканина представлена клітинними елементами, органічним матриксом і мінеральними речовинами. Органічний матрикс (або остеїд) на 90% складається з колагену. Фібрили колагену формують пластини, які розташовані або паралельно один до одного уздовж трабекул або періостеума, або концентрично навколо кровонесних судин, утворюючи при цьому гаверсові канали, з'єднані між собою поперечними (фолькманівськими) каналами. Неколагенова частина матриксу представлена вітамін К-залежними гліутамілпротеїнами (остеокальцин), матричними протеїнами, протеїном S, остеопонтином, остеонектином, фібронектином, а також фосфопропротеїнами, сіалопротеїнами і білками сироваткового походження. Білки неколагенової групи також пов'язані з мінералізацією кістки та належать до глікопротеїнів [11]. Молекули гіалуронової кислоти, кератан-, гепаран-, дерматансульфатів та гепарину входять до складу протеогліканів, функціями яких є утримання води та формування хряща. Мінеральна частина кістки представлена переважно кальцієм і фосфатом. Для нормальної мінералізації кісток необхідна підтримка певних концентрацій іонів кальцію та фосфору – у позаклітинній і периостальній рідинах.

Остеобласти забезпечені великою кількістю рецепторів до паратиреоїдного гормону (ПТГ), вітаміну D, простагландинів, інтерлейкінів та трансформуючого фактора росту b (ТФРb). В остеобластах локалізується основна кількість лужної фосфатази кістки.

Паратиреоїдний гормон стимулює резорбцію кістки, опосередковано впливаючи на остеобласти, а кальцитонін інгібує резорбцію кістки, безпосередньо впливаючи на остеокласти [11].

Більше 90% кальцію в організмі локалізовано в кістках, де разом з фосфатом він утворює кристали гідроксиапатиту. Однак більша частина кістки не може вільно обмінюватися кальцієм з позаклітинною рідиною (лише близько 2% кальцію скелета складають мобільні запаси).

В основі фізіологічного механізму підтримки балансу кальцію лежать ефекти ПТГ. При зниженні сироваткової концентрації Ca^{2+} посилюється секреція ПТГ, який, у свою чергу,:

1. Підвищує швидкість резорбції кістки, що забезпечує перехід кальцію в позаклітинну рідину.
2. Збільшує реабсорбцію Ca^{2+} у ниркових каналцях, тим самим підвищуючи його концентрацію в позаклітинній рідині.
3. За допомогою стимуляції утворення кальцитріолу збільшує ефективність всмоктування Ca^{2+} в кишківнику.
4. Збільшує екскрецію фосфату ниркою.

Препарат міакальцик містить гормон – кальцитонін. Аналог кальцитоніну – тиреокальцитонін синтезується в щитоподібній залозі, проте кальцитонін лосося має більшу спорідненість до рецепторів плазунів, ніж тиреокальцитонін ссавців [4]. Кальцитонін є фізіологічним антагоністом паратиреоїдного гормону, поряд з яким регулює кальцієвий обмін. У тварин, які страждають на остеопороз, препарат пригнічує активність остеокластів і підвищує активність остеобластів, що призводить до зниження виходу кальцію з кісткової тканини, таким чином інгібуючи кісткову резорбцію.

Тривала резорбція кісток може супроводжуватися порушеннями процесів мінералізації кісткового матриксу та вторинною ектопічною мінералізацією м'яких тканин (метастатична мінералізація). У ссавців схожі процеси можуть виникати при первинному гіперпаратиреоїдизмі, гіпервітамінозі Д і остеоренальному синдромі. Клінічна картина при цих захворюваннях може бути дуже схожа, тому диференційну діагностику можна проводити тільки на підставі повного анамнезу, біохімічного дослідження крові та спеціальних методів (денситометрія, рентгенографія, біопсія). Біохімічне дослідження у цьому випадку відіграє визначальне значення, адже в рептилій денситометрія, визначення іонізованого кальцію крові і рівнів кальцидіолу та ПТГ поки не є рутинними методами [3].

Для більш об'єктивної оцінки ефекту запропонованої схеми лікування ми застосовували комплекс лабораторних показників загального обміну та протеогліканів. Вважаємо доцільним використати ці показники в даній роботі при дослідженні лікувального ефекту терапевтичної схеми.

Метою роботи було дослідження ефективності застосування препаратів “Міакальцик” та “Кальція бороглюконат” у комплексному лікуванні метаболічних остеопатій у рептилій, що захворіли спонтанно, під контролем клініко-біохімічних досліджень із застосуванням показників обміну глікозаміногліканів.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводилися на базі клініки ветеринарної медицини «Пес+Кіт» м. Харкова та на базі відділу лабораторної діагностики та імунології ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» у межах договору про наукове співробітництво.

Матеріалом дослідження була сироватка крові 29 зелених ігуан (*Iguana iguana*) у віці до 2 років і вагою 450 ± 65 г. У ході денситометричного дослідження вимірювали оптичну щільність кісток верхньої щелепи, стегна та тазу, а також четвертої сходинки тест-об'єкта. З метою усунення похибок вимірювань, пов'язаних з технічними особливостями рентген-зображень (яскравість, контрастність, якість плівки, налаштування рентген-апарата тощо), показники оптичної щільності зображень кісток скелета ділили на величину оптичної щільності тест-об'єкта.

У групу контролю увійшли здорові тварини з підтвердженим клінічним статусом і відсутністю денситометрично верифікованих проявів вторинного аліментарного гіперпаратиреоїдизму. А у групу досліду увійшли ігуани з статистично значущо зниженими показниками оптичної щільності кісткової тканини верхньої щелепи ($p < 0,001$).

Дослідження щільності кісткової тканини тварин проводилися на базі лабораторії біомеханіки Державної установи «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І. Ситенка НАМН України» з використанням програмного комплексу «X-Rays», розробленого на кафедрі біотехнічних медичних автоматизованих систем Харківського національного університету радіоелектроніки. Оцінка стану кісткової тканини проводилося за зміною оптичної щільності зображення кістки на рентгенівському знімку. Рентгенограми вводилися в комп'ютер за допомогою сканера UMAX ASTRA-1220P з слайд-модулем. Сканування проводилося з оптичним дозволом 600 dpi у форматі BMP. Ці дослідження проводилися рептиліям при надходженні в клініку для верифікації клінічного статусу щодо субклінічних форм остеопатій [7,8].

У сироватці крові визначали вміст глікопротеїнів (ГП), хондроїтинсульфатів (ХСТ), загального кальцію (Ca), неорганічного фосфору (P), а також фракційний склад глікозаміногліканів (ГАГ). Вміст у сироватці крові глікопротеїнів визначали за методом О.П. Штейнберга і Я.М. Доценко, сіалових кислот - за методом Гесса, хондроїтинсульфатів (ХСТ) - за методом Nemeth - Csoka в модифікації Л.І. Слуцького, фракції глікозаміногліканів - за методом М.Р. Штерна із співавторами [5,6].

Тварин дослідної групи лікували із застосуванням кальційвмісного препарату «Кальція бороглюконат» (2 мл 20% розчину на 1 кг живої ваги, 5 ін'єкцій з інтервалом у 48 годин, внутрішньом'язово) та антагоністу паратиреоїдного гормону – «Міакальцик» (50 МЕ ін'єкційного розчину, ампульного по 5 мл лососевого кальцитоніну, 100 МЕ у 1 мл на 1 кг живої ваги двічі з інтервалом у 7 днів, внутрішньовенно) з наданням рекомендацій щодо обмеження рухової активності для недопущення патологічних переломів.

Подальший контроль за станом здоров'я тварин відбувався за допомогою клінічних та клініко-біохімічних досліджень. У сироватці крові

визначали вміст глікопротеїнів, хондроїтинсульфатів, а також фракційний склад глікозаміногліканів. У складі першої фракції ГАГ переважає хондроїтин-6-сульфат, другої фракції – хондроїтин-4-сульфат, третьої – кератансульфат та інші фракції [5]. Також визначали вміст сироваткових загального кальцію та неорганічного фосфору.

Для об'єктивізації результатів лікування проводилися дослідження біохімічного складу сироватки крові рептилій з використанням показників, що характеризують інтенсивність катаболізму органічної та мінеральної складових тканин опорно-рухового апарату, до початку лікування та протягом чотирьох тижнів. Результати досліджень представлені в таблиці.

Таблиця

Біохімічні показники в сироватці крові здорових та хворих рептилій

ПОКАЗНИКИ	1	2	3	4	5
	Здорові (n=20)	Хворі під час експерименту (n=9)			
		1 тиждень	2 тиждень	3 тиждень	4 тиждень
ГАГ загальні, ум.од.	11,3±1,04	23,2±1,208*	21,8±1,81	16,1±0,53 [°]	12,2±0,5 ^{°°}
I фракція, ум.од.	5,3±0,50	9,1±0,20*	8,1±0,42 [°]	6,1±0,34 ^{°°}	5,2±0,22 ^{°°°}
II фракція, ум.од.	3,1±0,35	11,0±0,27*	10,5±0,65	8,0±0,23	4,1±0,14**
III фракція, ум.од.	3,0±0,32	3,1±0,14	3,8±0,24	3,0±0,22	2,9±0,21
ХСТ, г/л	0,4±0,05	1,4±0,10	1,2±0,14	1,0±0,10 [°]	0,6±0,05**
Глікопротеїни, г/л.	1,7±0,10	3,0±0,10	3,0±0,10	2,7±0,10	2,0±0,20***
Загальний кальцій, ммоль/л	2,2±0,10	2,7±0,20*	2,8±0,15	2,7±0,42	2,4±0,27
Неорганічний фосфор, ммоль/л	2,3±0,02	2,9±0,15*	3,0±0,19	2,8±0,24	2,5±0,12**

Примітка: різниця вірогідна ($p < 0,05$) – * для 1-2, ** для 1-5, *** для 2-5, ° для 2-3, °° для 2-4, °°° для 4-5.

За результатами таблиці видно, що в сироватці крові хворих на остеопатії ігуан вміст загальних ГАГ при надходженні у клініку був підвищений у 2,2 раза. Протягом лікування через 1 тиждень показник не змінюється, проте через 2 тижні спостерігається статистично достовірне зниження його рівня на 30,6%. Наприкінці досліду (група 5) досліджений показник знаходиться на рівні здорових тварин ($p < 0,05$).

Щоб встановити, за рахунок якої фракції ГАГ відбулись такі зміни, ми дослідили фракційний склад ГАГ сироватки крові хворих ігуан протягом лікування. Виявилось, що у хворих тварин до початку лікування вміст I фракції ГАГ був збільшений у 1,7 раза і залишався на такому ж рівні протягом 1 тижня з початку лікувальних заходів, що співпадає із динамікою вмісту загальних ГАГ. Проте через 2 тижні (група 4) відбувається вірогідне зниження вмісту I

фракції ГАГ порівняно із показником до початку лікувальних заходів на 33%. У групі №5 вміст цієї фракції, в якій містяться переважно хондроїтин-6 сульфат, не відрізняється від цього показника у здорових ігуан. Оскільки саме цей ГАГ переважає у структурі хрящової тканини, бачимо, що лікування сприяє нормалізації обміну саме хрящової тканини за остеопатії у цих плазунів.

Аналіз змін вмісту ГАГ, що містяться у другій фракції ГАГ, свідчить, що у хворих тварин цей показник також збільшений у 3,5 раза до початку лікувальних заходів і залишається на цьому ж рівні через 2 тижні з початку лікування, на відміну від показника I фракції ГАГ. До того ж залишається достовірно підвищеним вміст II фракції ГАГ і через 3 тижні досліджу (у 1,3 рази більше, ніж у здорових ігуан). Оскільки у складі цієї фракції переважає хондроїтин-4 сульфат, що міститься в більшій кількості у кістковій тканині, можна зробити припущення, що лікування позитивно впливає на порушений обмін ГАГ кісткової тканини рептилій за остеопатії, проте повної нормалізації стану обміну кісткових ГАГ не відбувається. Але слід підкреслити, що введення вищезгаданих препаратів сприяє зниженню II фракції ГАГ у 2,7 рази порівняно із початком досліджу.

Уміст III фракції ГАГ у сироватці крові ігуан однаковий у здорових і хворих тварин. Слід зазначити, що саме в цій фракції кількісно переважають кератан- та гепарансульфати (останні містяться в базальних мембранах паренхіматозних органів тварин). Ми не встановили відмінностей рівня цієї фракції між здоровими та хворими тваринами, за винятком зростання її рівня через 1 тиждень з початку лікувальних заходів у 1,2 раза, що, можливо, зумовлено реакцією печінки та нирок на введення вищезгаданих препаратів. Проте в подальшому вміст цієї фракції в усі терміни не відрізнявся від показника у клінічно здорових тварин. Це підтверджує відсутність негативного впливу на організм рептилій застосованих нами лікувальних заходів. Отже, проведене лікування вплинуло головним чином на обмін хондроїтинсульфатів скелета хворих ігуан.

Для контролю результатів досліджу ми визначили вміст загальних сироваткових ХСТ у тих самих тварин, визначений за іншою методикою, в основі якої лежить осадження хондроїтинсульфатів риванолом за Л.І. Слуцьким. Виявилось, що динаміка цього показника повністю співпадає з вищеописаними змінами вмісту загальних ГАГ та I та II їх фракцій, визначених іншим методом за М.Р. Штерном із співавторами. Це підтверджує вірогідність одержаних нами результатів. Виявилось, що у хворих рептилій уміст ХСТ був вище, ніж у здорових, у 3,5 рази, і утримувався на такому рівні протягом 1 тижня з початку лікування. Достовірне зниження показника спостерігали через 2 тижні, що корелює як з динамікою вмісту загальних ГАГ, так і першої їх фракції. У 5 групі (останні терміни спостереження) уміст ХСТ не відрізнявся від показника у здорових тварин. Таким чином, застосування вищезазначених препаратів сприяло покращенню метаболічного статусу тканин скелета досліджуваних ігуан із субклінічними формами остеопатії.

Зниження рівня глікопротеїнів хворих рептилій у 1,5 раза на тлі використання комплексу з Бороглюконату кальція та Міакальцика через 3 тижні

застосування свідчить про позитивний вплив препаратів на запально-проліферативні процеси у кістковій тканині.

У попередній частині досліджу ми аналізували показники органічної складової тканин скелета. Ми також визначили вміст сироваткових мінеральних компонентів – загального кальцію та неорганічного фосфору. Виявилось, що обидва показники у хворих ігуан були достовірно збільшеними: вміст кальцію на 22,7%, а фосфору на 26,1% у порівнянні із здоровими тваринами, що є однією з ознак остеопатії. Вміст кальцію достовірно не знижувався, проте спостерігалась тенденція до його нормалізації, хоча вірогідної різниці між 1 та 5 групами не було встановлено. Вміст фосфору у 5 групі достовірно знизився в порівнянні з початком експерименту і не відрізнявся від показника у здорових тварин. Це свідчить, що проведене лікування сприяло нормалізації обміну не тільки органічної, але й мінеральної складової тканин скелету ігуан, хворих на остеопатію.

Висновки: 1. В ігуан, хворих на субклінічну форму остеопатії, на тлі відсутності клінічних ознак патології за даними денситометричних досліджень спостерігається зниження оптичної щільності тканин скелету на тлі порушення обмінних процесів, що підтверджується даними біохімічних досліджень.

2. В ігуан, хворих на субклінічну форму остеопатії, в сироватці крові збільшений вміст ХСТ за рахунок I і II фракцій ГАГ, на тлі незміненого рівня III фракції ГАГ, що містить кератан- та гепарансульфати; підвищений рівень глікопротеїнів, у складі яких містяться неколагенові білки, та зростає концентрація загального кальцію та неорганічного фосфору.

3. Використання комплексу з Бороглюконату кальцію та Міакальцика сприяє нормалізації обміну глікопротеїнів через 3 тижні застосування препаратів. Спостерігається зниження рівня кальцій- та фосфатемії до показників у клінічно здорових тварин.

4. За субклінічної форми остеопатії в ігуан, діагностованої за комплексом денситометричних та клініко-біохімічних досліджень, лікування із застосуванням кальційвмісного препарату «Кальція бороглюконат» (2 мл 20% розчину на 1 кг живої ваги, 5 ін'єкцій з інтервалом у 48 годин, внутрішньом'язово) та антагоністу паратиреоїдного гормону – «Міакальцик» (50 МЕ ін'єкційного розчину, ампульного по 5 мл лососевого кальцитоніну, 100 МЕ у 1 мл на 1 кг живої ваги двічі з інтервалом у 7 днів, внутрішньовенно) з наданням рекомендацій щодо обмеження рухової активності для попередження патологічних переломів призводить до нормалізації вищезгаданих показників.

Література

1. Васильев Д.Б. Остеоренальный синдром у рептилий: особенности патогенеза и терапии / Д. Б. Васильев // Ветеринарная патология. – 2006. – № 2 (17). – С. 85-89.

2. Васильев Д.Б. Профилактика нарушений минерального обмена у рептилий в неволе и применение витаминно-минеральных подкормок / Д.Б. Васильев, В. С. Швед // Научные исследования в зоологических парках. – 2006. – № 20. – Московский зоопарк, 2006.

3. Васильев Д.Б. Фосфорно-кальциевый обмен у наземных позвоночных.

Сравнительная патология, Дифференциальная диагностика, терапия основных, сопутствующих и клинически сходных болезней в рептилий / Д. Б. Васильев // Матер. X Междунар. Вет. Конгресса. – М.: 2002. – С. 134–152.

4. Кирк Р. Современный курс ветеринарной медицины Кирка / Р. Кирк, Дж. Б. Бонагура Пер. с англ. – М.: ООО «Аквариум-Принт», 2005. – 1376 с.

5. Морозенко Д.В., Левченко В.И., Тимошенко О.П. Биохимические показатели состояния соединительной ткани в диагностике болезней собак и кошек: методические рекомендации / Д.В. Морозенко, В.И. Левченко, О.П.Тимошенко. – Белая Церковь, 2012. – 42 с.

6. Степаненко А.А., Тимошенко О.П. Целесообразность использования клиничко-биохимических показателей состояния соединительной ткани у разных видов рептилий / А.А. Степаненко, А.П. Тимошенко // Научный вестник Луганского НАУ. Серия Ветеринарные науки. – Луганск: Элтон-2. – 2010. – № 18. – С. 126–131.

7. Тимошенко О.П., Карпинский М.Ю. Исследование диагностических возможностей программного комплекса "X-rays" / А. П. Тимошенко, М.Ю. Карпинский // Медицина и ... – 2001. – № 1. – С. 62–64.

8. Тимошенко О.П., Сегодин А. Б., Степаненко А.А. Использование программной денситометрии для изучения состояния костной системы рептилий / О.П. Тимошенко, А. Б. Сегодин, А.А. Степаненко // Научно-технический бюллетень Института биологии животных НААН и Государственного научно-исследовательского контрольного института ветеринарных препаратов и кормовых добавок. – Львов: Сполум – 2012. – № 13. – С. 449–456.

9. Carpenter J.W. Exotic animal formulary. 2-nd edition. / J.W. Carpenter, T.Y. Mashima // W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2001 – P. 423

10. Jacobson E.R. Biology, husbandry, and medicine of the Green iguana. / ER Jacobson // Krieger Publishing Co. Malabar, FL, 2003. – P. 177

11. Romer A. Osteology of the reptile. / A. Romer // University of Chicago Press, Chicago, 1997. – P. 800

Summary

A. Stepanenko, postgraduate student of clinical diagnostic and clinical biochemistry department, doctor of veterinary medicine clinic "Pes+Kot"
(doctor_aska@mail.ru)

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine

BIOCHEMICAL INDICATORS OF A CONNECTING TISSUE CONDITION AT DIAGNOSIS AND TREATMENT OF METABOLIC OSTEOPATHY IN REPTILES

The treatment of metabolic osteopathy in the experiment in reptiles scheme that included calcium-containing therapy and miakaltsyk - antagonist of parathyroid hormone containing tyreokaltsytonin. Using clinical, biochemical (determination of serum glycosaminoglycans) and densitometric methods research proved the feasibility of using these drugs for the treatment of osteopathy in reptiles.

Key words: reptiles, osteopathy, glycosaminoglycans, diagnosis and treatment.

Рецензент – д.вет.н., професор Коцюмбас Г.І.