



УКРАЇНА

(19) UA (11) 11846 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ОСТЕОПОРОЗУ У НАЩАДКІВ

1

2

(21) u200506304

(22) 25.06.2005

(24) 16.01.2006

(46) 16.01.2006, Бюл. № 1, 2006 р.

(72) Сергієнко Лоріанна Юріївна, Геращенко Ганна
Володимирівна, Черевко Ганна Миколаївна, Бон-
даренко Тетяна Вікторівна, Картавцева Оксана
Володимирівна

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ
ПАТОЛОГІЇ ІМ.В.Я.ДАНИЛЕВСЬКОГО АМН
УКРАЇНИ

(57) Спосіб експериментального моделювання
остеопорозу у нащадків шляхом формування сис-
темних порушень, який **відрізняється** тим, що
вагітну самицю з 2 по 8 день вагітності піддають дії
соціально-емоційного стресу, після чого у 10-
місячних нащадків відтворюють іммобілізаційний
стрес протягом 7 днів по 1 годині на добу.

Корисна модель відноситься до медицини і
може бути використана для вивчення механізмів
розвитку остеопоротичних уражень в
експериментальній остеології, ендокринології,
патофізіології.

У зв'язку з надзвичайно широкою
розповсюдженістю остеопорозу серед населення
більшості країн світу, тяжкості наслідків та вели-
чезних економічних збитків, які надає дана
патологія, масив наукових досліджень, спрямова-
них на вивчення патогенетичних механізмів втрати
кісткової маси та визначення фармакологічної
ефективності нових лікарських засобів з антиос-
теопоротичними властивостями, постійно
розширюється.

На теперішній час застосовується цілий
перелік експериментальних моделей остеопорозу,
спрямованих на відтворення тієї чи іншої форми
захворювання або окремих патогенетичних
механізмів його виникнення.

Так, локальний остеопороз найчастіше
відтворюється шляхом порушення кровообігу в
кінцівках при жорсткій іммобілізації [1, 2, 3] або
тривалій нерухомості [4, 5]. Локальний остеопороз
формується також шляхом експериментальних
переломів, опіків, відморожень, перетинання вели-
ких нервових волокон, таке інше.

Як модель сенільного остеопорозу
(генералізований тип, інволюційна форма) вивча-
ють природний остеопороз на довгоживучих тва-
ринах - вівці, корови, мавпи та інші [6], або на

імбредній лінії прискорено старіючих мишей SAM/I,
спеціально створеній японськими дослідниками
[7].

Численна група експериментальних моделей
базується на відтворенні ведучих гормональних
механізмів розвитку остеопорозу. Так, враховуючи
катаболічну дію на кісткову тканину
кортикостероїдів, широко застосовується введення
різним експериментальним тваринам
глюкокортикоїдів [8]. Прискорення втрати кісткової
маси стимулюють також шляхом моделювання
гіперпаратиреозу [9], введенням соматотропного
гормону, глюкагону, екстрактів гіпофізу та інш.

Серед моделей остеопорозу та остеопенії,
пов'язаних з дією на кістки патологічних чинників
навколишнього середовища, слід відзначити так
звані аліментарні моделі, спрямовані на зменшен-
ня надходження до організму кальція з їжею [10],
хімічні моделі, котрі базуються на застосуванні
хімічних речовин-деструкторів кісткової тканини
або на інгібування метаболізму в ній [11], проме-
неву модель остеопоротичних уражень внаслідок
дії як зовнішнього, так і внутрішнього джерела
радіаційного опромінення [12] або впливу
електромагнітних полів високої частоти [13].

В останні роки широко застосовуються
комбіновані моделі остеопорозу, тобто такі, при
яких для створення патологічного процесу в
кістках використовують комбінації патогенетичних
чинників, наприклад, гіпокінезію і операційну трав-
му, нітрити, нітрати та гіпер- і гіпокінезію [14, 15] і

(13) U
11846
(11)
(19) UA

таке інше.

Разом з тим, питання про розробку нових моделей остеопоротичних уражень лишається актуальним, оскільки усі вказані моделі мають певні моменти, котрі утруднюють їх відтворення та застосування.

Особливо широкого застосування набула модель післякастраційного системного остеопорозу, який формується за рахунок дефіциту естрогенів в організмі оварієктомованих самиць як дрібних (миші, щури), так і великих тварин (свині, вівці, мавпи). Вважається, що саме оварієктомія 13-місячних щурів викликає такі зміни в кістковій системі тварин, які найбільш повно відповідають процесам післяменопаузальної перебудови кісток у жінок [15].

Недоліком цієї моделі є, перш за все, необхідність у оперативному втручанні. Останнє потребує певних навичок з боку експериментаторів, призводить до загибелі значного відсотку тварин внаслідок операції, різко змінює гомеостатичні відносини в організмі, і, взагалі, при створенні такої моделі відбувається надприродне одномоментне та різке позбавлення організму самиці жіночих статевих гормонів. Зрозуміло, що ця модель не може бути застосована для вивчення особливостей розвитку остеопатологій та оцінки ефективності остеокорегуючих фармакологічних засобів в чоловічому організмі.

Задача корисної моделі полягає у розробці способу експериментального моделювання остеопорозу у нащадків, при якому формується остеопоротичний процес, котрий за своїми гормонально-метаболічними та структурно-біохімічними характеристиками найбільше наближається до ендокринного остеопорозу.

Поставлена задача вирішується тим, що для формування остеопоротичних системних порушень у нащадків вагітну самицю з 2 по 8 день вагітності піддають дії соціально-емоційного стресу, після чого у 10-місячних нащадків відтворюють іммобілізаційний стрес протягом 7 днів по 1 годині на добу.

Технічний результат - розширення арсеналу експериментальних моделей остеопорозу, які дозволяють відтворити природний процес виникнення ендокринного остеопорозу, як в жіночому, так і в чоловічому організмі.

Для отримання таких стресованих нащадків вагітну самицю поміщають на 12 годин світлової частини доби до клітки, де знаходяться 10-15 статевозрілих невагітних самиць. Решту доби вагітна самиця для відпочинку перебуває у окремій клітці. Таке "занурення" у незнайомий соціум проводять протягом 7 днів, з 2 по 8 день вагітності. Склад оточення при цьому кожного разу змінюють. Щурята народжуються природним шляхом та утримуються в рекомендованих для цих тварин умовах до 10 місяців.

По досягненні вказаного віку тварин піддають дії стресу іммобілізації шляхом фіксації на спині протягом однієї години. Фіксацію проводять 7 днів поспіль. Через добу після останнього експерименту проводять забій тварин з наступним вилученням хребців грудного та поперекового відділів та

стегнових кісток, а також збирають кров для визначення гормонів і метаболічних показників. Кістки фіксують у формаліні, декальцинують та заливають у парафін. Серійні зрізи фарбують гематоксилін-еозином.

Застосувавши світловий мікроскоп, можна пересвідчитися, що в тілах хребців та в проксимальних відділах трубчастих кісток мають місце численні вогнища остеопоротичного ураження, по кількості та розмірам яких оцінюють виразність остеопорозу. Показники кісткового обміну та гормонального стану наведені у таблиці. Проаналізувавши представлені дані можна зробити висновок, що особливості коливань показників мінерального обміну та концентрації стероїдних гормонів у нащадків стресованих матерів після проведення іммобілізації вказують на наявність реактивного гіперкортицизму, андроген-естрогенної недостатності, гіперфосфат- та гіпермагніємії у цих тварин. Виразне зниження вмісту оксипроліну та тирозину в кістковій тканині тварин із групи стресованих нащадків "контроль 2" (як самців, так і самиць), у порівнянні з інтактними нащадками вказує на наявність змін метаболічно-синтетичних процесів в кістковій тканині цих тварин.

Приклад 1. Об'єкт дослідження - щур sameць популяції Вістар, вік 10 місяців, народжений природним шляхом від стресованої матері. Після досягнення 10-місячного віку, щура піддавали впливу стресу іммобілізації, для чого тварину фіксували на спині продовж години, 7 днів поспіль. Утримання, відтворення стресу іммобілізації та знеживлення проводилося з дотриманням встановлених правил [16].

Визначення рівня статевих гормонів показало, що концентрація тестостерону вірогідно зменшена порівняно з контролем (3,38 ммоль/л;

контроль - $10,81 \text{ ммоль/л} \pm 1,62$, $P < 0,05$), а концентрація естрадіолу знаходиться на нижній межі норми. Рівень кортикостерону підвищений у 3,5 рази ($P < 0,05$). Рівень загального та іонізованого кальцію в крові без змін по відношенню до контролю, фосфору - підвищений ($2,6 \text{ ммоль/л}$; контроль - $1,22 \pm 0,13 \text{ ммоль/л}$, $P < 0,05$), рівень кальцитоніну в плазмі крові підвищений ($16,34 \text{ нмоль/л}$; контроль - $13,34 \pm 1,02 \text{ нмоль/л}$, $P < 0,05$).

Мікроскопія хребців показала, що в трьох з п'яти обстежених поперекових хребців була значно зменшена товщина коркового шару (на 30-40 %), а в губчастій речовині товщина балочок та густина їх переплетення значно зменшені. Балочки часто мали вигляд тонких обірваних „спиць" або ниточок. Залишки балочок прикріплені до коркового шару, а в центральній частині тіла хребців простори між балочками дуже широкі; там, де вони зливаються між собою, утворюються великі порожнини. Взагалі тіла хребців мають вигляд тонкого та пошматованого мережива. Така структура однозначно вказує на остеопоротичні ураження хребців.

Дуже схожа картина спостерігається в епіфізах стегнових кісток даної тварини - балочки розріджені, дуже тонкі, різної довжини (часто короткі, ніби зламані); отвори між ними розширені,

зливаються в великі порожнини. В діафізарних частинах стегнових кісток (в періостальних ділянках коркового шару кістки) спостерігаються порушення будови пластинчастої кістки за рахунок вrostання з боку періосту великої кількості капілярів, котрі супроводжуються скупченнями остеокластів та остеобластів. Навколо кровоносних судин спостерігається формування різної форми порожнин, остеони руйнуються, ремодельована кістка має форму неправильно орієнтованих пластин, між якими проходять різної форми, розмірів та орієнтації отвори. В субендостальних ділянках діафізу стегна зберігає свою звичайну будову.

Висновок. У 10-місячного самця щура популяції Вістар - нащадка стресованої матері, котрий переніс стрес іммобілізації, в тілах хребців поперекового відділу та в стегнових кістках спостерігаються численні вогнища трабекулярної та субперіостальної резорбції кісткової тканини, що свідчить про остеопороз у цієї тварини.

Приклад 2. Об'єкт дослідження -10-місячна самиця щур популяції Вістар, народжена природним шляхом від стресованої матері. Умови утримання, проведення стресу іммобілізації та неживлення аналогічні раніше описаному прикладу.

Визначення рівня статевих гормонів показало, що концентрація естрадіолу вірогідно зменшена порівняно з відповідними показниками нащадків інтактних матерів (0,70 ммоль/л; контроль $0,92 \pm 0,04$ ммоль/л, $P < 0,05$, табл. 1), а рівень тестостерону дещо підвищений ($P = 0,05$). При незмінному рівні загального та іонізованого кальцію в плазмі крові, підвищеному показнику фосфору ($P < 0,05$), концентрація кальцитоніну в крові виразно збільшена у порівнянні з самицями - нащадками інтактних матерів (29,90 нмоль/л; контроль - $24,06 \pm 0,98$, $P < 0,05$) і вища показників самців піддослідної групи ($P < 0,05$); рівень кортикостерону сягає 2510,60 ммоль/л, що значно перевищує показники самиць інтактної групи.

Гістологічне вивчення хребців поперекового та грудного відділів хребта показало, що в трьох з п'яти хребців поперекового відділу, трьох хребців грудного відділу та в епіфізах стегнових кісток мають місце типові ознаки трабекулярної резорбції кісткової тканини. В діафізах стегнових кісток спостерігаються численні вогнища інтракортикальної резорбції, які пронизують кістку від періосту до ендосту. При цьому за рахунок великої кількості порожнин різної форми та розмірів, сформованих навколо кровоносних судин, кісткова тканина має вигляд спіненості („спонгізування“) або мережива. Кістка в даних місцях повністю втрачає звичайну будову та щільність. Кількість таких вогнищ в стегнових кістках даної самиці значно більша (в 5 разів на одиницю площі зрізу); при цьому остеопоротичне ураження формується за рахунок як трабекулярної, так і інтракортикальної резорбції.

Висновок. У 10-місячної самиці - нащадка стресованої матері після стресу іммобілізації має місце остеопороз за рахунок одночасної трабекулярної та інтракортикальної резорбції кісток скелету, тобто остеопороз післяменопаузального типу.

Таким чином, спосіб, що пропонується, дозволяє змодельовати остеопоротичні ураження як в чоловічому, так і в жіночому організмі та відтворити природний процес виникнення остеопорозу.

Спосіб достатньо простий, може бути відтворений у будь-якій науково-дослідній установі, де проводиться вивчення всіляких аспектів розвитку остеопоротичних уражень, їх профілактики та лікування.

Література:

1. Messungen des Vineralsatzgehaltes am Kalkaneus im Veslauf von Fraktureilungen der unteren Extremitäten / Frey K.W., Rohloff R., Bruckner W.L. et al. // *Munchener Ved. Wochenschr.* - 1979. - V. 121. - P. 885-886.

2. Бур'янов О. А. Патогенетична роль екологічних факторів різної природи у виникненні остеопорозу // *Збірник метріалів І Української науково-практичної конференції „Остеопороз“* 5-6 груд. 1995 р. - К., 1995.-С.14-15.

3. Ketoprofen lysine salt inhibits disuse-induced osteopenia in a new non-traumatic immobilization model in the rat / Fiorentino S., Melillo G., Fedele G. et al. // *Pharmacol. Res.* - 1996. - V. 33, N 4-5. - P. 227-281.

4. Architectural modifications and cellular response during disuse-related bone loss in calcaneus of the sheep / Thomas T., Vico L., Skerry T. M. et al. // *J. Appl. Physiol.* - 1996. - V.80, N 1. - P.198-202.

5. Welch R. D., Ashman R. B., Baker K. J., Browne R. H. Intraosseous infusion of prostaglandin E₂ prevents disuse-induced bone loss in the tibia // *J. Orthop. Res.* - 1996. - V.14, N 2. - P.303-310.

6. Riord J. L., Kocabaglı N., Spichiger U. E., Wanner M. Postparturient hypocalcemia of dairy cows: a model for the study of the interdependence of Ca, Pi and Mg homeostasis // *Bone*. - 1995. - V. 17 (4 Suppl.) P. 429-434.

7. Immune abnormality in relation to nonimmune diseases in SAM mice / Hosono M., Hanada K., Toichi T. et al. // *Exp. Gerontol.* - 1997. - V. 32, N 1-2. - P. 181-195.

8. Спужак М. И., Шармазова Е. П., Панков Е. Я. Патогистологическое исследование костей кроликов приэкспериментальной гипертиреоидной остеодистрофии // *Проблеми ендокринної патології*. - 2005.-№1, С. 87-94.

9. Рожнятовская А. Л., Барчин В. М. Алиментарный фактор и состояние костной ткани // *Актуальные проблемы артровертебрологии*. - К., 1994. -С. 55-56.

10. Alteration of quantitative and qualitative parameters of bone following inflammation mediated osteopenia in rats / Michailidis A. E., Sdrenias H., Kavadias K. et al. // *Osteoporosis Int.* - 1998. - V. 8, Suppl. 3. - P. 88.

11. Малые дозы ионизирующей радиации как фактор риска развития семейного остеопороза / Родионова С. С., Швец В. Н., Ильина В. К. и др. // *Вести. Травматологии и ортопедии*. - 1995. - № 2. - С. 21-26.

12. Лузин В. И. Влияние электромагнитного излучения крайне высокой частоты на строение костей крыс старческого возраста // *Остеопороз: епідеміологія, клініка, діагностика*,

профілактика і лікування: 36. матеріалів конф. - 1997. - С.65-68.

13. Сницарук Л. И. Модель експериментально-го остеопороза // Актуальные проблемы артровертебрологии. - К., 1994. - С.57-59.

14. Ковешніков В. Г., Піка-люк В. С., Не-доступ М. Ф. Вікові особливості остеогенезу під впливом екзогенних факторів різної етіології // П Національний конгрес геронтологів і геріатрів

України, 4-6 жовт. 1994 р.: Тез.доп. - К., 1994. - С.320.

15. Mosekilde L., Danitlsen C. C., Knudsen U. B. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biochemical properties of mature rats//Bone.-1993.-V. 14, N1.-P. 1-6. . 16. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. -2003.-Т. 8, №1.-С. 142-145.

Таблиця 1.

Показники кісткового обміну та гормонального статусу у щурів - нащадків інтактних та стресованих матерів (n = 12, M ± m)

Групи	Са заг. ммоль/л	Са іонізов.ммоль/л	Рммоль/л	Mg ммоль/л	Оксипро- лін мг/г сухої тканини	Тирозин мг/г сухої тканини	Кальци- тонін нмоль/л	Тсммоль/л	Е2ммоль/л	Кортико- стерон ммоль/л
Самці										
Нащадки інтактних матерів (кон-троль 1)	2,25 ± 0,11	1,02 ± 0,02	1,22 ± 0,13	0,76 ± 0,04	16,43 ± 0,24	1,02 ± 0,05	13,34 ± 1,02	10,82 ± 1,62	0,63 ± 0,02	650,70 ± 21,22
Нащадки стресованих матерів без іммобілізації (контроль 2)	2,18 ± 0,07	0,98 ± 0,03	1,43 ± 0,09	0,09 ± 0,02	14,44 ± 0,24	1,15 ± 0,03	14,25 ± 0,75	5,81 ± 0,64	0,24 ± 0,03	2100,00 ± 50,70
Нащадки стресованих матерів після іммобілізації (дослід)	2,20 ± 0,10	0,98 ± 0,06	2,43 ± 0,09	1,07 ± 0,07	12,86 ± 0,45	0,82 ± 0,06	17,25 ± 0,75	3,41 ± 0,44	0,43 ± 0,02	2300,80 ± 64,21
Самиці										
Нащадки інтактних матерів (кон-троль 1)	2,23 ± 0,14	1,03 ± 0,04	1,14 ± 0,04	0,78 ± 0,04	14,39 ± 0,23	1,35 ± 0,03	24,06 ± 0,98	1,33 ± 0,07	0,92 ± 0,04	710,24 ± 56,20
Нащадки стресованих матерів без іммобілізації (контроль 2)	2,22 ± 0,05	0,96 ± 0,08	1,16 ± 0,05	0,76 ± 0,10	13,52 ± 0,66	1,29 ± 0,06	31,20 ± 1,60	1,29 ± 0,06	0,83 ± 0,01	2115,75 ± 34,78
Нащадки стресованих матерів після іммобілізації (дослід)	2,42 ± 0,08	1,02 ± 0,06	2,13 0,50	0,98 ± 0,10	11,04 ± 0,30	0,76 ± 0,03	31,6 ± 2,40	1,46 ± 0,03	0,74 ± 0,01	3000,09 ± 38,88