

**ОЦІНКА МІНЕРАЛЬНОЇ ЩІЛЬНОСТІ ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ
ЗА УМОВИ МОДЕЛЮВАННЯ ОЖИРІННЯ, МАЛОРУХОМОГО СПОСОБУ ЖИТТЯ
ТА ВПЛИВУ НЕФІЗІОЛОГІЧНОЇ ЗАГАЛЬНОЇ ВІБРАЦІЇ**

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького (м. Львів)

kostyshyn.nm@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Стаття є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри нормальної фізіології Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостазування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи», № державної реєстрації 0116U004510.

Вступ. Остеопороз характеризується зменшенням мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) та порушенням мікроархітектури трабекулярного та кортикального шарів. Це призводить до збільшення ризику переломів навіть при мінімальній травмі [1-3]. В Україні остеопороз являє собою серйозну медико-соціальну проблему у зв'язку з високою частотою виявлення його не тільки серед літніх людей, але і в осіб працездатного віку. Ризик виникнення переломів на фоні остеопорозу мають приблизно 4,7 млн. осіб, що складає 10,7% населення України [4].

В літературі зустрічається велика кількість досліджень щодо зміни МЩКТ шийки стегнової кістки та поперекового відділу хребта, проте важливою є оцінка ремоделювання різних ділянок скелету. Раніше вважалося, що ожиріння асоціюється з підвищеною мінеральною масою через збільшення навантаження та стимулювання кісткового метаболізму. Проте у людей з ожирінням та сидячим способом життя спостерігається зниження мінеральної маси, часто не тільки трабекулярного, а також і кортикального шару [5-8]. В наших попередніх дослідженнях ми досліджували прискорене ремоделювання кісткової тканини у щурів, яким моделювали ожиріння, а також обмежену рухомість, що, в свою чергу, призвело до зниження кристалічного компоненту, який оцінювали рентгеноструктурним методом [9-11].

Метою цього дослідження було оцінити зміну мінеральної щільності кісткової тканини з ожирінням та малорухомим способом життя у щурів, а також немедикаментозну корекцію стану кістки за допомогою нефізіологічної вібрації.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальне дослідження проводили на 54-х самцях щурів лінії Wistar масою 180-200 г. Усі експерименти на тваринах проводилися нами відповідно до біоетичних принципів та положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, а також схвалено етичною комісією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького

(звіт комісії з етики № 10 від 16.12. 2019 р). Тварини перебували при постійному 12-ти годинному циклі світла і темряви, температурі повітря 21-23° С та відносній вологості 60±10%. Всіх тварин утримували у піднятих клітках з сітчастим днищем для запобігання копрофагії.

Експериментальні щури були розділені на 3 групи по 18 особин у кожній: контрольна група – щури, що перебували за стандартних умов віварію та вживали стандартний раціон та воду *ad libitum*; експериментальна група I – щури, які вживали висококалорійну дієту та воду *ad libitum* в поєднанні з обмеженою рухомістю (ВКД+ОР), II експериментальна група – ВКД + ОР + загальна вібрація всього тіла (ВКД+ОР+ЗВ). Застосовували модель дієти C 11024, Research Diets, New Brunswick, NJ.

Вертикальні вібраційні коливання моделювалися з використанням вібраційної помпи APC Rain-60 потужністю 250 Вт, максимальним тиском 7 бар та регулятора частоти напруги моделі AFC-120. До штока вібраційного насоса кріпилася вібраційна платформа з контейнером, де перебувала дослідна група щурів [12]. В усіх випадках вона дорівнювала 1,2 мм. Рівень віброприскорення становив: 3,0 м/с² – 0,3 г. Вплив загальної вібрації всього тіла застосовували по 30 хв., 5 днів на тиждень, протягом 24 тижнів. Після 8-го, 16-го та 24-го тижнів шістьом тваринам з кожної групи проводили евтаназію під загальним внутрішньочеревинним уретановим наркозом, в дозі 0,3 г/кг.

Дослідження показників мінеральної щільності кісткової тканини трабекулярного шару гомілки проводили методом кількісної комп'ютерної томографії (qCT): Toshiba TSX-101 A, Aquilion 16, 2004 р., датчик з товщиною зрізу 0,5 мм, 120.0 kV, 50 mA (**рис. 1**). Обробка даних проводилась 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). Коефіцієнт варіації (CV) становив 0,5% при оцінці *phantom* та 2% *in vivo*. Точність оцінки були 1% та 2,5% відповідно [13-16]. Отримані дані були виражені як середнє значення M±SD. Групи порівнювали за допомогою t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

В результаті проведеної рентгенівської денситометрії кісткової тканини щурів дослідних груп встановлено статистично значиму зміну мінеральної щільності на протязі всього експерименту. Мінеральна щільність трабекулярного шару зон інтересу гомілкових кісток контрольної групи становив в межах



Рисунок 1 - Вимірювання МЩКТ гомілкових кісток щурів. Трабекулярний шар проксимального кінця великогомілкової кістки знаходиться від ділянки метафізу до дистальної зони зони діафізу (визначена на рівні 30% від загальної довжини кістки). Трабекулярний шар був відокремлений від кортикального шару автоматично визначеними контурними лініями під час аналізу отриманих сканів. А – 3D-модель гомілкових кісток. Б – КТ-скан кістки, використаний для денситометричного аналізу

від $294,1 \pm 15,2$ до $308,3 \pm 17,4$ мг/см³. Ми спостерігали зниження МЩКТ трабекулярного шару гомілки за умови моделювання ожиріння та малорухомого способу життя (група I). Проте у групі II, де додатково вводили вібрацію всього тіла (0,3 g), мінеральна щільність була значно вищою за дослідну групу I, хоча показник не досягав рівня контролю (рис. 2).

Варто зазначити, що найбільша втрата кісткової тканини спостерігалася в дослідній групі I на 16-й та 24-й тижні експерименту, яка зменшувалася до $\leq 17,9\%$ ($p < 0,05$) та $16,4\%$ ($p < 0,05$) відповідно порівняно з групою контролю. На 8 тижень показник не змінювався статистично. В дослідній групі II показник щільності знизився до значення $\leq 5,5\%$ ($p > 0,05$) на 8-й тижень, на $12,3\%$ на 16-й тижень та $11,1\%$ на 24-й тижень відповідно до групи контролю (рис. 2B). Кортикальний шар кісткової тканини не змінювався статистично в дослідних групах по відношенню до групи контролю та коливався в таких межах $701 \pm 31,8 - 740 \pm 40,1$ мг/см³. В нашій дослідній групі I – $741,4 \pm 38,2 - 728,0 \pm 29,4 - 746,0 \pm 52,2$ мг/см³, а в дослідній групі II був – $724 \pm 48,1 - 748 \pm 33,2 - 731 \pm 35,2$ мг/см³.

Хоча кількісний показник МЩКТ, що був нами виміряний рентгенденситометрично є найпоширенішим клінічним вимірюванням для діагностики остеопорозу, зростає усвідомлення того, що зниження МЩКТ не є єдиним параметром, яка лежить в основі ризику переломів, а високий кількісний показник МЩКТ не захищає людину від переломів. На фактори ризику

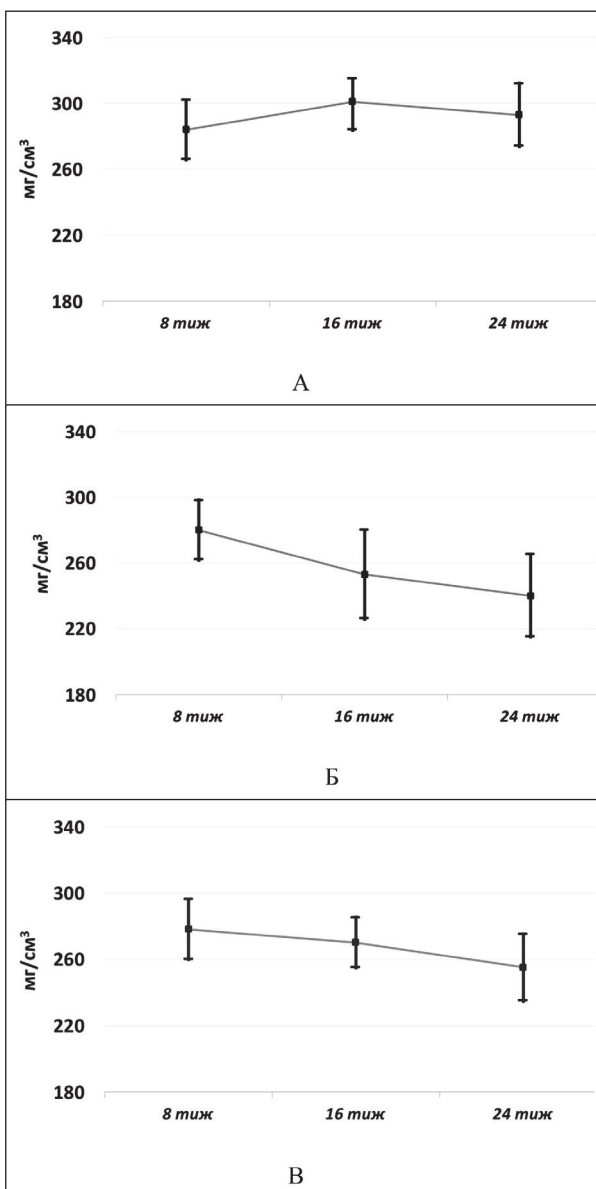


Рисунок 2 – Мінеральна щільність трабекулярного шару кістки (мг/см³) гомілкових кісток в групі контролю (А) та дослідних групах I (Б) і II (Б).

перелому також впливає якість кістки, яка визначається як природній наноккомпозит, що визначає міцність кісток [14, 15]. В наших попередніх дослідженнях ми оцінювали співвідношення кристалічного та аморфного компонентів та стан кристалічної ґратки гідроксиапатиту рентгеноструктурним методом. Проте цей метод не дозволяє прижиттєво повністю оцінити стан кісткової тканини та обмежується тільки експериментальними лабораторіями. Кількісна комп'ютерна томографія дозволяє одночасну оцінку трабекулярного та кортикального відділів кістки. З цього випливає, що щільність кісток є основним фактором ризику остеопоротичного перелому.

В літературі описані зміни показників ремоделювання, пов'язаного з ожирінням, включаючи більш високі концентрації паратиреоїдного гормону (ПТГ), остеокальцину, що корелюють із підвищеною концентрацією лептину у сироватці крові щурів, які зростають при зниженні кристалічного компоненту [10, 11]. Ці висновки свідчать про те, що ожиріння

та малорухомих спосіб життя негативно впливає на трабекулярний шар кістки.

Оскільки кістка є механочутливою тканиною, то її стан залежить від особливостей харчування та способу життя, а також і від екзогенних впливів, до яких належить механічні стимули. Ми використовували нефізіологічну вібрацію з частотою 50 Гц та віброприскоренням 0,3 g, оскільки ці впливи не призводять до гострого чи хронічного ушкодження та максимально наближені до коливань, які виникають при фізичних вправах [17, 18].

Сао J з іншими авторами, 2010 встановили, що ожиріння, може зашкодити стану кісток через порушення кісткового ремоделювання. Миші, які харчувалися дієтою з високим вмістом жиру, мали вищий рівень тартрат-кислої фосфатази 5b в сироватці крові і лептину, проте концентрація остеокальцину була меншою, ніж у щурів контрольної групи. Миші, яких годували висококалорійною дієтою, мали меншу мінеральну щільність та об'єм трабекулярного шару стегнової кістки, ніж миші групи контролю [19]. Ці висновки свідчать про те, що ожиріння, індуковане висококалорійною дієтою, збільшує резорбцію кісток.

McGee-Lawrence ME, 2017 спостерігали збільшену активність остеобластів через підвищену концентрацію остеокальцину, а також збільшену мінералізацію скелету у мишей з відсутнім рецептором до лептину. Автори зробили висновок про позитивний ефект фізичних навантажень та вібрації всього тіла на метаболічні процеси у кістковій тканині за умови моделювання цукрового діабету типу II [20].

Huang CC, 2014 моделювали ожиріння у мишей-самців дієтою з високим вмістом жиру та впливали вібрацією різної інтенсивності 0,13g-0,68g [21]. Автори дослідили дозозалежний фізіологічний ефект, який призводив до зниження маси тіла. Цей ефект можна застосовувати як додаток до фізичних вправ.

Minematsu A та інші, 2019 піддавали 24-тижневих щурів загальній вібрації з різними частотами: 15, 30, 45, 60 або 90 Гц, з рівнем віброприскорення 0,5 g, протягом 8-ми тижнів. Об'єм трабекулярного шару

стегнової кістки був значно вищий у групі з частотою 15 Гц, ніж у групі контролю. Однак не було різниці в механічній міцності кісток або маркерах ремоделювання кісток серед усіх груп [22]. Ці результати свідчать про те, що WBV на низьких частотах може стати потужним методом первинної профілактики остеопорузу у дорослих осіб.

Ми встановили, що нефізіологічні механічні коливання з рівнем віброприскорення 0,3 g змінює ремоделювання кісток у щурів за умови моделювання ожиріння та малорухомого способу життя. Ці навантаження у вигляді вібрації всього тіла не призводили до гострого ушкодження кісткової тканини трабекулярного та кортикального шарів гомілки в ранні періоди, та навіть, в подальшому, сповільнювали втрату мінеральної маси. Дані ефекти є корисними для профілактики та доповнення до медикаментозної терапії остеопенії та втрати мінеральної щільності великогомілкової кістки, що досліджено на тваринній моделі.

Висновки.

1. Ожиріння в поєднанні з малорухомих способом життя призводить до зниження мінеральної щільності кісткової тканини гомілкової кістки у щурів.
2. Загальна вібрація з рівнем віброприскорення 0,3 g гальмує прискорене ремоделювання кістки за експериментальної моделі ожиріння та малорухомого способу життя, не допускаючи втрати мінеральної щільності.

Перспективи подальших досліджень В даному дослідженні ми оцінювали мінеральну щільність кісткової тканини гомілки у щурів із ожирінням та малорухомих способом життя. Проте, досить актуальним залишається діагностика стану кісткової тканини різних ділянок скелету та оцінка кісткової тканини на рівні нано- та мікроструктури. Вібрація всього тіла виявляла анаболічний ефект на мінеральну масу, але ці ефекти необхідно порівнювати з медикаментозним антирезорбтивним лікуванням як окремо, так і в комбінації.

Література

1. Fassio A, Idolazzi L, Rossini M, Gatti D, Adami, G., Giollo, et al. The obesity paradox and osteoporosis. *Eating and Weight Disorders-Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*. 2018;23(3):293-302.
2. Pagnotti GM, Styner M, Uzer G, Patel VS, Wright LE, Ness KK et al. Combating osteoporosis and obesity with exercise: leveraging cell mechanosensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(6):339-355.
3. Greco EA, Lenzi A, Migliaccio S. The obesity of bone. *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*. 2015;6(6):273-286.
4. Povoznyuk VV, Dzerovich NI, Karasevskaya TA. Bone mineral density in Ukrainian women of different age. *Annals-new york academy of sciences*. 2007;1119:243.
5. Smith KB, Smith MS. Obesity statistics. *Primary care: clinics in office practice*. 2016;43(1):121-135.
6. Korilchuk NI. Obesity as a prerequisite for metabolic syndrome (review). *Bulletin of Scientific Research*. 2018;2:24-28.
7. 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.
8. Jatkar A, Kurland IJ, Judex S. Diets high in fat or fructose differentially modulate bone health and lipid metabolism. *Calcified tissue international*. 2017;100(1):20-28.
9. Kostyshyn NM, Gzhegotskyi MR. Influence of whole body vibration on structural properties of bone in conditions of obesity and limited mobility. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2020;90(2):14-20.
10. 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;27:200-208.
11. Cao J, Sun L, Gao H. Diet-induced obesity alters bone remodeling leading to decreased femoral trabecular bone mass in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1192(1):292-297.
12. Kostyshyn NM, Grzegotsky MR, Servetnyk MI. Assessment of structural and functional condition of rats bone tissue under the influence of various parameters of vibration. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 2018;31(3):148-153.
13. de Souza Balbinot G, Leitune VB, Ponzoni D, Collares FM. Bone healing with niobium-containing bioactive glass composition in rat femur model: A micro-CT study. *Dental Materials*. 2019;35(10):1490-1497.
14. Cory E, Nazarian A, Entezari V, Vartanians V, Müller R, et al. Compressive axial mechanical properties of rat bone as functions of bone volume fraction, apparent density and micro-ct based mineral density. *Journal of biomechanics*. 2010;43(5):953-960.
15. Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, et al. The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone*. 2006;38(1):136-144.

16. Parsa A, Ibrahim N, Hassan B, van der Stelt P, Wismeijer D. Bone quality evaluation at dental implant site using multislice CT, micro-CT, and cone beam CT. *Clinical oral implants research*. 2015;26(1):e1-7.
17. Lam TP, Ng BW, Cheung LH, Lee KM, Qin L, Cheng JY. Effect of whole body vibration (WBV) therapy on bone density and bone quality in osteopenic girls with adolescent idiopathic scoliosis: a randomized, controlled trial. *Osteoporosis international*. 2013;24(5):1623-1636.
18. Pang MY, Lau RW, Yip SP. The effects of whole-body vibration therapy on bone turnover, muscle strength, motor function, and spasticity in chronic stroke: a randomized controlled trial. *European journal of physical and rehabilitation medicine*. 2013;49(4):439-450.
19. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2011;6:30.
20. 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):1160-1171.
21. Huang CC, Tseng TL, Huang WC, Chung YH, Chuang HL, Wu JH. Whole-body vibration training effect on physical performance and obesity in mice. *International journal of medical sciences*. 2014;11(12):1218.
22. Minematsu A, Nishii Y, Imagita H, Sakata S. Whole body vibration at low-frequency can increase trabecular thickness and width in adult rats. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2019;19(2):169.

ОЦІНКА МІНЕРАЛЬНОЇ ЩІЛЬНОСТІ ВЕЛИКОГОМІЛКОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ЗА УМОВИ МОДЕЛЮВАННЯ ОЖИРІННЯ, МАЛОРУХОМОГО СПОСОБУ ЖИТТЯ ТА ВПЛИВУ НЕФІЗІОЛОГІЧНОЇ ЗАГАЛЬНОЇ ВІБРАЦІЇ

Костишин Н. М.

Резюме. Ожиріння та малорухомий спосіб життя негативно впливають на здоров'я людини в цілому та кістковий метаболізм зокрема. Це в подальшому може призводити до виникнення остеопенії та зростання ризику переломів. Фізичні навантаження здатні покращувати стан кісткової тканини та недопускати розвиток остеопорозу. Метою цього дослідження було оцінити сприятливий вплив нефізіологічної вібрації всього тіла на кісткову тканину за умов моделювання ожиріння та обмеженої рухливості у статевозрілих щурів-самців. Моделювання ожиріння проводили з використанням висококалорійної дієти. Щурів рандомно розподіляли на три групи: контроль (n=18) – зі стандартною дієтою, експериментальна група I (n=18) була із використанням висококалорійної дієти та обмеженою рухливістю; експериментальна група II (n=18) – висококалорійна дієта + обмежена рухливість з додатковим впливом вібрації всього тіла. Вертикальні вібраційні коливання моделювалися з використанням вібраційної помпи. Рівень віброприскорення становив 0,3 g. Вплив загальної вібрації всього тіла застосовували по 30 хв., 5 днів на тиждень, протягом 24 тижнів. Великогомілкові кістки відбирали для рентгенівської КТ-денситометрії. Дослідження мінеральної щільності трабекулярного та кортикального шарів проводили на 8-ий, 16-ий та 24-ий тижні дослідження. Мінеральна щільність трабекулярного шару зон інтересу гомілкових кісток контрольної групи була в межах від 294,1±15,2 до 308,3±17,4 мг/см³. Ми спостерігали зниження МЩКТ трабекулярного шару гомілки за умови моделювання ожиріння та малорухомого способу життя. Аналіз результатів показав, що у дослідній групі II мінеральна щільність трабекулярного шару кісткової тканини була значно вищою ніж у групі з ожирінням та обмеженою рухливістю (дослідна група I), проте ці показники були нижчими за групу контролю. Найбільша втрата кісткової тканини спостерігалася в дослідній групі I на 16-ий та 24-ий тижні експерименту, яка зменшувалася до ≤17,9% (p<0,05) та 16,4% (p<0,05) відповідно порівняно з групою контролю. Щільність кортикального шару статистично не змінювалася протягом усього дослідження. Механічні коливання всього тіла, у вигляді простих фізичних вправ, здатні сповільнювати кісткове ремоделювання та можуть використовуватися як метод профілактики остеопенії або як додаток до медикаментозної терапії остеопорозу у пацієнтів з надлишковою масою тіла та малорухомим способом життя.

Ключові слова: ремоделювання кісткової тканини, загальна вібрація, рентгенівська денситометрія, кісткова тканина, остеопороз.

EVALUATION OF TIBIA MINERAL DENSITY IN RATS TO NONPHYSIOLOGICAL WHOLE BODY VIBRATION IN OBESITY AND SEDENTARY OSTEOPENIA MODEL

Kostyshyn N. M.

Abstract. Obesity and sedentary lifestyle have a negative impact on human health in general and bone metabolism particularly. This can lead to osteopenia and increased risk of bone fractures. Exercises can improve the metabolic condition of bone tissue and prevent osteoporosis. The aim of this study was to evaluate the beneficial effect of non-physiological whole-body vibration on bone tissue under conditions of modelling obesity and limited mobility in adult male rats. Modelling of obesity was performed using a high-calorie diet. Rats were randomly divided into three groups: control (n=18) – with a standard diet, experimental group I (n=18) with a high-calorie diet and limited mobility; experimental group II (n=18) – high-calorie diet + limited mobility with the additional effect of whole body vibration. Vertical vibration oscillations were simulated using a vibration pump. The level of vibration acceleration was 0.3 g. Whole body vibration was applied for 30 minutes, 5 days a week for 24 weeks. The tibia was selected for X-ray qCT densitometry. Investigation of the bone mineral density of the trabecular and cortical layers were performed at the 8th, 16th and 24th week of the study. The mineral density of the trabecular layer of the tibia in control group ranged from 294.1±15.2 to 308.3±17.4 mg/cm³. We observed a decrease in BMD of the trabecular layer of the tibia in obesity and sedentary lifestyle group. The analysis of the results showed that in experimental group II the mineral density of the trabecular layer of bone tissue was significantly higher than in the group with obesity and limited mobility conditions (experimental group I), but these indicators were lower than the control group. The greatest bone loss was observed in experimental group I at the 16th and 24th week of the experiment, which decreased to ≤17.9% (p<0.05) and 16.4% (p<0.05), respectively, compared with control group. The density of the cortical layer did not change statistically throughout the study. Mechanical oscillations of the whole body, in the form of simple physical exercises, can slow bone remodeling and can be used as a method of preventing osteopenia or as an adjunct to drug therapy for osteoporosis in patients with overweight and sedentary lifestyle.

Key words: bone remodeling, general vibration, X-ray densitometry, bone tissue, osteoporosis.

*Рецензент – проф. Міщенко І. В.
Стаття надійшла 23.12.2020 року*