

УДК: 616.71-003.84:616.24-002.2:612.08

Масік Н. П., Масік І. М.

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, м. Вінниця, Україна

Структурно-функціональні характеристики кісткової тканини щурів при моделюванні хронічного неспецифічного захворювання легень

Резюме. Мета роботи – вивчення поєданого впливу запального процесу при ХОЗЛ і менопаузи на структуру кісткової тканини в умовах експериментального моделювання хронічного неспецифічного захворювання легень (ХНЗЛ) на тлі оварієктомії. **Матеріали та методи.** Експериментальне дослідження виконано на 55 здорових білих щурах-самках лінії Вістар масою $142,17 \pm 0,54$ г віком 9 місяців. Мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) щурів визначали за допомогою двохфотонної рентгенівської абсорбціометрії (ДРА). **Результати та обговорення.** У щурів із ХНЗЛ на тлі оварієктомії МЩКТ усього скелета вже через 3 місяці зменшилась на 6,14% ($p < 0,05$), а через 6 місяців на 9,65% у порівнянні з вихідними показниками ($p < 0,05$). Найбільш виражені зміни спостерігалися в кістках кінцівок (на 18,92%), таза (на 16,79%) та всьому скелеті (на 3,54%). **Висновки.** Встановлено, що хронічний запальний процес при експериментальному ХНЗЛ викликає достовірне зниження мінеральної щільності кісткової тканини щурів, яке пришвидшується додатковим впливом метаболічних зрушень при менопаузі.

Ключові слова: хронічні неспецифічні захворювання легень; остеопороз; менопауза; експериментальне моделювання

Вступ

Серед багатьох факторів, що впливають на життєдіяльність людини, захворювання органів дихання посідають одне із провідних місць [11]. Актуальним питанням сьогодення є високий рівень поширеності хронічних неспецифічних захворювань легень (ХНЗЛ), які залежно від морфо-функціональних особливостей ушкодження повітря-провідних і респіраторних відділів легень поділяються на обструктивні й рестриктивні форми. Діагностика та лікування ХНЗЛ викликають значні труднощі як внаслідок їх нетипового перебігу [11], так і при наявності супутньої патології [12].

Деякі супутні захворювання можуть розвиватися незалежно від хронічного обструктивного захворювання легень (ХОЗЛ), інші можуть формуватися внаслідок ХОЗЛ, мати спільні причини та чинники ризику, причому одне захворювання може само по собі збільшувати ризик розвитку іншого [8]. В цілому в популяції наявність паралельно існуючих захворювань суттєво підвищується з віком – з 10% до 19 років, до 80% у осіб 80 років і старше [15]. Оскільки хворі на ХОЗЛ – це здебільшого літні

пацієнти, висока розповсюдженість коморбідних станів не може бути пояснена тільки літнім віком пацієнтів [16].

Велике значення при ХОЗЛ мають порушення вентиляції, системна гіпоксія, метаболічний ацидоз, компенсаторний еритроцитоз, а також сам хронічний запальний процес, що супроводжується оксидантним стресом і цитокиновим дисбалансом [3]. В літературних джерелах немає єдиної точки зору щодо спрямованості цитокинового дисбалансу при ХОЗЛ, але до загальних факторів розвитку патологічних процесів кісткової тканини, зокрема вторинного системного остеопорозу, слід віднести вираженість системного запалення, тяжкість бронхообструкції, знижену фізичну активність і толерантність до фізичного навантаження [2], особливо у осіб літнього віку та в жінок у період постменопаузи [13].

Виходячи з вищенаведеного, *метою* роботи було вивчити поєднаний вплив запального процесу при ХОЗЛ і менопаузи на структуру кісткової тканини в умовах експериментального моделювання ХНЗЛ на тлі оварієктомії.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження виконано на 55 здорових білих статевозрілих щурах-самках лінії Вістар масою $142,17 \pm 0,54$ г віком 9 місяців. Тварин було отримано з віварію ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України», їх утримували в стандартних умовах на стандартному раціоні харчування й брали в дослідження після 2-тижневого карантину при відсутності жодних ознак захворювання. Всі експериментальні дослідження здійснювали відповідно до Закону України № 3447-IV, вимог Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин (Страсбург, 1986), «Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях» [4, 5]. Проведені дослідження відповідають етичним та морально-правовим вимогам згідно наказу МОЗ України №281 від 01.11.2000 р.

Тварини були розподілені на декілька серій. Основну групу склали 25 щурів, яким створювали модель системного запалення при ХНЗЛ на тлі оварієктомії; 20 тварин, яким була виконана оварієктомія, були включені до групи порівняння, 10 тварин склали контрольну групу.

Щурів зважували, а потім вводили в ефірний наркоз до стадії поверхневої анестезії. Тварину фіксували на спеціальних підставках на спині. Після обробки операційного поля (нижньої половини живота) розчином антисептика виконували поздовжній пошаровий розріз передньої черевної стінки до 2,5 см довжиною. Пінцетом виділяли роги матки й яєчники. Яєчники перев'язували шовною ниткою й відсікали. Рану ушивали пошарово.

Моделювання експериментального ХНЗЛ здійснювали через 2 тижні після проведеної оварієктомії. Перед операцією готували завес побутового дрібнодисперсного пілу, зібраного методом седиментації та просіяного через сита, що забезпечувало отримання переважної кількості (75%) пилових часток розміром до 8 мкм. Після премедикації і введення тварини в ефірний наркоз, її фіксували на спеціальних підставках на спині. Операційне поле (передня поверхня шиї, область щитоподібного хряща) обробляли розчином антисептика, після чого виконували поздовжній розріз шкіри 1-1,5 см довжиною, надсікали м'язовий пучок над трахеєю й оголювали її. Завес пілу вводили в просвіт трахеї за допомогою стерильного шприца через прокол передньої стінки трахеї між двома хрящовими півкільцями голкою діаметром 0,8 мм. Пил вводили з розрахунку 10 мг на 100 г маси в 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину. М'язи й краї розрізу шкіри ушивали наглухо. Щурам контрольної групи інтратрахеально вводили 0,5 мл стерильного фізіологічного розчину.

З метою з'ясування взаємозв'язків ХОЗЛ, менопаузи й остеопорозу, ми провели поглиблене обстеження кісткової тканини щурів. Протягом усього експерименту з інтервалом у 3 місяці (на початку, через 3 і 6 місяців) проводили рентгенденситометричне дослідження за допомогою двохенергетичної рентгенівської абсорбціометрії (ДРА) на апараті «Prodigy» з використанням програми «Experimental animals».

Визначали мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) всього скелета, хребта, осового скелета, кісток таза, тазових кінцівок [17]. Статистичну обробку отриманих результатів дослідження здійснювали на основі комп'ютерної програми «Statistica 6.1.»

Результати та обговорення

У результаті вивчення динаміки маси тіла щурів у процесі спостереження було виявлено, що в тварин контрольної групи приріст становив через 3 місяці $18,62 \pm 12,31\%$, через 6 місяців – $42,86 \pm 15,65\%$ у порівнянні з вихідними значеннями ($p > 0,05$).

У групі щурів із проведеною оварієктомією (ОВ) через 3 місяці маса тіла збільшилась на $34,23 \pm 10,61\%$, а через 6 місяців – на $67,57 \pm 10,47\%$ ($p < 0,05$ у порівнянні з вихідними значеннями). У групі тварин, яким моделювали системне запалення при ХНЗЛ на тлі оварієктомії (ОВ + ХНЗЛ), через 3 місяці після операції приріст маси тіла становив $24,16 \pm 8,56\%$, через 6 місяців – $36,20 \pm 9,61\%$ ($p > 0,05$ у порівнянні з вихідними значеннями). У обох групах спостереження в порівнянні з контролем приріст маси тіла не був достовірним ($p > 0,05$).

Отримані дані свідчать про те, що маса тіла здорового щура впродовж першого року життя продовжує зростати, а виконана ОВ сприяє збільшенню маси внаслідок змін гормонального статусу. Адже відомо, що в менопаузі гіперандрогенемія на тлі гіпоестрогенемії сприяє формуванню абдомінально-вісцерального ожиріння [18], а також внаслідок посилення глюкокортикоїдної стимуляції збільшуються розміри абдомінальних адипоцитів і відбувається абдомінальний перерозподіл жиру [14].

Рентгенденситометричне дослідження кісткової тканини контрольних тварин у динаміці спостереження виявило, що МЩКТ у різних ділянках скелета недостовірно коливалась як у бік підвищення, так і зниження. Показники кісткової щільності відповідають значенням на етапі формування кісток. Це може бути пов'язано з різними процесами ремоделювання губчастої й компактною кісткової тканини. Незважаючи на те, що трабекулярна кістка складає лише 20% скелета, в ній відбувається 80% ремоделювання. На кортикальну кістку припадає 80% скелета, в ній відбувається 20% кісткової перебудови [9].

У групі щурів із проведеною ОВ через 3 місяці після операції мало місце деяке збільшення МЩКТ усього скелета – на 0,98% вище, ніж до операції ОВ. Цей факт свідчить про те, що кісткова маса щура впродовж першого року життя продовжує зростати й досягає піку до кінця року.

Через 6 місяців після операції ОВ МЩКТ усього скелета зменшилась на 11,77% у порівнянні з вихідними показниками ($p < 0,05$). Найбільш виражені зміни спостерігали в кістках таза й хребта. Так, МЩКТ кісток таза зменшилась на 11,38%, а МЩКТ хребта – на 8,49% ($p < 0,05$ для обох значень). Протилежні зміни відзначено з боку осового скелета – МЩКТ збільшилась на 10,77%. Таким чином, за результатами виконаного моделювання ОВ через 6 місяців

Таблиця 1. Зміни мінеральної щільності кісткової тканини щурів при формуванні експериментального остеопорозу ($M \pm m$)

Групи тварин		МЩКТ всього скелета (г/см ²)	МЩКТ хребта (г/см ²)	МЩКТ аксіального скелету (г/см ²)	МЩКТ кісток таза (г/см ²)	МЩКТ тазових кінцівок (г/см ²)
Контроль, n = 10	до	0,112 ± 0,023	0,148 ± 0,024	0,101 ± 0,012	0,117 ± 0,017	0,100 ± 0,044
	через 3 міс	0,108 ± 0,011	0,146 ± 0,029	0,104 ± 0,011	0,123 ± 0,016	0,090 ± 0,010
	через 6 міс	0,099 ± 0,009	0,145 ± 0,025	0,105 ± 0,011	0,126 ± 0,014	0,082 ± 0,006
ОВ, n = 20	до	0,102 ± 0,005	0,106 ± 0,007	0,130 ± 0,010	0,123 ± 0,010	0,083 ± 0,004
	через 3 міс	0,103 ± 0,005	0,101 ± 0,008	0,129 ± 0,009	0,115 ± 0,009	0,083 ± 0,004
	через 6 міс	0,090 ± 0,001 *	0,097 ± 0,010	0,144 ± 0,011	0,109 ± 0,006	0,084 ± 0,005
ОВ+ХНЗЛ, n = 25	до	0,114 ± 0,002	0,113 ± 0,010	0,168 ± 0,010	0,131 ± 0,010	0,111 ± 0,020
	через 3 міс	0,107 ± 0,002 *	0,116 ± 0,008	0,172 ± 0,010	0,134 ± 0,010	0,103 ± 0,020 *
	через 6 міс	0,103 ± 0,001 *	0,109 ± 0,009	0,170 ± 0,010	0,109 ± 0,004*	0,090 ± 0,006 *

Примітка. * – вірогідна різниця в показниках у порівнянні з вихідними значеннями ($p < 0,05$).

МЩКТ щурів достовірно знизилася в порівнянні з показниками до операції. Це свідчить про сформовану модель первинного остеопорозу постменопаузального періоду через 6 місяців після оваріектомії (таблиця 1).

У групі тварин, яким моделювали ОВ+ХНЗЛ, уже через 3 місяці після операції визначали МЩКТ усього скелета на 6,14% нижчу, ніж до операції, а МЩКТ тазових кінцівок – на 7,21% ($p < 0,05$ для обох значень). Натомість відзначали протилежні зміни МЩКТ в інших ділянках скелета. Так, МЩКТ тазових кісток становила на 2,29% більше вихідних значень, а МЩКТ хребта та осового скелета – на 2,65 і 2,38% ($p > 0,05$).

Через 6 місяців після моделювання ОВ+ХНЗЛ МЩКТ усього скелета зменшилася на 9,65% у порівнянні з вихідними показниками ($p < 0,05$). Найбільш виражені зміни спостерігали в кістках кінцівок, таза й осового скелета. Так, МЩКТ тазових кінцівок зменшилася на 18,92%, МЩКТ кісток таза – на 16,79% ($p < 0,05$), а МЩКТ осового скелета – на 3,54% ($p > 0,05$). Найменш виражені зміни кісткової тканини відзначено в області хребта – МЩКТ збільшилася на 1,18% ($p > 0,05$) (таблиця 1).

Отже, моделювання системного запалення при ХНЗЛ на тлі оваріектомії супроводжується зниженням МЩКТ уже через 3 місяці від початку експерименту. Ці показники поглиблюються із часом і через 6 місяців з початку експерименту підтверджують формування остеопорозу. Відтак, остеопоротичні зміни в кістковій тканині тварин в умовах експериментального моделювання розвиваються в коротші терміни при поєднанні декількох негативних чинників: системного запалення при ХНЗЛ та естрогенного дефіциту.

Якщо екстраполювати ці дані на людей, то 9-місячні самки щурів відповідають віку людини 25–30 років. За час експерименту (6 місяців) щурі досягли дорослого віку, що відповідає віку 30 – 40 років. Згідно з даними наукових досліджень у жінок втрата кісткової маси розпочинається приблизно із 35–40 років і становить

0,5–1% на рік. З настанням менопаузи, а також у перші 3-5 років постменопаузального періоду цей показник зростає до 3-7% на рік [6]. Отже, отримане зниження значень МЩКТ у експериментальних тварин аж ніяк не можна пояснити віковими втратами кісткової тканини.

Результати нашого дослідження в тою чи іншою мірою суперечать працям окремих науковців, котрі відзначають зміни на рівні активного трабекулярного відділу кісткової тканини при збереженій структурі компактної кістки при експериментальному хронічному неспецифічному запаленні в легенях [1, 7]. Отримані дані автори трактують як активацію кісткової резорбції при відносно стабільному остеогенезі. Натомість, при моделюванні тироксिनowego остеопорозу автори відзначали найбільші втрати кісткової тканини в ділянках з найбільш високим рівнем ремоделювання [10].

Отже, на основі результатів проведеного дослідження можна стверджувати, що внаслідок дії патологічного системного запального процесу в бронхо-легеневій системі в поєднанні з гормональними зрушеннями при менопаузі порушується метаболізм кісткової тканини, який призводить до зниження її мінеральної щільності й розвитку остеопорозу.

Висновки

Встановлено, що хронічний запальний процес при експериментальному хронічному неспецифічному захворюванні легень викликає достовірно зниження мінеральної щільності кісткової тканини щурів, що пришивиджується додатковим впливом метаболічних зрушень при менопаузі.

Експериментальне моделювання хронічних неспецифічних захворювань легень на тлі оваріектомії забезпечує достатньо високе відтворення процесу, патогенетично наближеного до клінічного варіанту хронічного обструктивного захворювання легень, і дає можливість вивчення особливостей функціонування цілісного організму при даній патології.

Література

1. Бродская Т.А., Невзорова В.А., Гельцер Б.И. и др. Экспериментальное моделирование хронической обструктивной болезни легких с табакокурением и проявлением сосудистой дисфункции // Бюллетень СО РАМН. – 2009. – № 1 (135). – с. 60-65.
2. Гуменюк М.І., Ігнат'єва В. І., Матвієнко Ю. О. та інш. Маркери системного запалення у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень // Укр. пульмонолог. журн. – 2014. – № 3. – С.33-36.
3. Гуменюк, М. І., Мазур І. П., Ігнат'єва В. І. та інш. Дослідження мінеральної щільності поперекових хребців і денситометричних показників щільності губчастої речовини альвеолярного відростка та бугра верхньої щелепи у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень // Укр. пульмонологічний журнал. – 2014. – №1. – С. 18-24.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [методичні рекомендації] / О.В. Стефанов. – К.: Авіцена. – 2002. – 527 с.
5. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках// Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2003 – №2 (22). – С. 108-109.
6. Коваленко В.М., Поворознюк В.В., Борткевич О.П. та інш. Рекомендації з діагностики, профілактики та лікування системного остеопорозу у жінок в постменопаузальному періоді// Укр. Ревматологічний журнал. – 2009. – №3 (37). – 16 с.
7. Коцюрбий Е.А. Морфологическая оценка костной ткани при хронической обструктивной болезни легких [Текст]: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.15 / Коцюрбий Евгений Анатольевич; Владивостокский государственный медицинский университет. – Владивосток, 2004. – 20 с.
8. Крахмалова О.О. Ведення пацієнтів з хронічним обструктивним захворюванням легень та ішемічною хворобою серця при наявності синдрому обструктивного апное/гіпнопно сну: невирішені питання // Укр. пульмонолог. журнал. – 2015. – № 1. – С. 53-57.
9. Олійник В.А., Поворознюк В.В., Терехова Г.М. Вторичный эндокринный остеопороз: современные взгляды на эпидемиологию, классификацию, патогенез // Журнал практичного лікаря. – 2003. – №3. – С.10-15.
10. Поворознюк В.В., Гопкалова И.В., Григорьева Н.В. Возрастные особенности изменений минеральной плотности костной ткани у самок крыс линии Вистар при экспериментальном гипертиреозе// Проблемы старения и долголетия. – 2012. – № 1 (21). – С. 24-30.
11. Тодоріко Л.Д. Особливості тиреоїдної та глюкокортикоїдної активності при неспецифічних захворюваннях органів дихання та туберкульозі легень у пацієнтів старшого віку // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2015. – № 1 (80). – С. 37-42.
12. Фещенко Ю.І. Хронічне обструктивне захворювання легень: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, терапія (національна угода) // Укр. пульмонолог. журн. – 2013. – № 3, додаток. – С. 7-12.
13. Фещенко Ю.І. Хронічне обструктивне захворювання легень: етіологія, патогенез, класифікація, діагностика, терапія: метод. посібник // Державна установа: «Національний інститут фізичної та пульмонології імені Ф.Г. Яновського Академії медичних наук України». – К.: ДУ НІФП НАМНУ, 2013. – 52 с.
14. Fasshaner M., Paschke R., Fasshaner M. Regulation of adipocytokines and insulin resistance // Diabetologia. – 2003. – 46 (12). – P. 1594-1603.
15. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Diseases (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. [Electronic Resource] / WHO, 2011. – Режим доступу : <http://www.goldcopd.com>.
16. Mannino D.M., Thorn D., Swensen A. et al. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension, and cardiovascular disease in chronic obstructive pulmonary disease // Eur. Respir. J. – 2008. – 32. – P. 962-969.
17. Nagy T.R., Prince C.W., Li J. Validation of peripheral DXA for the measurement of bone mineral in intact and excised long bones of rats// J. Bone Mineral Res. – 2001. – Vol.16. – P. 1682-1687.
18. Tilg H., Moschen A. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity // Nature Reviews Immunology. – 2006. – 6 (10). – P. 772-783.

Отримано 11.11.2016 ■

Масик Н. П., Масик И. Н.

Винницкий национальный медицинский университет им. Пирогова, г. Винница, Украина

Структурно-функциональные характеристики костной ткани крыс при моделировании хронического неспецифического заболевания легких

Резюме. Значительное количество исследований, посвященных изучению проблемы остеопороза при хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), объясняется наличием общих факторов риска и единством ряда патогенетических механизмов, обуславливающих параллельное развитие пульмонологической патологии и остеопороза. Учитывая актуальность этой проблемы, **целью** работы стало изучение сочетанного воздействия воспалительного процесса при ХОБЛ и менопаузы на структуру костной ткани в условиях экспери-

ментального моделирования хронического неспецифического заболевания легких (ХНЗЛ) на фоне овариэктомии. **Материалы и методы.** Экспериментальное исследование выполнено на 55 здоровых белых крысах-самках линии Вистар массой 142,17 ± 0,54 г в возрасте 9 месяцев. 25 крысам создавали модель системного воспаления при ХНЗЛ на фоне овариэктомии; 20 животных были включены в группу сравнения, им была выполнена только овариэктомия, 10 здоровых животных составили контрольную группу. Минеральную плотность костной

ткани (МПКТ) крыс определяли с интервалом в 3 месяца методом двухфотонной рентгеновской денситометрии с помощью программы «Experimental animals». **Результаты и обсуждение.** Через 6 месяцев после овариэктомии МПКТ всего скелета крыс достоверно уменьшилась на 11,77% по сравнению с исходными показателями, что свидетельствует о создании модели первичного постменопаузального остеопороза. В группе животных, которым моделировали системное воспаление при ХНЗЛ на фоне овариэктомии, уже через 3 месяца после операции МПКТ всего скелета уменьшилась на 6,14% ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения наблюдались в костях тазовых конечностей (на 7,21%). Через 6 месяцев после моде-

лирования ХНЗЛ на фоне овариэктомии МПКТ всего скелета уменьшилась на 9,65% по сравнению с исходными показателями ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения наблюдались в костях тазовых конечностей (на 18,92%), тазовых костях (на 16,79%) и осевом скелете (на 3,54%). **Выводы.** Установлено, что хронический воспалительный процесс при экспериментальном ХНЗЛ вызывает достоверное снижение минеральной плотности костной ткани крыс, которое ускоряется дополнительным влиянием метаболических нарушений при менопаузе. **Ключевые слова:** хронические неспецифические заболевания легких; остеопороз; менопауза; экспериментальное моделирование

N. P. Masik, I. N. Masik

Vinnitsa National Pirogov Medical University, Vinnitsa, Ukraine

Structural and functional characteristics of rat bone and modeling nonspecific chronic lung disease

Abstract. Introduction. A considerable amount of research devoted to the problem of osteoporosis accompanied by the chronic obstructive pulmonary disease (COPD) analyzes the presence of unified risk factors and pathogenic mechanisms leading to the parallel development of pulmonological disorders and osteoporosis. Given the urgency of this problem, the purpose of our article was to study the combined influence of the inflammatory process on bone structure in COPD and menopause in terms of experimental modeling of chronic nonspecific lungs disease (CNLD) accessory to ovariectomy. **Materials and methods.** An experimental study was performed on 55 healthy female white Wistar rats weighing 142.17 ± 0.54 g and aged 9 to 12 months. 25 rats were included into a created model of systemic inflammation, CNLD accessory to ovariectomy; 20 animals were included in the comparison group, with only ovariectomy performed, 10 healthy animals made the control group. We determined the bone mineral density (BMD) in rats at intervals of 3 months using the

«Experimental animals» DEXA software. **Results.** After 6 months of ovariectomy, rats' total BMD decreased by 11.77% compared to the benchmarks, indicating the creation of primary postmenopausal osteoporosis model. In the group of animals which had a modeled systemic inflammation with CNLD accessory to ovariectomy within 3 months after the operation the total BMD decreased by 6.14%. The most significant changes were observed in the bones of the extremities (7.21%). After 6 months of modeling with CNLD accessory to ovariectomy BMD decreased by 9.65% compared with baseline values. The most significant changes were observed in the bones of the extremities (18.92%), pelvis (16.79%) and axial skeleton (3.54%). **Conclusions.** Chronic inflammation in the experimental CNLD causes a significant decrease in bone mineral density of rats accelerated by an additional influence of metabolic changes during menopause.

Keywords: chronic nonspecific lungs disease; osteoporosis; menopause; experimental design