

**Ковальчук Л.Я., Гнатюк М.С., Сміян С.І., Жулкевич І.В., Масик О.М.,
Гудима А.А., Лісничук Н.Є.**

**Комплексне експериментальне дослідження Імобілізаційної моделі остеопорозу
Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського**

**КОМПЛЕКСНЕ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОЇ
МОДЕЛІ ОСТЕОПОРОЗУ** – Проведено комплексне морфо-функціональне вивчення основних гомеостатичних систем організму (перекисного окислення ліпідів, стану антиоксидантного захисту та ендогенної інтоксикації й основних імунологічних параметрів та гістоморфометричних характеристик кісткової тканини) експериментальних тварин в умовах іммобілізаційного остеопорозу. Отримані дані свідчать, що 1) іммобілізаційний остеопороз призводить до дисбалансу кальцієво-фосфорного метаболізму за рахунок зростання рівня кальцію з одночасним зниженням рівня фосфору в сироватці крові піддослідних тварин; 2) довготривала іммобілізація веде до змін архітекtonіки діафізарно-епіфізарної зони трубчастих кісток та порушення кровопостачання за рахунок зменшення кількості анастомозів між судинами ендо-, мезо- і періостальної зон; 3) іммобілізація є дисрегуляторним чинником відносно до імунної системи; 4) вищенаведені зміни виявляються на тлі активації перекисного окислення ліпідів та наростання ендотоксемії.

**КОМПЛЕКСНОЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ИММОБИЛИЗАЦИОННОЙ МОДЕЛИ ОСТЕОПОРОЗА** – Проведенное комплексное морфо-функциональное изучение основных гомеостатичних систем организма (перекисного окисления липидов, состояния системы антиоксидантной защиты и параметров эндогенной интоксикации, а также основных иммунологических показателей и гистоморфометрических характеристик костной ткани) экспериментальных животных (белых крыс) в условиях иммобилизационного остеопороза. Полученные данные свидетельствуют, что 1) иммобилизационный остеопороз приводит к дисбалансу кальциево-фосфорного метаболизма за счет возрастания уровня кальция с одновременным снижением уровня фосфора у подопытных животных; 2) иммобилизация ведет к изменениям архитектоники диафизарно-эпифизарной зоны трубчатых костей и нарушениям кровоснабжения за счет уменьшения числа анастомозов между сосудами ендо-, мезо- и периостальных зон; 3) вышеуказанные изменения выявляются на фоне активации перекисного окисления липидов и нарастания эндотоксемии; 4) иммобилизация является дисрегуляторным фактором по отношению к иммунной системе.

**COMPLEX EXPERIMENTAL RESEARCH IMMOBILIZATION OF MODEL
OSTEOPOROSIS** – Complex morpho-functional study basic homeostatic systems of organism (lipid oxidation, condition of system antioxidation of protection and parameters endogenic intoxication, and also basic immune of parameters and hystomorphometrics of the characteristics of bone fabric) experimental animal (white rats) in conditions immobility osteoporosis. The received data testify, that 1) immobility osteoporosis results to disbalance calcium-phosphoric metabolism at the expense of increase of a level calcium with simultaneous decrease (reduction) of a level of phosphorus at experimental animals, 2) immobilization conducts to changes architect diaphys and apiphys of zone tubular bones and infringements blade circulation at the expense of reduction of number anastomosis between vessels endo-, mezo- and periostal of zones, 3) above-stated changes come to light on a background of activation peroxidation of lipid and increase endotoxic, 4) immobilization is disregular the factor in relation to immune system.

Ключові слова: остеопороз, експериментальне дослідження, іммобілізаційна модель.

Ключевые слова: остеопороз, экспериментальное исследование, иммобилизационная модель.

Key words: osteoporosis, experimental research, immobilization model.

Привернення уваги інтернів [5, 9] до проблеми остеопорозу (ОП) при вторинних ураженнях кісткової тканини (КТ) зумовлюють два важливих фактори: зростання кількості остеопоротичних уражень КТ [18] в структурі якого вторинні форми ОП

переважають в останньому десятиріччі [19, 23, 25], а також поява нових і точних клінічних неінвазивних методів дослідження мінеральної щільності КТ [7, 14]. Незважаючи на певні клінічні досягнення по вивченню вторинних форм ОП [9, 13] комплексні дослідження морфо-функціонального стану КТ при вторинних її ураженнях малочисельні [6, 21], а експериментальні повідомлення вкрай протилежні [16, 26].

Чільне місце серед сучасних методів моделювання ОП належить іммобілізаційній моделі [22] як моделі, в якій реалізовані основні патогенетичні ланки, характерні для первинного та вторинного ОП [24].

Метою дослідження було комплексне морфо-функціональне вивчення основних гомеостатичних систем організму (перекисного окислення ліпідів, стану антиоксидантного захисту та ендогенної інтоксикації і основних імунологічних параметрів та гістоморфометричних характеристик КТ) експериментальних тварин в умовах іммобілізаційного ОП.

Матеріали та методи Дослідження проведене на 65 безпородних білих щурах (самці) масою 212-220 г, які були розділені на 2 групи – 1-а група складалася із 32 практично здорових тварин, які знаходилися у звичайних умовах і раціоні віварію, 2-а група включала 33 щури із експериментальним ОП, який моделювали за методикою Z. Kundurovic і співавт. [20]. В кінці експерименту евтаназію тварин здійснювали швидкою декапітацією.

У цільній крові проводили визначення вмісту малонового діальдегіду (МДА) [2], середньомолекулярних пептидів (СМП1, СМП2) [11], у сироватці – дієнових кон'югатів (ДК) [3], відновленого глутатіону (ВГ) [17] та активності каталази [10]. Концентрацію сироваткових імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG) вивчали біохімічним методом [15], а також вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) [4] та стан фагоцитарної активності лейкоцитів: фагоцитарне число і відносну кількість фагоцитуючих лейкоцитів [15]. Рівень кальцію та фосфору визначали за методами, описаними в [12]. Проводилося морфометричне та гістологічне дослідження трубчастих кісток скелета та їхня морфометрія [1]. Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики. Достовірність різниці встановлювали за критерієм Ст'юдента.

Результати досліджень та їх обговорення Спостереженням за експериментальними тваринами було встановлено, що при іммобілізаційному ОП вони втрачали свою активність, апетит, масу, їхня шерсть втрачала природній блиск. Досліджувані показники, що характеризували перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), стан антиоксидантного захисту організму та ендогенної інтоксикації подані в таблиці 1. Аналіз показав, що для іммобілізаційного ОП було характерним зростання інтенсивності ПОЛ. Так, в умовах іммобілізації рівень МДА зростав майже в 1,8 раза, а концентрація ДК – на 70%. Слід вказати, що при цьому стан антиоксидантного захисту організму дослідних щурів істотно знижувався, про що свідчила динаміка рівня ВГ та активності каталази. Так, концентрація ВГ в умовах даного дослідження зменшувалася з $(0,940 \pm 0,045)$ ммоль/л до $(0,620 \pm 0,042)$ ммоль/л ($p < 0,01$), тобто майже в 1,5 раза. Активність каталази сироватки крові теж істотно знижувалася. Остання у щурів при іммобілізаційному ОП сягала $(11,50 \pm 0,66)$ мккат/л, а у інтактних тварин вона складала $(20,80 \pm 0,93)$ мккат/л ($p < 0,001$). Іммобілізаційний ОП також характеризувався зростанням рівня маркерів ендогенної інтоксикації, що підтверджувалося динамікою концентрацій СМП1 та СМП2 у сироватці крові. Так, у створених експериментальних умовах рівень СМП1 у сироватці крові підвищувався з $(176,80 \pm 9,30)$ ум. од. до $(240,2 \pm 21,6)$ ум. од. ($p < 0,05$), тобто на 35,8%, а концентрація СМП2 – на 24,3%.

Таблиця 1. Динаміка показників ПОЛ – антиоксидантного захисту та маркерів ендогенної інтоксикації у білих щурів при експериментальному ОП

Примітка: в таблицях 1-3 зірочкою позначені величини, що статистично достовірно відрізняються від контрольних (* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$).

Одержані показники гуморальної ланки імунітету, рівні ЦІК у сироватці крові і фагоцитарної здатності лейкоцитів подані у таблиці 2. Аналіз даних встановив, що при експериментальному ОП суттєво змінюється гуморальна ланка імунітету організму тварин. Так, концентрація IgA зростала з $(0,496 \pm 0,027)$ г/л до $(1,220 \pm 0,120)$ г/л ($P < 0,01$), тобто у 2,45 рази, рівень IgM – з $(0,420 \pm 0,021)$ г/л до $(0,970 \pm 0,096)$ г/л ($P < 0,01$) – у 2,3 рази, а IgG – з $(2,70 \pm 0,07)$ г/л до $(4,80 \pm 0,21)$ г/л ($P < 0,001$). Останній показник перевищував аналогічну контрольну величину у 1,8 рази, тобто на 77,8%.

В експерименті різко підвищувалася концентрація ЦІК у сироватці крові дослідних тварин. Остання величина зростала з $(55,10 \pm 3,60)$ ум. од. до $(112,30 \pm 4,20)$ ум. од. ($P < 0,001$). Слід вказати, що досліджуваний параметр при змодельованій патології перевищував аналогічну контрольну величину на 103,8%. При іммобілізаційному ОП також суттєво погіршувалася фагоцитарна активність лейкоцитів. Так, при цьому ФЧ знижувалося з $(3,20 \pm 0,03)$ до $(2,12 \pm 0,03)$ ($P < 0,001$), тобто у 1,5 рази, а відсоток фагоцитуючих лейкоцитів – з $(30,10 \pm 1,20)\%$ до $(25,40 \pm 0,08)\%$, тобто на 15,6%.

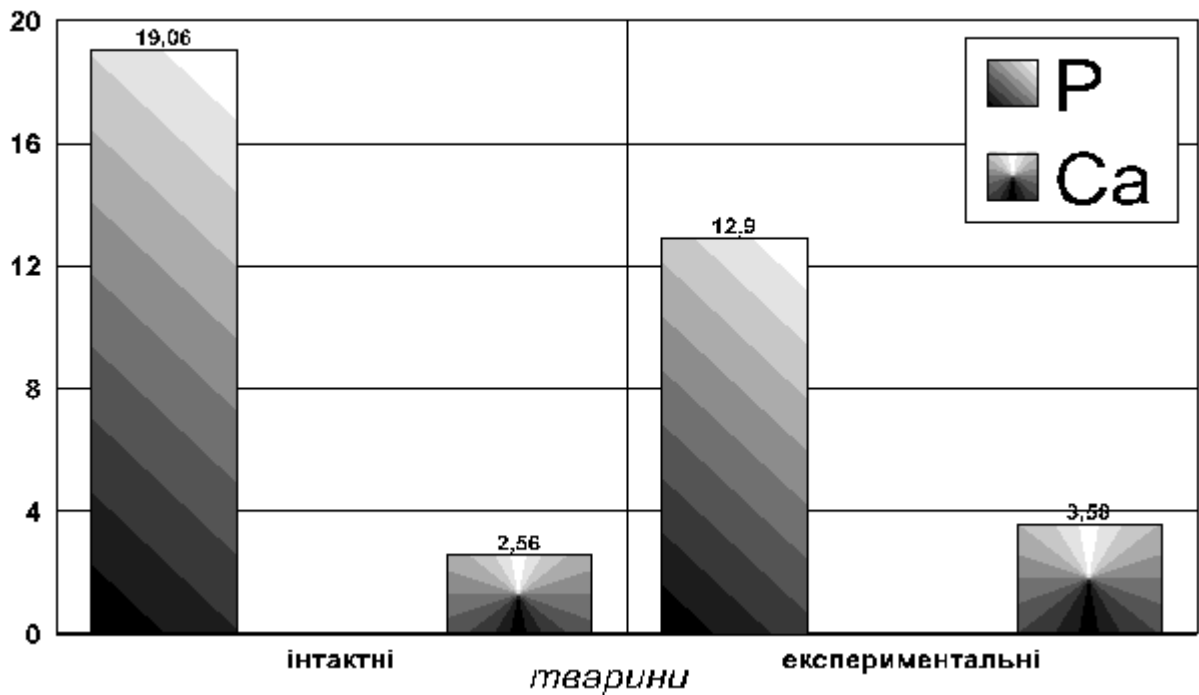
Таблиця 2. Зміни показників гуморального імунітету, ЦІК і фагоцитарної здатності лейкоцитів у тварин з іммобілізаційним ОП

Наведені дані свідчать, що концентрації основних класів імуноглобулінів (А, М, G) підвищувалися нерівномірно та диспропорційно, що вказувало на напруженість та нестабільність імунологічної резистентності організму, що також підтверджувалося динамікою показників фагоцитарної активності лейкоцитів.

Концентрація кальцію і фосфору у сироватці крові дослідних тварин подана на рисунку 1. Аналіз величин показав, що при експериментальному ОП у сироватці крові білих щурів суттєво зростав рівень кальцію. Так, у інтактних тварин досліджувана величина становила $(2,56 \pm 0,09)$ ммоль/л, а у дослідних щурів – $(3,58 \pm 0,12)$ ммоль/л. Наведені показники статистично достовірно відрізнялися між собою і останній параметр перевищував попередній у 1,4 рази.

Слід зазначити, що в експериментальних умовах концентрація фосфору в сироватці крові експериментальних тварин істотно знижувалася. Так, у сироватці крові інтактних білих щурів досліджуваний показник становив $(19,06 \pm 0,54)$ мкмоль/л, а у експериментальних тварин – $(12,90 \pm 0,36)$ мкмоль/л ($P < 0,001$). Останній параметр знижувався порівняно з попереднім на 32,3 %. Внаслідок різнонаправлених змін кальцієво-фосфорного метаболізму змінювався і коефіцієнт Ca/P – в групі інтактних тварин він становив $(0,13 \pm 0,02)$, а в групі тварин з іммобілізаційним ОП – $0,27 \pm 0,02$ ($P < 0,001$).

Морфометричні показники плечової та великогомілкової кістки у білих щурів з експериментальним ОП подані в таблиці 3. Так, довжина плечової кістки у дослідних тварин зменшувалася з $(20,45 \pm 0,30)$ мкм до $(19,22 \pm 0,24)$ мкм ($P < 0,05$), тобто на 6,1%. В цих змодельованих патологічних умовах ширина проксимального епіфіза плечової кістки знижувалася з $(4,94 \pm 0,09)$ мкм до $(4,68 \pm 0,05)$ мкм ($P < 0,05$), тобто – на 5,26%, а ширина діяфіза – з $(2,30 \pm 0,03)$ мкм до $(2,15 \pm 0,03)$ мкм ($P < 0,05$), тобто остання була меншою від попередньої на 6,5%. Майже аналогічна динаміка спостерігалася при вивченні ширини дистального епіфіза. Так, у інтактних тварин ширина дистального епіфіза дорівнювала $(5,86 \pm 0,09)$ мкм, а у білих щурів з експериментальним



ОП – $(5,60 \pm 0,06)$ мкм. Наведені величини між собою статистично достовірно відрізнялися і останній параметр був меншим від аналогічного у білих щурів контрольної групи на 4,4%.

Морфометрична характеристика великогомілкової кістки у білих щурів з експериментальним ОП показала, що досліджувані показники при експериментальному ОП суттєво змінювалися. Так, довжина великогомілкової кістки в цих змодельованих патологічних умовах зменшувалася з $(27,20 \pm 0,39)$ мкм до $(25,60 \pm 0,42)$ мкм. Наведені величини статистично достовірно відрізнялися між собою ($P < 0,05$) і останній параметр був меншим від попереднього на 5,9%. Ширина проксимального епіфіза у дослідних щурів також знижувалася з $(7,10 \pm 0,12)$ мкм до $(6,74 \pm 0,09)$ мкм ($P < 0,05$), тобто майже на 5,1%. Ширина діафіза в цих іммобілізаційних умовах виявилася зменшеною на 4,1%, а ширина дистального епіфіза – на 5,07%. Вищенаведені величини свідчать, що при експериментальному ОП морфометричні характеристики великогомілкової кістки були

істотно меншими порівняно з аналогічними параметрами у інтактних експериментальних тварин.

Гістологічні дослідження виявили, що межі між зонами епіфізарного хряща нечіткі. Місцями, на протязі всього епіфізарного хряща, спостерігається лише сполучна тканина. Хондроцити значно зменшені в розмірах. Ядра хондроцитів неправильної форми, зміщені до периферії. Більшість хондроцитів об'єднані в ізогенні групи, які складаються в основному із незрілих форм хрящової тканини. Зустрічаються поодинокі групи хондроцитів, що діляться. Слід вказати, що на межі з діафізом і навіть посередині епіфізарного хряща зустрічаються дрібновогнищеві ділянки некротизованих хондроцитів. Місцями зустрічаються ділянки незвапненої речовини кістки – остеїди. Спостерігаються чисельні порожнини резорбції, мозаїчні ділянки та лінії склеювання. Майже не зустрічаються анастомози між судинами енд-, мезо- і періостальної зон.

Таблиця 3. Морфометричні показники плечової та великогомілкової кістки білих щурів з експериментальним ОП

ВИСНОВКИ 1. Імобілізаційний ОП призводить до дисбалансу кальцієво-фосфорного метаболізму за рахунок зростання рівня кальцію з одночасним зниженням рівня фосфору в сироватці крові піддослідних тварин. **2.** Довготривала імобілізація веде до змін архітекτονіки діафізарно-епіфізарної зони трубчастих кісток та порушення кровопостачання кісткової тканини за рахунок зменшення кількості анастомозів між судинами енд-, мезо- і періостальної зон. **3.** Імобілізація є дисрегуляторним чинником відносно до імунної системи, що призводить до змін гуморальної ланки імунітету та зниження фагоцитарної активності лейкоцитів і диспропорційного зростання основних класів імуноглобулінів. **4.** Вищенаведені зміни виявляються на тлі активації перекисного окислення ліпідів та наростання ендотоксемії.

1. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию .- М.: Медицина, 1980.- 215с.
2. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов с тиобарбитуровой кислотой //Лаб. дело.-1981.- № 8.- С. 493-495.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови //Лаб. дело.- 1983.- № 3. С. 33-35.
4. Гриневич Ю.А., Алферов А.М. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных //Лаб. дело.- 1981.- №8.- С. 493-495.
5. Жулкевич І.В. Реконструкція кісткової тканини – погляд гематолога // Вісник наукових досліджень.- 1999.- № 1.- С. 12-16.
6. Жулкевич І.В., Білозецька-Сміян С.І., Дунец І.А., Шемет В.П. та співавт. Синдром зниження мінеральної щільності кісткової тканини та вторинний ревматоїдний синдром у хворих на гемофілію А //Здобутки клінічної та експериментальної медицини.- Тернопіль.- 1998.- С. 104-107.
7. Жулкевич І.В., Ковальчук О.Л. Дослідження структурно-функціонального стану кісткової тканини методом двофотонної рентгенівської абсорбціометрії // Шпитальна хірургія.- 1999.- № 2.- С. 124-129).
8. Жулкевич І.В., Корильчук Н.І. Гематологічні аспекти остеопорозу //Лікарська справа.- 1999. - № 2. - С. 12-17.
9. Коваленко В.Н., Головков Ю.Ж. //Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика, профілактика та лікування: Збірник матеріалів конференції.- Київ, 1997.
10. Короліой М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы //Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С.16-19.

11. Корочкин И.М., Чукаева И.И., Литвинова С.Н. Определение содержания средномолекулярных пептидов в крови больных острым инфарктом миокарда //Лаб. дело. - 1988. - № 9. - С.15-18.
12. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова.- Москва: Медицина. - 1987. - С. 368.
13. Масик О.М., Білозецька-Сміян С.І., Корильчук Н.І. та ін. Мінеральна щільність кісткової тканини у хворих на ревматичні захворювання суглобів //Лікарська справа.- 1999.- № 1. - С. 70-72.
14. Поворознюк В.В., Подрушняк Е.П., Орлов Е.В. и соавт. // Остеопороз на Украине // Киев. - 1995. - С. 64.
15. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике. - К.: Здоров'я.-1978.-158с.
16. Aging- and ovariectomy-related skeletal changes in spontaneously hypertensive rats.(Liang H., Ma Y., Pun S., Stimpel M., Jee W.S) // Anat. Rec.- 1997.- Oct.- 249:2.- p. 173-80.
17. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups //Arch. Biochem.-1959.-V.89. - P.70-77.
18. Johnell O. The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century//Am.J.Med.-1997.-8.-18. - p.20-25.
19. Kumeda Y., Inaba M., Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment—diabetes mellitus // / Nippon Rinsho.- 1998.- 56:6.-p. 1579-86.
20. Kundurovich Z., Hynjicevich M., Causevich A. The effects of gypcin cuff streess provocation on the level of Ca and the body weight in rats // Arch. Biol. Yugosl.-1989.-v.27.-№ 7.-P.79-80.
21. Nishizawa Y., Morii H. Osteoporosis and atherosclerosis in chronic renal failure.// Osteoporos Int, 1997, 7 Suppl 3:, S188-192.
22. Norimatsu H; Mori S; Kawanishi J; Kaji Y; Li J Immobilization as the pathogenesis of osteoporosis: experimental and clinical studies. //Osteoporos Int.- 1997.- № 7.- Suppl 3.-S. 57-62.
23. Scheidt-Nave C., Ziegler R., Raspe H. Epidemiology of osteoporosis// Med. Klin.- 1998.- Mar 15.-93.- Suppl 2.-p.7-11.
24. Sievjnen H., Kannus P., Jyrvinen T.L.N. Immobilization distorts allometry of rat femur: implications for disuse osteoporosis // Calcif. Tissue Int.-1997.- Apr, 60:4.- p. 387-390.
25. Taguchi Y., Gorai I, Secondary osteoporosis in gynecology// Nippon Rinsho.-1998.- 56:6.- p.1609-1612.
26. Zhang J., Yang W., Shen Z., Prevention of bone loss by chlorotrianisene in oophorectomized rats //Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih, 1997 Sep, 32:9, 535-7.