

ВПЛИВ МЕХАНІЧНИХ СТИМУЛІВ ТА ЗОЛЕДРОНОВОЇ КИСЛОТИ НА МОРФОЛОГІЧНУ СТРУКТУРУ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЗА УМОВИ МОДЕЛЮВАННЯ ОЖИРІННЯ ТА ОБМЕЖЕНОЇ РУХОМОСТІ У ЩУРІВ

Н.М. Костишин¹, І.В. Лопатенко¹, Р.Я. Серкіз², М.І. Жила³

¹ Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна

² Львівський національний університет імені Івана Франка, м. Львів, Україна

³ Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені Степана Гжицького, м. Львів, Україна

Ключові слова:

ремоделювання кістки, мінеральна щільність кістки, остеопороз, скануюча електронна мікроскопія, гістологія кістки.

Буковинський медичний вісник. 2022. Т. 26, № 4 (104). С. 9-16.

DOI: 10.24061/2413-0737.XXVI.4.104.2022.2

E-mail:

kostyshyn.nm@gmail.com

Мета роботи – дослідження довгострокового впливу механічних стимулів та бісфосфонату - золедронової кислоти на морфологічну структуру та мінеральну щільність стегнової кістки у щурів.

Матеріал і методи. Щурів розподіляли на контрольну та три дослідні групи: I група – висококалорійна дієта + обмежена рухомість (ВКД + ОР), II група – ВКД + ОР + загальна вібрація (50 Гц, 3 м/с²), III група – ВКД + ОР + введення золедронової кислоти (ВКД + ОР + Зол., у дозі 0,025 мг/кг). Проводили визначення мінеральної щільності кісткової тканини, скануюча електронна мікроскопія трабекул та імуногістологічне дослідження.

Результати. Застосування моделі висококалорійної дієти з обмеженою рухомістю призводить до втрати мінерального компонента трабекул до 16,2%, а трабекулярний шар стонювався до 13,9% до групи контролю, розширювалися міжтрабекулярні проміжки. Під впливом загальної вібрації спостерігалось зростання МЩКТ у стегні до групи ВКД + ОР, а щільність кісткової тканини зберігається на рівні контролю до 16-го тижня експерименту. У групі III зростала швидкість формування кістки, показник об'єму кістки до об'єму трабекул були значно вищими порівняно з групою ВКД + ОР, починаючи через 8 тижнів на 8,1% і на 13% наприкінці експерименту відповідно.

Висновки. Висококалорійна дієта з обмеженою рухомістю знижує мінеральну щільність трабекул стегнової кістки. Золедронічна кислота ефективно покращує мінералізацію, проте призводить до порушення морфології пластинки росту кістки. Результати досліджень вказують на те, що ЗВ може бути ефективним нефармакологічним методом підтримки стану кістки в молодих осіб.

INFLUENCE OF MECHANICAL STIMULI AND ZOLEDRONIC ACID ON THE FEMORAL MORFOLOGY IN RATS WITH OBESITY AND LIMITED MOBILITY MODELS

N.M. Kostyshyn, I.V. Lopatenko, R.J. Serkiz, M.I. Zhyla

Key words: bone remodeling, bone mineral density, osteoporosis, scanning electron microscopy, bone histology.

Bukovinian Medical Herald.

2022. V. 26, № 4 (104). P. 9-16.

The aim. Investigate the long-term effect of WBV and bisphosphonate (zoledronic acid) on the morphological structure and mineral density of the rat femora.

Materials and methods. Rats were divided into control and three experimental groups: I - experimental group - high-calorie diet + limited mobility (HCD + LM), II - experimental group - HCD + LM + whole body vibration (WBV 3 m/s²). III - experimental group - HCD + LM + administration of zoledronic acid (HCD + LM + Zol. at a dose of 0.025 mg / kg). Bone mineral density determination, scanning electron microscopy of trabecular meshwork and immunohistological examination were performed.

Results. The application of the model of a high-calorie diet with limited mobility leads to the loss of the mineral component of trabeculae up to 16.2%. The trabecular layer thinned to 13.9% compared to the control group, and the intertrabecular spaces expanded. Under the influence of whole-body vibration, there was an increase in BMD in the femora compared to the group HCD + LM, and bone density remained at the control level until the 16th week of the experiment. In group III, the rate of bone formation increased, the ratio of bone to trabecular volume was significantly higher

Оригінальні дослідження

compared to the group HCD + LM. Starting from the 8th week, it increased by 8.1% and 13% at the end of the experiment, respectively.

Conclusions. *A high-calorie diet with limited mobility reduces the mineral density of the trabeculae in the femoral bone. Zoledronic acid effectively improves mineralization but leads to impairment of the morphology of the bone growth plate. The research results indicate that WBV can be an effective non-pharmacological method of maintaining bone health in young people.*

Вступ. Вважається, що механічне навантаження позитивно впливає на мінеральну щільність кісткової тканини (МЩКТ) у дорослих людей, стимулюючи при цьому ремоделювання кістки [1, 2]. Однак вплив ожиріння на молодому та зрілому віці, а також збільшене навантаження на скелет вимагає подальшої діагностики, оскільки існує зворотна залежність між збільшенням індексу маси тіла та мінеральною щільністю кісткової тканин [3]. У дослідженнях наводяться приклади вживання висококалорійної дієти та/або цукру як одного із факторів, що сприяє ожирінню, подібним чином і малорухомий спосіб життя призводить до ожиріння також [4,5]. Низка досліджень вказують на зміну структурних властивостей кісток, спричинених особливостями харчування та малорухливим способом життя як у дослідних тварин, так і в людей. Поряд зі зниженням МЩКТ, зменшенням міцності кісток та несприятливими мікроархітектурними змінами в кістці, що найчастіше відбуваються у трабекулярному шарі, прогресують з часом. У зв'язку з наведеним, дослідження мінеральної щільності кістки має важливе значення для прогнозування виникнення остеопоротичних переломів, а її мінеральної маси - як предиктора ризику переломів. Проте важливим для оцінки стану є не тільки дослідження мінерального компонента, що визначає міцність кістки, а й білків матриксу, на яких нашарований кристалічний компонент, зокрема гідроксіапатит [6, 7].

Згідно зі статистичними даними, частим місцем остеопоротичних переломів є шийка стегнової кістки та поперековий відділ хребта. Проте в літературі є недостатньо досліджень, які б характеризували стан дистальної частини стегнової кістки, де швидкість метаболізму є вищою, що підтверджено імунною реакцією клітин [8,9]. У дослідженні нашою метою було порівняти вплив загальної вібрації (ЗВ) та золедронові кислоти (Зол.) на ремоделювання кісткової тканини та мінеральну щільність стегна статевозрілих щурів, яким давали висококалорійну дієту за умови обмеженої рухомості. Результати досліджень ми порівнювали з даними, що отримували під впливом бісфосфонату - золедронові кислоти, який часто використовується в клінічній практиці.

Оскільки застосування золедронові кислоти має певні обмеження та протипоказання, зокрема непереносимість шлунково-кишкового тракту, нефротоксичність та навіть остеонекроз, необхідно було запропонувати і нефармакологічні методи, які б могли доповнювати вже існуючі фармакологічні схеми [10,11]. Відомо також, що застосування золедронові кислоти пригнічує резорбцію, тим самим дозволяючи відновлювати/зберігати форму та мінеральну структуру стегнової кістки [12, 13]. Щоб перевірити цю гіпотезу, ми

застосували модель впливу вібрація та бісфосфонат – золедронові кислота.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проводили на 54 самцях щурів Вістар віком 2 місяці, масою 180-200 г. Усі експерименти проведено з дотриманням біоетичних принципів відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях, Звіт комісії з етики №10, 16.12.2019, ЛНМУ ім. Данила Галицького. Щурів утримували протягом 16 тижнів при постійному 12-годинному циклі світла і темряви та температурі навколишнього середовища 21-23°C з відносною вологістю 50 ± 10%. Усіх тварин утримували в клітках з піднятим дном для запобігання копрофагії та розподілили на три групи по 18 щурів у кожній: контрольна група – стандартні умови віварію, I експериментальна група – висококалорійна дієта + обмежена рухливість (ВКД + ОР), II експериментальна група - ВКД + ОР + Загальна вібрація (ВКД + ОР + ЗВ), III дослідна група – ВКД + ОР + ін'єкція золедронові кислоти (ВКД + ОР + Зол.).

Для моделювання обмеженої рухомості використана модель зі зменшенням об'єму клітки, в якому простір клітки (2150, Tecniplast, Buguggiate, Італія) обмежений розміром 12 × 12 × 8 см, що становило 20% від стандартного об'єму клітки [5]. Висококалорійна дієта зі згущеним молоком із високим вмістом жиру (D12266B, Research Diets, New Brunswick, NJ) має енергетичну щільність 4,41 ккал/г, при цьому 51,4%, 31,8% та 16,8% енергії надходить із вуглеводів (з яких на 50% складається із сахарози), жиру та білка, відповідно, використовувався для індукування ожиріння у щурів. Усіх піддослідних щурів зважували кожні 4 тижні.

Вертикальні вібраційні коливання моделювали за допомогою вібростола потужністю 250 Вт з максимальним тиском 7 бар, частотою 50 Гц, та віброприскоренням 3 м/с². Золедронові кислоту вводили в терапевтичній дозі дозі 0,025 мг/кг (0,1 мл ZOLTA® + 0,9 мл, 0,9% NaCl) внутрішньом'язово (чотириголовий м'яз стегна), кожні 28 днів, починаючи з 4-го дослідження, до 16-го тижня (загалом 3 дози) [12]. Щурам контрольної групи підшкірно вводили 0,3 мл фізіологічного розчину 0,9% NaCl. Евтаназію тварин проводили після 8-го та 16-го тижня (по шість тварин з кожної групи), шляхом декапітації під загальною внутрішньочеревною анестезією в дозі 0,3 г/кг.

Дослідження мінеральної щільності кісткової тканини трабекулярного шару стегнової кістки у щурів проводили методом комп'ютерної томографії з кількісною денситометрією [14]. Обстеження виконували на комп'ютерному томографі Toshiba TSX-

101 A, Aquilion 16, 2004 р. (Toshiba Medical Systems Corporation, Японія). Датчик з товщиною зрізу 0,5 мм, 120.0 kV, 50 mA. Обробка даних з використанням програми IQ view-3D, 3D post-processing workstation, certification CE 0482 and FDA 510 (k), London, United Kingdom на операційній платформі Windows 7 Professional SP 1, 32 bit (Microsoft, USA, 2009).

Морфологічний аналіз зразків проводили за допомогою скануючого електронного мікроскопа з мікроаналізатором (РЕММА-102-02, СЕЛІМІ Україна). Для проведення дослідження зразків фрагментів (зламів) кісткової тканини проводили графітне напильня. Відстань від лінзи мікроскопа до зразка становила від 17,1 мм до 21,7 мм. Напруга прискорювача була в межах від 20 до 40 eV [15, 16]. Морфологічний аналіз дистального відділу стегнової кістки проводили за допомогою скануючої електронної мікроскопії із псевдоколірною технікою.

Очищені від м'язової тканини та підготовлені фрагменти стегнової кістки піддослідних щурів, після фіксації, декальцинували розчином Rapid decalcifier kaltek s.r.l. Зрізи тканин товщиною 7 мкм забарвлювали стандартними розчинами гематоксиліну та еозину. Опис фіксованих на предметному склі гістологічних препаратів проводили на мікроскопі – OLYMPUS CX41.

Для імуногістохімії антитіла розводили в Diamond antibody diluent (Cell Marque Corp., Rocklin, CA, USA) і використовували некон'юговані поліклональні антитіла до кісткового морфогенетичного білка 2 (Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), St John's Laboratory - stj114653), відношення 1:200. Інтенсивність імунної реакції вимірювали шляхом визначення відсотка клітин із позитивною відповіддю та кількісного порівняння середньої інтенсивності пікселів на мікрофотографіях, які спочатку були перетворені в негативи 8-біт цифрові зображення сірої шкали від 0 (білий піксель) до 255 (чорний піксель), що свідчило про інтенсивність імуногістохімічної реакції [9]. Інтенсивність імунної реакції вимірювали в шести випадково вибраних ділянках хряща пластинки росту і шести випадково вибраних ділянках позитивного сигналу в суглобовому хрящі. Усі аналізи проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ (Fiji) software 1.53c [17].

Статистичний аналіз даних виконано у програмі StatSoft STATISTICA 8.0.360. У пакеті STATISTICA порівняння двох середніх вибірок нормально розподілених ознак (t-критерій Ст'юдента) реалізовано в модулі *Basic Statistics/Tables*. Розмір вибірки $n = 6$ має чутливість більше 80% для виявлення зміни, на 6% об'ємної частки кістки, 11% трабекулярного простору та 7% трабекулярної товщини за умови 5% рівня значимості. Для всіх показників встановлено значення $p < 0,05$ як статистично значуще. Усі дані представлені як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення.

Результати дослідження та їх обговорення. На початку експерименту середня маса тіла щурів та індекс Lee становили 184 г (0,27), 187 г (0,28), 189 г (0,28) та 190 г (0,28) та в контрольній групі, ВКД+ОР, ВКД+ОР+ЗВ та ВКД+ОР+Зол. відповідно ($p > 0,05$), що вказує на те, що у щурів усіх груп ожиріння не виявлено (індекс Lee $< 0,3$).

Після восьми тижнів висококалорійної дієти усі щури набирали вагу з однаковою швидкістю (середня маса тіла становила 259 г, 279 г, 284 г і 293 г у контрольній групі, ВКД+ОР, ВКД+ОР+ЗВ та ВКД+ОР+Зол. відповідно; $p > 0,05$) та індекс Лі вказували на появу ожиріння в усіх трьох дослідних групах (0,304, 0,307, 0,31; $P > 0,05$). Наприкінці 16-го тижня дослідження ожиріння у щурів дослідних груп зберігалось (0,308, 0,31 і 0,31 у ВКД+ОР, ВКД+ОР+ЗВ та ВКД+ОР+Зол. групах відповідно), але не спостерігалось різниці між групами ($p < 0,05$).

На рисунку 1 представлені кількісні характеристики МЩКТ у дослідних зразках стегнової кістки. У контрольній групі в трабекулярному шарі не спостерігалось ніяких патологічних змін, проте прослідковувалась незначна тенденція зростання МЩКТ до 16-го тижня. На 8-й тиждень експерименту зниження МЩКТ у зразках I дослідної групи, порівняно до групи контролю, також не спостерігалось. У II дослідній групі цей показник також залишався без змін. А на 16-й тиждень спостережень мінеральна маса кістки зменшувалась в I дослідній групі на 8,1% ($p > 0,05$). Механічні коливання підвищували мінеральну щільність на 16-ту добу на 6,0% ($p > 0,05$) відносно групи I (ВКД + ОР). На 16-й тиждень у групі III (ВКД + ОР + Зол.) спостерігалось статистично не значиме зростання мінеральної щільності на 6,5% ($p > 0,05$) до контролю та до 15,9% ($p < 0,05$) до I дослідної групи (ВКД + ОР). У щурів на 16-й тиждень спостерігався незначний ефект від вібрації, мінеральна щільність знижувалась відносно контролю, проте перевищувала значення групи I. У групі III з додатковим використанням бісфосфонатом зростав МЩКТ до 6,0% ($p > 0,05$) до контролю та на 23,2% ($p < 0,05$) відносно групи щурів з ожирінням та обмеженою рухомістю (рис. 1).

Зрізи стегнової кістки у щурів контрольної групи показали нормальний вигляд кісткової кори та трабекул із нормальною мінералізацією, які були розділені елементами кісткового мозку. Зрізи кісток у щурів з ожирінням та обмеженою рухомістю характеризуються остеопоротичними змінами і показують потовщення кісткового кортикального шару, що пов'язане з відокремленими кістковими трабекулами та елементами кісткового мозку. Слід зауважити, що трабекулярний шар стоншувався до 13,9% до групи контролю та розширювалися міжтрабекулярні проміжки (рис. 2). У стегнових кістках щурів із групи вібрації прослідковувалось характерне сповільнення процесу стоншення кісткових трабекул (рис. 3). На 16-й тиждень цей показник зріс на 11,6% відповідно значень до групи ВКД + ОР. Мікроскопічна структура дистального фрагмента стегнових кісток групи III (ВКД + ОР + Зол.) характеризується добре сформованими кістковими трабекулами збільшеної товщини на 22,2% ($p < 0,05$) до групи контролю та 41,9% ($p < 0,05$) до групи ВКД + ОР (рис. 3 та рис. 4), а також мінералізацією зі з'єднаними трабекулами, розділеними елементами кісткового мозку. Світлові мікрофотографії пластин росту в щурів з ожирінням і обмеженою рухомістю та тварин, що

Оригінальні дослідження

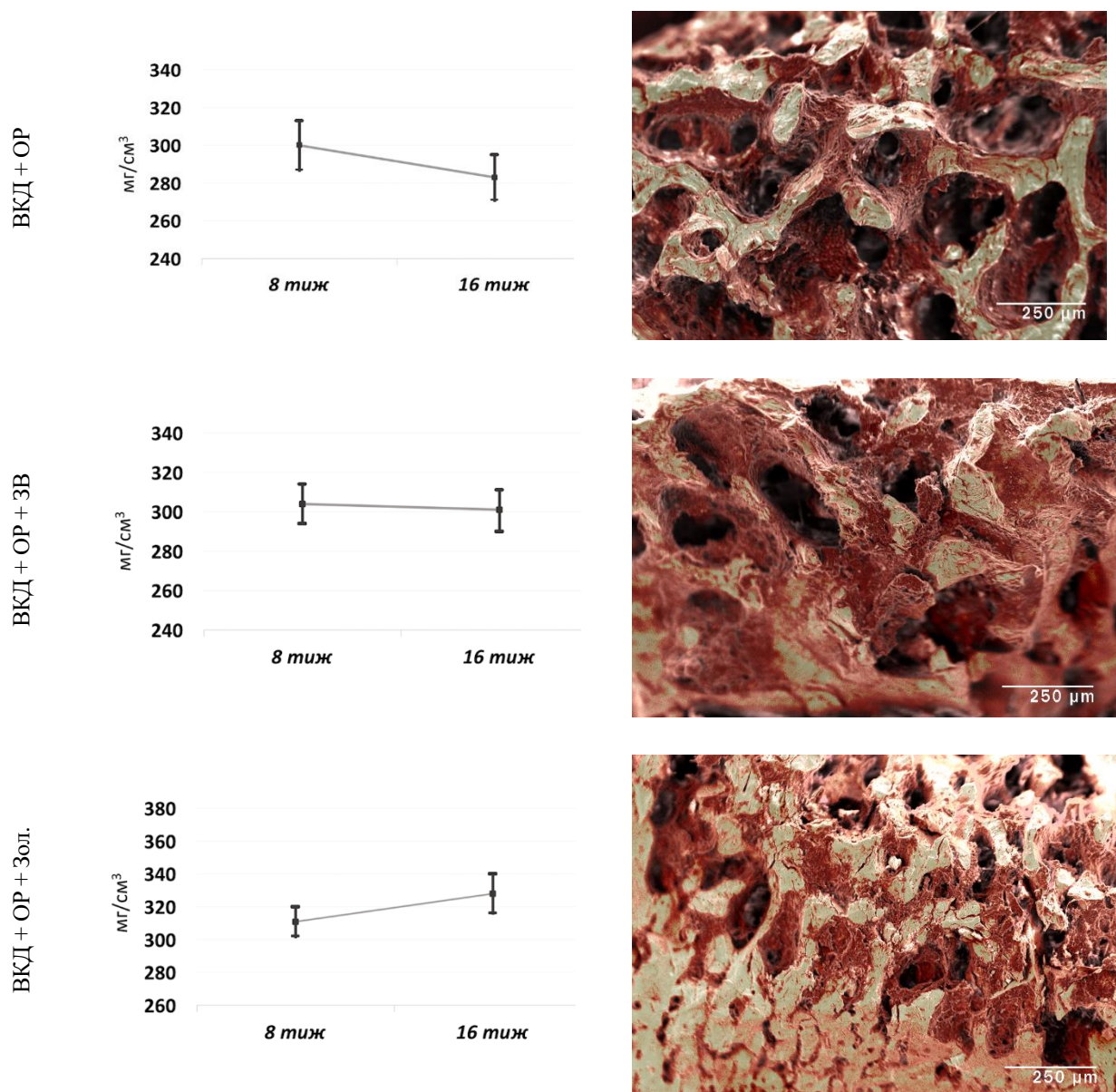


Рис. 1. Мінеральна щільність стегна, $\text{мг}/\text{см}^3$ (А) та псевдокольорові скануючі електронні мікрофотографії (Б).

Встановлено достатню мінералізацію кісткових трабекул щурів з ожирінням, обмеженою рухомістю та додатковим використанням вібрації. Збільшення $\times 100$ показує чисельні кісткові трабекули в контрольних зразках, тоді як група, де використовувалася ВКД + ОР + Зол. демонструє товсті та довгі трабекули, які залишають кілька вузьких проміжків. Навпаки, зразки кісток у щурів I дослідної групи (ВКД + ОР) мають стоншені трабекули та ширші кісткові простори. Масштабна смуга = 250 мкм

отримувала загальну вібрацію, зона спокою, зона проліферації, зона гіпертрофії та зона окостеніння мають подібну організацію. У щурів, з ВКД + ОР + Зол., у трьох зонах, окрім зони окостеніння, пластини росту дезорганізовані і незначно стоншені. Хондроцити в зоні окостеніння все ще наявні з великою кількістю товстих трабекул.

У хрящі зони росту стегнових кісток відбувається порушення структури на тлі остеопорозу, що може призвести до розладу поздовжнього росту та зростання кісток у товщину. Гістологічно у тварин виявляли

потовщення хряща, переважно за рахунок зони гіпертрофованих хрящових клітин. Крім того, у ньому виникали поширені безклітинні ділянки. Зону первинної спонгіози практично не виявляли, що свідчить про порушення функції остеогенезу. Застосування механічних коливань, за даними гістологічного дослідження, призводить до відновлення структурно-функціональної організації трабекулярної кісткової тканини (рис. 2, рис. 3). Трабекули потовщувалися, відновлювалася структура зовнішніх і внутрішніх

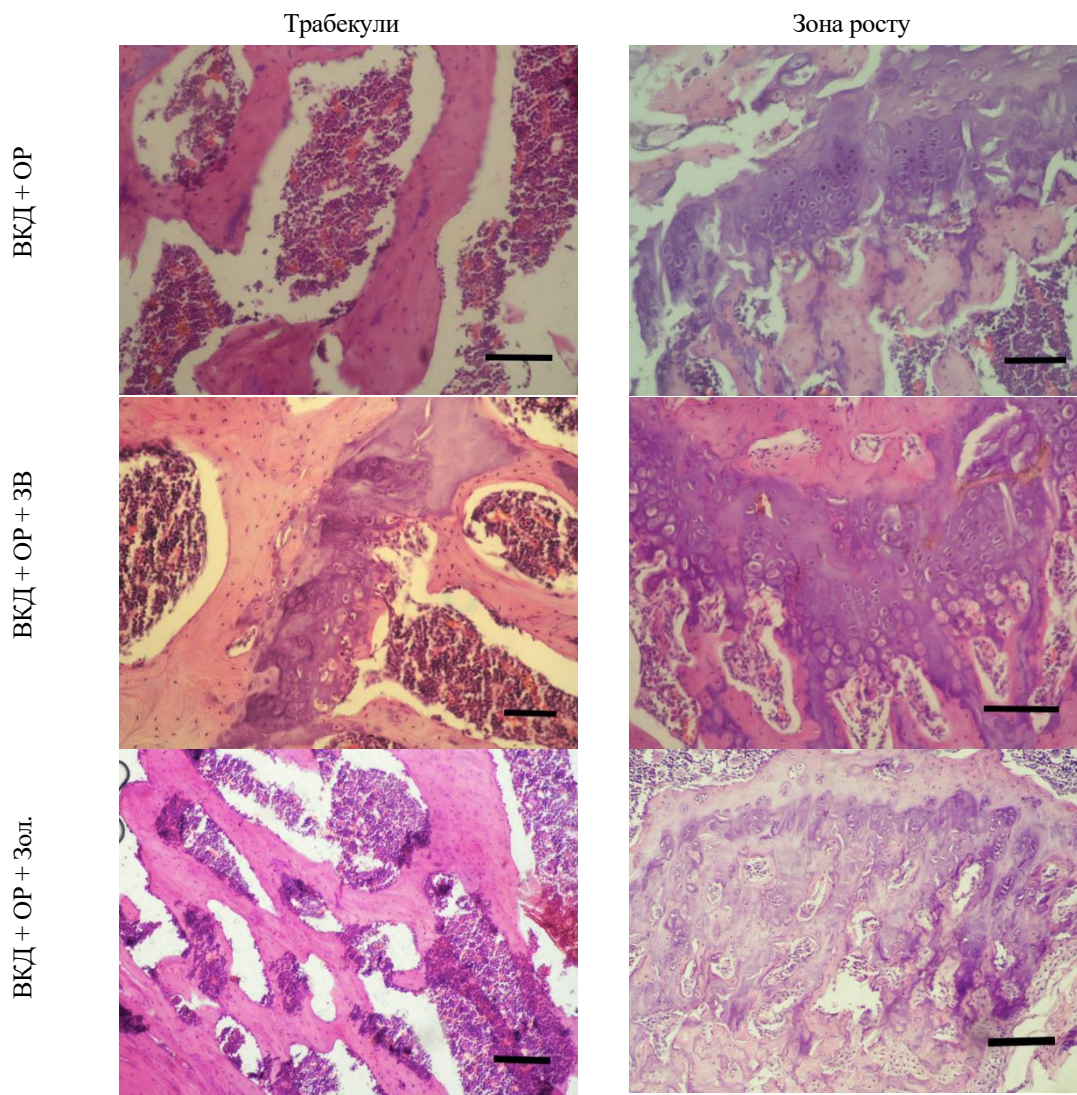


Рис. 2. Мікроскопічні зображення поперечних зрізів дистальних фрагментів стегнової кістки, забарвлених гематоксиліном та еозином, масштабна смуга = 100 мкм

загальних оточуючих кісткових пластинок. З'являвся шар первинної спонгіози на тлі потовщених кісткових трабекул (рис. 4). Ці дані доводять ефективний вплив фізичного навантаження у вигляді нефізіологічних механічних навантажень на нормалізацію структурно-функціонального стану кісткової тканини, епіфізарного хряща, ріст кістки та формування кісткової тканини при змодельованому експериментальному аліментарному остеопорозі. Результати аналізу кісткової тканини показали, що золедронова кислота позитивно впливала на ендохондральну осифікацію стегна. Звапнілий хрящ пластин зон росту, які отримували Зол., не був замінений кістковим матриксом у зоні окостеніння. Лікування Зол. призводило до утворення товстих кісткових трабекул, що містять кальцифікований хрящ у зоні росту. Оскільки активне ремоделювання кальцифікованих хрящових перегородок і первинної кістки в зоні окостеніння спостерігається вже на 8-й тиждень дослідження та має подібні ознаки протягом всього експерименту, зона окостеніння в групі Зол. була більшою, ніж в інших

групах (рис. 3).

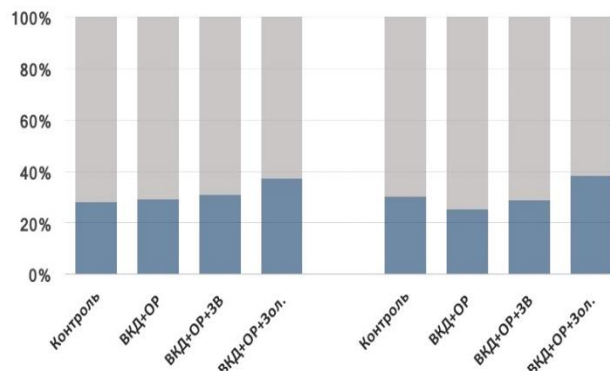
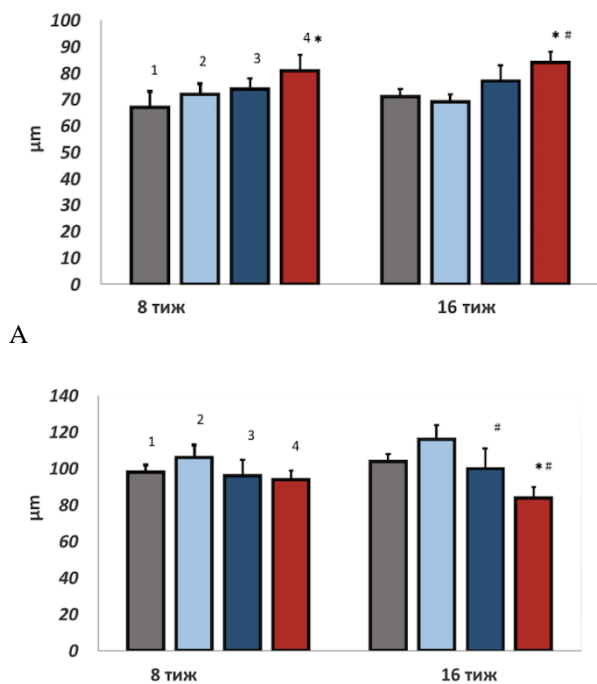


Рис. 3. Об'єм кістки/об'єм трабекулярної кістки (Oc/Ot), % дистальних фрагментів стегнової кістки у контрольних та піддослідних щурів

Оригінальні дослідження



A

B

Рис. 4. Мікроструктура трабекул стегнової кістки. Цифрове зображення, використане для кількісної оцінки трабекулярної архітектури, для аналізу відібрано центральну зону дистального епіфіза. Товщину трабекулярної кістки (А) та відстань між трабекулами (В) визначено кількісно та використано для розрахунку структурних характеристик трабекулярної кістки; * - $p < 0,05$; проти контрольної групи; *# - $p < 0,05$; проти групи ВКД + ОР. 1 – контроль, 2 - ВКД + ОР, 3 - ВКД + ОР + 3В, 4 – ВКД + ОР + Зол.

Кістковий морфогенетичний білок 2 необхідний для формування хрящів і кісток. Стимулює диференціацію міобластів в остеобласти, що призводить до посилення експресії активуючого фактора транскрипції 4, який відіграє центральну роль у диференціації остеобластів. На 16-й тиждень експерименту у зразках груп контролю спостерігали позитивну та високу експресію BMP-2. Інтенсивність сигналів BMP-2, пов'язаного з потенціалом остеοіндукції кістки та регуляцією росту хондроцитів у хрящовій пластинці, була найвищою у групі ВКД + ОР (рис. 5). Застосування вібрації призводило до зменшення кількості імунореактивних клітин, що особливо помітно в зоні росткової пластинки кістки. Зниження сигналу BMP-2, ймовірно, пов'язане зі зниженою активністю остеокластів, що призводить до покращення якості кістки. Добре відомо, що BMP-2 експресується як в остеοцитах, так і в остеοбластах, і якщо експресія остеοпротегерину збільшується, можна припустити, що кількість зрілих остеокластів зменшується. Це, у свою чергу, призводить до зниження експресії BMP-2, що виявлялося у групі з додатковим використанням бісфосфонату, гальмуючи остеοкластогенез.

Використовуючи модель з висококалорійною дієтою та обмеженою рухомістю, ми продемонстрували, що

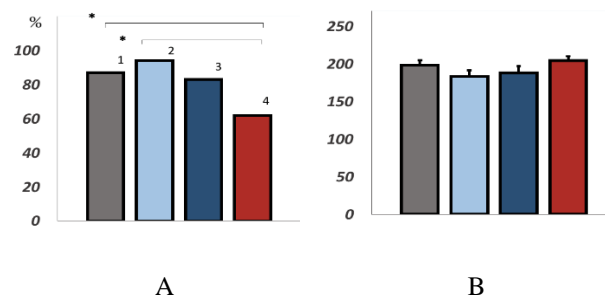
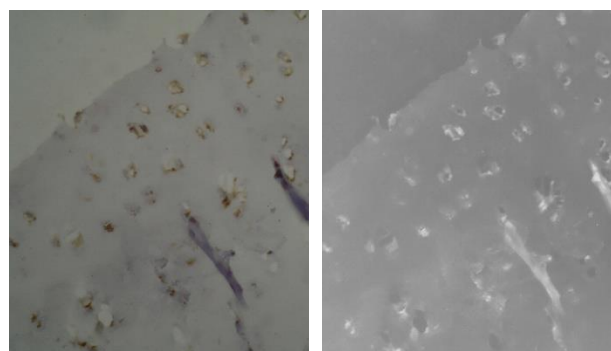


Рис. 5. А – Відсоток імунореактивних хондроцитів у суглобовому хрящі в кожній групі, середнє значення піксельної 8-біт шкали, В – імуногістохімічна реакція клітин на кістковий морфогенетичний білок 2 (BMP-2) пластинки росту та суглобового хряща (* - $p < 0,05$); 1 – контроль, 2 - ВКД + ОР, 3 - ВКД + ОР + 3В, 4 – ВКД + ОР + Зол.

вже починаючи з 16-го тижня дослідження порушується морфологія стегнової кістки. Ці структурні зміни супроводжуються зміною кількісних показників мінеральної маси фрагментів дослідних зразків. Хоча харчування та спосіб життя - це лише одні з багатьох факторів, що впливають на кісткову масу, проте мають особливе значення для ремоделювання кісткової тканини. Згідно з даними літератури, висококалорійна дієта в комбінації з обмеженою рухомістю видаються шкідливими для розвитку трабекулярного шару кістки, впливу на кіркову пластинку, але є менш інтенсивним або взагалі відсутнім. Зокрема, Chen et al. описували про відсутність ефекту застосування дієти з високим вмістом жиру на МЦКТ великогомілкової кістки в молодих самок щурів, але, при цьому, погіршувалася міцність поперекового відділу та шийки стегна кістки, ймовірно через зменшення площі кортикальної кірки, що спостерігається в порівнянні зі стандартною дієтою [18].

Як вже зазначено вище, кістка є механочутливою тканиною, її стан залежить від механічних впливів, які викликаються повсякденними фізичними навантаженнями. У нашій експериментальній моделі досліджувані щури мали меншу мінеральну щільність кістки порівняно зі щурами, яких утримували на звичайній дієті, та тих, на яких додатково впливали загальною вібрацією. Таким чином, отримані кількісні характеристики МЦКТ вказують, що вплив загальної вібрації з рівнем віброприскорення 3 m/s^2 (50 Гц) призводять до сповільнення втрати мінеральної маси

трабекулярного шару кістки. Слід зауважити, що ожиріння ймовірно зумовлює активацію остеокластів та остеобластів, руйнування колагену та втрату гідроксіапатитів. А зміни, що відбуваються в кістці, залежать не тільки від сили і характеру впливу вібрації, але і від тривалості її дії. Аналіз зламів кісток, за допомогою скануючої електронної мікроскопії показав, що група щурів, яка отримувала золедронову кислоту, мала чисельні товсті трабекули з неорганізованим виглядом і кілька тонких кістковомозкових порожнин між ними, тоді як трабекули у зразках групи ВКД+ОР були тоншими і менш чисельними, порівняно з контролем.

У нашому попередньому дослідженні вдалося встановити, що підвищений рівень лептину асоціюється з підвищеною масою тіла та втратою кристалічної структури кісткової тканини [7]. Ожиріння та малорухливий спосіб життя можуть бути факторами, що впливають на мінерально-індуковану втрату кісткової тканини у щурів, та демонстрували хронічно підвищений циркулюючий лептин, що негативно асоціюється з мінеральною масою стегнових кісток. Очевидно, високочастотні механічні коливання активують остеобласти, прискорюють метаболічні процеси та сповільнюють втрату МЦКТ у експериментальних щурів. Наші дослідження дають змогу припустити, що надмірна жирова маса не захищає від втрати мінеральної маси кістки та часто асоціюється з підвищеним ризиком виникнення остеопорозу, через надмірне навантаження на опорно-руховий апарат.

Ми порівнювали наші результати з даними літератури, в яких автори, зокрема McGee-Lawrence et al. (2017) піддавали щоденним тренуванням на біговій доріжці/ЗВ мишей-самців та мишей із дефіцитом рецепторів лептину (db/db). Обидва методи знижували масу тіла мишей у поєднанні зі зниженням вмісту ліпідів та збільшенням рівня циркулюючого остеокальцину, що свідчить про зростання активності остеобластів у багатьох ділянках скелета [19]. Також, Huang et al. (2014) ставили за мету перевірити сприятливий вплив тренувань з вібрацією всього тіла на фізичний стан та масу в мишей із ожирінням, спричиненим дієтою з високим вмістом жиру. Досліджуваних щурів піддавали вібрації з низьким рівнем віброприскорення (0,13 g) та вібрації високої інтенсивності (0,68 g) [20]. Автори відзначали зниження маси тіла, нормалізацію біохімічних показників у мишей із ожирінням, та висунули гіпотезу, що вібрація може бути ефективним нефармакологічним методом для зміцнення здоров'я та профілактики ожиріння, спричиненого висококалорійною дієтою.

Слід зазначити, що цікавим фактом у наших дослідках було те, що трабекулярні ділянки кісток стегнової кістки у групі з використанням вібраційних коливань мали підвищену мінеральну щільність, що підтверджено денситометрично, хоча ці зміни не були значно вищими, порівняно з контролем. Наші експериментальні дослідження вказують, що високочастотна вібрація призводить до змін у процесі ремоделювання трабекулярного шару кісток, що дозволяє запобігати втраті МЦКТ протягом тривалого часу. На 16-ту добу

показники мінеральної маси статистично не різнилися з групою контролю. Порівнюючи наші результати з даними інших авторів, які проводили дослідження впливу бісфосфонатів на стан кістки при ожирінні в клінічній практиці, а також вивчали безпеку та ефективність золедронові кислоти (одноразова ін'єкція 5 мг, внутрішньовенно) на стан кісткового ремоделювання у пацієнтів із ожирінням після перенесеної бариатричної операції, був зроблений висновок, що введення бісфосфонату може зменшувати втрату МЦКТ у трабекулярному відділі хребта порівняно з контрольною групою [21].

У нашому дослідженні висококалорійна дієта, за умови обмеженої рухомості, призводить до зниження мінеральної щільності та порушення гістоморфологічної структури стегнової кістки порівняно до групи контролю. Проте додаткова механічна стимуляція дозволяє збільшити мінеральну масу трабекулярного шару на ранніх етапах без додаткового застосування бісфосфонатів. На додаток, ми фіксували збільшення ділянок окостеніння, що виявлялася СЕМ групи ІІІ, а при аналізі, за допомогою світлової мікроскопії, виявили структурні зміни в пластинці росту, зокрема, дезорганізовані хрящові зони та хондроцити в зоні окостеніння, що вказує на те, що золедроніва кислота при системному використанні негативно впливає на проліферацію хондроцитів.

Висновки. Висококалорійна дієта в комбінації з малорухомим способом життя призводить до несприятливого розвитку стегнової кістки в скелетно-зрілих щурів-самців. Золедроніва кислота викликає значні зміни в процесах окостеніння, яке відбувається під час ремоделювання стегнової кістки. На противагу цьому, у тварин із додатковим використанням вібрації, виявляли дещо підвищені структурні та денситометричні зміни стегнової кістки, а також відсутність зниження мінеральної щільності, що під цим впливом у тварин змінювалося кісткове ремоделювання на мікроструктурному рівні. Високочастотні механічні коливання всього тіла можуть використовуватися для профілактики остеопорозу та втрати кісткової маси.

Список літератури

1. Sen EI, Esmaeilzadeh S, Eskiuyurt N. Effects of whole-body vibration and high impact exercises on the bone metabolism and functional mobility in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2020;38(3):392-404. DOI: 10.1007/s00774-019-01072-2.
2. Chen J, Ruan H, Liu Y, Bao J, Xu H, Yao M, et al. Therapeutic effects of whole-body vibration on fracture healing in ovariectomized rats: a systematic review and meta-analysis. *Menopause.* 2018;26(6):677-86. DOI: 10.1097/GME.0000000000001285.
3. Gkataris K, Goulis DG, Potoupnis M, Anastasilakis AD, Kapetanios G. Obesity, osteoporosis and bone metabolism. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2020;20(3):372-81.
4. Yarrow JF, Toklu HZ, Balazs A, Phillips EG, Otzel DM, Chen C, et al. Fructose consumption does not worsen bone deficits resulting from high-fat feeding in young male rats. *Bone.* 2016;85:99-106. DOI: 10.1016/j.bone.2016.02.004.
5. Marmonti E, Busquets S, Toledo M, Ricci M, Beltrà M, Gudiño V, et al. A rat immobilization model based on cage volume reduction: A physiological model for bed rest? *Front.*

Оригінальні дослідження

Physiol. 2017;8:184.

6. Tadano S, Giri B. X-ray diffraction as a promising tool to characterize bone nanocomposites. *Sci Technol Adv Mater*. 2011;12(6):064708.

7. Kostyshyn N, Kulyk Y, Kostyshyn L, Gzhegotskyi M. Metabolic and Structural Response of Bone to Whole-Body Vibration in Obesity and Sedentary Rat Models for Osteopenia. *Romanian Journal of Diabetes Nutrition and Metabolic Diseases*. 2020;27(3):200-08.

8. Turcotte AF, O'Connor S, Morin SN, Gibbs JC, Willie BM, Jean S, et al. Association between obesity and risk of fracture, bone mineral density and bone quality in adults: A systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2021;16(6):e0252487.

9. Tomaszewska E, Muszyński S, Donaldson J, Dobrowolski P, Chand DK, Tomczyk-Warunek A, et al. Femoral μ CT Analysis, Mechanical Testing and Immunolocalization of Bone Proteins in β -Hydroxy β -Methylbutyrate (HMB) Supplemented Spiny Mouse in a Model of Pregnancy and Lactation-Associated Osteoporosis. *J Clin Med*. 2021;10(21):4808.

10. Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI. Zoledronate, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(4):625-31. DOI: 10.1016/j.joms.2007.11.032.

11. Wang B, Zhan Y, Yan L, Hao D. How zoledronic acid improves osteoporosis by acting on osteoclasts. *Front. Pharmacol*. 2022;13:941-61.

12. Kostyshyn NM, Gzhegotskyi MR, Kostyshyn LP, Mudry SI. Effect of zoledronic acid on bone nanocomposites organization and prevention of bone mineral density loss in ovariectomized rats. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2021;36(3):239-45. DOI: 10.1515/dmpt-2020-0187.

13. Black DM, Reid IR, Napoli N, Ewing SK, Shiraki M, Nakamura T, et al. The Interaction of Acute-Phase Reaction and

Efficacy for Osteoporosis After Zoledronic Acid: HORIZON Pivotal Fracture Trial. *J Bone Miner Res*. 2022;37(1):21-8. DOI: 10.1002/jbmr.4434.

14. Dall'Ara E, Varga P, Pahr D, Zysset P. A calibration methodology of QCT BMD for human vertebral body with registered micro-CT images. *Med Phys*. 2011;38(5):2602-8. DOI: 10.1118/1.3582946.

15. Shah FA, Ruscsák K, Palmquist A. 50 years of scanning electron microscopy of bone – a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Research*. 2019;7(1):1-15.

16. Boyde A. Scanning electron microscopy of bone. *Bone Research Protocols*. Humana Press: New York, NY; 2019. p. 571-616.

17. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671-75.

18. Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo KY. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *Int J Endocrinol*. 2013;2013:213234. DOI: 10.1155/2013/213234.

19. McGee-Lawrence ME, Wenger KH, Misra S, Davis CL, Pollock NK, Elsalanty M, et al. Whole-body vibration mimics the metabolic effects of exercise in male leptin receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2017;158(5):1160-71. DOI: 10.1210/en.2016-1250.

20. Huang CC, Tseng TL, Huang WC, Chung YH, Chuang HL, Wu JH. Whole-body vibration training effect on physical performance and obesity in mice. *Int J Med Sci*. 2014;11(12):1218-27. DOI: 10.7150/ijms.9975.

21. Liu Y, Côté MM, Cheney MC, Lindeman KG, Rushin CC, Hutter MM, et al. Examining zoledronic acid for the prevention of bone loss in patients receiving bariatric surgery. *Bone Rep*. 2021;14:100760.

Відомості про авторів

Костишин Назар Михайлович – канд. мед. наук, асистент кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, м. Львів, Україна. <https://orcid.org/0000-0003-0341-5853>

Лопатенко Ілона Валеріївна – студентка Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького, м. Львів, Україна. <https://orcid.org/0000-0002-7475-7044>

Серкіз Роман Ярославович – науковий співробітник (зараз інженер I кат.) Науково-технічного і навчального центру низькотемпературних досліджень, Львівський національний університет імені Івана Франка, м. Львів, Україна. <https://orcid.org/0000-0003-2977-4213>

Жила Микола Іванович – д-р.вет.наук, кафедра нормальної та патологічної морфології і судової ветеринарії, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені Степана Гжицького, м. Львів, Україна. <https://orcid.org/0000-0003-1206-168X>

Information about the authors

Kostyshyn N. – PhD, Assoc. Prof., Department of Normal Physiology, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

Lopatenko I. – student, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Lviv, Ukraine.

Zhyly M. – PhD, DSc, Prof., Department of Normal and Pathological Morphology and Forensic Veterinary, Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Lviv, Ukraine.

Serkiz R. – Laboratory Chief Manager, Ivan Franko National University of Lviv, Solid State Physics Department, Lviv, Ukraine.

Надійшла до редакції 10.11.22

Рецензент – проф. Роговий Ю.Є.

© Н.М. Костишин, І.В. Лопатенко, Р.Я. Серкіз, М.І. Жила, 2022