

УДК 591.47:591.53

Р.В. Лопак, В.И. Лузин, А.А. Власова

ФГБОУ ВО «Луганский государственный медицинский университет имени Святителя Луки» МЗ РФ, Луганск

## МИКРОСТРУКТУРА ОСТЕОПАТИТА ТАЗОВЫХ КОСТЕЙ У КРЫС ПЕРИОДА СТАРЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ПОЛУЧАВШИХ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНОВУЮ ДИЕТУ И ПРЕПАРАТЫ КАЛЬЦИЯ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Продолжительность жизни в большинстве развитых стран неуклонно увеличивается, что приводит к увеличению риска развития возрастзависимых заболеваний – онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний, а также остеопороза [1]. При этом патологические переломы костей при остеопорозе приводят к самым различным осложнениям, вплоть до инвалидизации и смерти [1].

В настоящий момент в мировой литературе можно найти данные о возможной взаимосвязи между снижением минеральной плотности костной ткани и дислипидемиями (высокими концентрациями общего холестерина и липопротеинов низкой плотности в крови), однако однозначного мнения на этот счет нет [5, 6]. Данную теорию подтверждают исследования о том, что снижение минеральной плотности костной ткани у людей старшего возраста может быть вызвано, в том числе диетой, богатой животными жирами, что приводит к развитию дислипидемии [1].

### ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментальных условиях изучить количественные характеристики ультраструктуры остеопатита тазовых костей у крыс-самок периода старческих изменений, на фоне гиперхолестериновой диеты и аргументировать возможность коррекции выявленных отличий путем внутрижелудочного введения препаратов кальция третьего поколения различного состава – «Osteocare», «Кальцемин» или «Кальцемин Адванс».

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведен на 280 белых крысах-самках периода старческих изменений с исходной массой тела 330-345 г, которые были распределены на 8 групп. Животные 1-й группы (контроль) получали стандартный рацион вивария; 2-й группы – потребляли в рационе 2,5%

холестерина и 10% свиного жира, (при этом соответственно уменьшали содержание крахмала). В 3-5-й группах крысы, находящиеся на стандартной диете, получали внутрижелудочно через зонд препараты кальция третьего поколения: «Osteocare», «Кальцемин» и «Кальцемин Адванс» в дозе, эквивалентной терапевтической для человека. При этом в 6-8-й группах животные получали «Osteocare», «Кальцемин» и «Кальцемин Адванс» на фоне гиперхолестериновой диеты [3, 4].

Сроки эксперимента составляли 7, 15, 30, 90 и 180 суток. Все манипуляции с животными выполняли с соблюдением норм этического обращения с животными. Животных выводили из эксперимента путём декапитации под эфирным наркозом, затем выделляли тазовые кости, и проводили исследование кристаллографических характеристик костного биоминерала (метод рентгеноструктурного анализа на аппарате ДРОН-2,0 с гониометрической приставкой ГУР-5). Использовали К $\alpha$ -излучение меди с длиной волны 0,1542 нм; напряжение и сила анодного тока составляли соответственно 30 кВ и 20 А. Дифрагированные рентгеновские лучи регистрировали в угловом диапазоне от 2° до 37° со скоростью фиксации 1° в 1 минуту. На зарегистрированных рентгеновских дифрактограммах анализировали максимально выраженные дифракционные пики биоминерала кости, по угловому положению которых рассчитывали размеры блоков когерентного рассеивания (кристаллитов) по формуле Селякова-Шерера, элементарных ячеек минерала дентина и коэффициент микротекстурирования по методу соотношения рефлексов [2].

Полученные цифровые данные обрабатывались методами вариационной статистики с ис-

пользованием пакета программы Microsoft Excel 2016.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У животных 1-й группы масса тела возросла с  $322,71 \pm 7,90$  г на 7 сутки эксперимента до  $358,14 \pm 7,34$  г на 180 сутки, при этом в крови уровень общего холестерина увеличивался с  $1,54 \pm 0,03$  ммоль/л на 7 сутки эксперимента до  $1,72 \pm 0,03$  ммоль/л на 180 сутки, что не отличается от данных, представленных в мировой литературе [1].

Одновременно изменялись также следующие параметры: размеры элементарных ячеек остеоапатита тазовых костей вдоль осей а и с увеличились с  $9,392 \pm 0,003 \text{ М}^{-10}$  и  $6,861 \pm 0,003 \text{ М}^{-10}$  на 7 сутки эксперимента до  $9,402 \pm 0,002 \text{ М}^{-10}$  и  $6,869 \pm 0,002 \text{ М}^{-10}$  на 180 сутки; отношение размеров элементарных ячеек с к а в ходе наблюдения фиксировалось в пределах  $(73,05-73,07) \times 102$  у.е., что может свидетельствовать об относительном равновесии между процессами кристаллизации костного минерала и его резорбции. Размеры кристаллитов за срок наблюдения увеличились с  $49,04 \pm 0,61$  нМ на 7 сутки эксперимента до  $51,76 \pm 0,48$  нМ на 180 сутки, а коэффициент микротекстурирования уменьшился с  $0,3650 \pm 0,0043$  у.е. на 7 сутки эксперимента до  $0,3440 \pm 0,0040$  у.е. на 180 сутки.

Данные результаты демонстрируют дестабилизацию общей обменной площади остеоапатита и упорядоченности его кристаллической решетки, что может служить признаком развития первичного сенильного остеопороза.

Лабораторные животные, которые потребляли пищу с избыточным содержанием жиров, достоверно имели большую массу тела по сравнению с контрольной группой на 9,36% через 30 суток, на 11,29% через 90 суток и на 10,93% через 180 суток наблюдения. При этом показатель общего холестерина крови оказался чувствительнее и продемонстрировал отклонения уже с 15 суток эксперимента – соответственно он был выше значений 1-й группы на 11,98% через 15 суток, на 13,61% через 30 суток, на 18,81% через 90 суток и на 20,55% через 180 суток эксперимента.

Следующими были проанализированы размеры кристаллитов остеоапатита тазовых костей, что показало увеличение данных параметров по сравнению с контрольной группой на 4,47% через 15 суток, на 4,40% через 30 суток, на 5,10% через 90 суток и на 6,67% через 180 суток эксперимента. При этом коэффициент микротекстурирования был ниже на 7,29% через 15 суток, на 8,10% через 30 суток, на 7,55% через 90 суток и на 9,65% через 180 суток, чем в 1-й груп-

пе. Это является отражением нарушения упорядоченности кристаллической решетки остеоапатита и уменьшения его общей обменной площади. Несколько позже, были зафиксированы изменения размеров элементарных ячеек остеоапатита тазовых костей вдоль осей а и с: они превосходили показатели группы контроля на 0,12% и на 0,12% через 90 суток и на 0,15% и на 0,14% через 180 суток. Это демонстрирует нарушение процессов нуклеации остеоапатита.

Следовательно, потребление лабораторными животными периода старческих изменений рациона с содержанием 2,5% холестерина и 10% свиного жира за счет сопутствующего уменьшения содержания крахмала сочетается с дестабилизацией микроструктуры остеоапатита. Начальные проявления выявленных изменений были зафиксированы начиная с 15 суток эксперимента.

Лабораторные животные, которые получали препарат кальция «Osteocare», не демонстрировали достоверных отклонений массы тела и уровня общего холестерина крови от аналогичных показателей контрольной группы. Были выявлены лишь неяркие признаки улучшения ультраструктуры остеоапатита тазовых костей, что проявлялось в снижении показателей размеров кристаллитов по сравнению с группой контроля на 3,38% через 180 суток эксперимента.

У лабораторных животных 4-й группы (потребляли в дозе аналогичной терапевтической для человека «Кальцецин»), не было выявлено статистически значимых отклонений массы тела от значений 1-й группы, при этом уровень общего холестерина крови был на 6,38% через 180 суток эксперимента ниже, чем в контрольной группе.

В этой же группе были зафиксированы незначительные проявления оптимизации минеральной структуры тазовых костей, что проявлялось в снижении показателей размера кристаллитов на 4,76% через 90 суток и на 5,83% через 180 суток по сравнению группой контроля и повышении коэффициента микротекстурирования на 4,09% через 90 суток и на 4,40% через 180 суток эксперимента. В то же время, значения размеров элементарных ячеек остеоапатита тазовой кости вдоль оси с были на 0,11% ниже, чем в контрольной группе, через 180 суток наблюдения.

У подопытных крыс-самок 5-й группы, которые получали «Кальцецин Адванс» (в аналогичной терапевтической для человека дозе), достоверных отличий показателей массы тела от группы контроля обнаружено не было, однако уровень общего холестерина крови был ниже

контрольного на 7,54% через 180 суток наблюдения.

Введение препарата «Кальцемина Адванс» сопровождалось и признаками оптимизации микроструктуры биоминерала тазовых костей, что выражалось в уменьшении показателей размера кристаллитов по сравнению с контрольной группой на 5,11% через 90 суток и на 6,38% через 180 суток, при одновременном увеличении коэффициента микротекстурирования на 5,33% через 90 суток и на 5,41% через 180 суток эксперимента. Кроме того были выявлены отличия и в размерах элементарных ячеек биоминерала тазовой кости вдоль оси а и с: они на 0,09% и 0,13% были ниже, чем в группе контроля на 180 сутки.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что введение через внутрижелудочный зонд белым крысам-самкам периода старческих изменений препаратов кальция третьего поколения в дозах, аналогичных терапевтическим для человека, наблюдаются признаки оптимизации ультраструктуры биоминерала тазовых костей. Большую эффективность демонстрировали препараты «Кальцецин» и «Кальцецин Адванс» – эффекты развивались уже с 90 суток наблюдения, в то время как при введении «Osteocare» – только с 180 суток.

При введении препаратов кальция третьего поколения через внутрижелудочный зонд крысам-самкам периода старческих изменений, рацион которых содержал избыток жиров, также было зафиксировано ослабление негативных эффектов гиперхолестериновой диеты на микроструктуру остеопатита тазовых костей.

Таким образом, уровень общего холестерина крови у подопытных животных 6-й группы был меньше на 6,25% через 90 суток и на 12,57% через 180 суток по сравнению со 2-й экспериментальной группой, а показатель массы тела был ниже на 6,40% через 180 суток эксперимента.

Демонстрировались признаки реконструкции микроструктуры остеопатита тазовых костей. Коэффициент микротекстурирования остеопатита тазовой кости превосходил показатели 2-й группы на 3,66% через 30 суток, на 3,59% через 90 суток и на 5,43% через 180 суток эксперимента. В то же время, статистически значимо отличались показатели размера кристаллитов и были ниже, чем во 2-й группе, на 4,27% через 90 суток и на 5,74% через 180 суток, ниже были также размеры элементарных ячеек вдоль оси с – на 0,13% через 90 суток и на 0,09% через 180 суток наблюдения.

Следовательно, применение препарата кальция «Osteocare» на фоне рациона с преобладанием жиров незначительно корректирует отри-

цательное воздействие экспериментальной среды на микроструктуру остеопатита начиная с 30 суток наблюдения.

При применении препарата «Кальцецин» на фоне гиперхолестериновой диеты показатели уровня общего холестерина крови по сравнению со 2-й группой были ниже на 7,50% через 30 суток, на 9,42% через 90 суток и на 15,40% через 180 суток, а масса тела статистически значимо снижалась только к 180 суткам – на 7,91%.

В то же время, коэффициент микротекстурирования был выше, чем во 2-й группе на 4,90% через 30 суток, на 6,09% через 90 суток и на 7,01% через 180 суток наблюдения. При этом размеры кристаллитов были ниже на 5,26% через 90 суток и на 7,64% через 180 суток, чем значения 2-й группы, что также наблюдалось и для размеров элементарных ячеек вдоль оси с – на 0,13% через 90 суток и на 0,11% через 180 суток наблюдения.

Полученные результаты демонстрируют, что применение препарата «Кальцецин» на фоне рациона с избытком холестерина воздействует на микроструктуру остеопатита костей, восстанавливая её, уже через 30 суток наблюдения.

При введении препарата «Кальцецин Адванс» через внутрижелудочный зонд на фоне гиперхолестериновой диеты уровень общего холестерина крови был ниже на 9,00% через 15 суток, на 9,13% через 30 суток, на 12,20% через 90 суток и на 17,73% через 180 суток по сравнению со значениями 2-й группы, при этом масса тела также была ниже на 6,89% через 90 суток и на 9,21% через 180 суток наблюдения.

С 30 суток эксперимента наблюдались и достоверные отклонения показателей рентгеноструктурного анализа от 2-й группы: коэффициент микротекстурирования остеопатита тазовой кости был больше на 5,63% через 30 суток, на 6,95% через 90 суток и на 7,18% через 180 суток эксперимента, а показатели размера кристаллитов, наоборот, были ниже, чем во 2-й группе на 3,79% через 30 суток, на 5,60% через 90 суток и на 7,78% через 180 суток наблюдения. Помимо этого, показатели размеров элементарных ячеек вдоль оси с были ниже, чем показатели 2-й группы на 0,15% и на 0,13% на 90 и 180 сутки, а размеры вдоль оси а – ниже на 0,15% на 180 сутки.

Следовательно, введение препарата «Кальцецин Адванс» на фоне питания с повышенным содержанием жиров способствует реконструкции микроструктуры остеопатита начиная уже через 30 суток эксперимента.

Интерпретировать полученные результаты мы можем следующим образом. Повышение уровня общего холестерина в сыворотке крови

взаимосвязано с увеличением уровня синтеза холекальциферола и гормонов коры надпочечников, что может запускать процесс нарушения дифференцировки остеокластов и остеобластов, а также влиять на их функциональную активность [6].

Многие авторы высказывают идеи о существовании связи между низкой минеральной плотностью костной ткани (МПКТ) с нарушениями липидного состава крови. Таким образом, высказываются мнения о том, что механизмы развития дислипидемии и снижения МПКТ являются общими звеньями в патогенезе атеросклероза и остеопороза [5, 8].

Препараты кальция третьего поколения такие, как «Osteocare», «Кальцецин» и «Кальцецин Адванс», помимо солей кальция имеют в своём составе микроэлементы, необходимые для метаболизма костной ткани (магний, медь, цинк, марганец, бор) и холекальциферол.

Таким образом, формируются условия для совершенствования ферментных цепочек, в результате чего становится возможной стабилизация и восстановление кристаллической струк-

туры остеоопатита. Из выбранных нами препаратов кальция третьего поколения наибольшую эффективность продемонстрировал «Кальцецин Адванс», вероятно за счёт оптимальной концентрации микроэлементов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволяет говорить о том, что самки крыс периода старческих изменений, рацион которых содержал избыточное количество холестерина, демонстрируют признаки нарушения упорядоченности кристаллической решетки остеоопатита тазовых костей, уже через 15 суток эксперимента, которое нарастает по мере эксперимента. Введение препаратов кальция третьего поколения (например, «Osteocare», «Кальцецин» и «Кальцецин Адванс») на фоне диеты богатой жирами уменьшает отрицательное воздействие экспериментальной среды на микроструктуру остеоопатита тазовых костей через 30 суток эксперимента. Наибольшую эффективность в нашем эксперименте продемонстрировал «Кальцецин Адванс».

*Р.В. Лопак, В.И. Лузин, А.А. Власова*

*ФГБОУ ВО «Луганский государственный медицинский университет имени Святого Луки» МЗ РФ, Луганск*

### **МИКРОСТРУКТУРА ОСТЕОПАТИТА ТАЗОВЫХ КОСТЕЙ У КРЫС ПЕРИОДА СТАРЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ПОЛУЧАВШИХ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНОВУЮ ДИЕТУ И ПРЕПАРАТЫ КАЛЬЦИЯ ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ**

В эксперименте на 280 самках крыс старческого возраста показано, что применение диеты с повышенным содержанием холестерина сопровождается повышением уровня общего холестерина крови, а также нестабильностью микроструктуры структуры остеоопатита тазовых костей с 15 суток эксперимента. При увеличении сроков эксперимента данные отклонения прогрессируют. Применение препаратов кальция третьего поколения замедлению проявления старения костной системы на уровне микроструктуры остеоопатита, а эффективность применения прямопропорционально зависит от спектра и концентрации остеотропных микроэлементов в них.

В сравнении с группой без коррекции, использование комплексных препаратов кальция на фоне гиперхолестериновой диеты сопровождается, корректирующим эффектом, выраженность которого также зависит от спектра и концентрации остеотропных микроэлементов в них. По мере увеличения длительности введения для всех используемых препаратов эффективность коррекции возрастала. Наиболее эффективным, по нашим данным, является применение препарата «Кальцецин Адванс».

**Ключевые слова:** крысы, старческий возраст, гиперхолестериновая диета, остеоопатит, препараты кальция третьего поколения.

*R.V. Lopak, V.I. Luzin, A.A. Vlasova*

*FSBEI HE «Saint Luka Lugansk State Medical University» MOH Russia, Lugansk*

### **MICROSTRUCTURE OF PELVIC BONE OSTEOPATITIS IN RATS OF THE PERIOD OF SENILE CHANGES TREATED WITH A HYPOCHOLESTEROLEMIC DIET AND THIRD-GENERATION CALCIUM PREPARATIONS**

In an experiment on 280 female rats of senile age, it was shown that the use of a diet with a high cholesterol content is accompanied by an increase in the level of total blood cholesterol, as well as instability of the microstructure of the pelvic bone osteoapatitis structure from the

15th day of the experiment. With an increase in the duration of the experiment, these deviations progress. The use of calcium preparations of the third generation slows down the manifestation of aging of the bone system at the level of the microstructure of osteoapatitis, and the

effectiveness of the use directly depends on the spectrum and concentration of osteotropic trace elements in them. In comparison with the group without correction, the use of complex calcium preparations against the background of a hypercholesterolemic diet is accompanied by a corrective effect, the severity of which also depends on the spectrum and concentration of osteotropic trace ele-

ments in them. As the duration of administration for all drugs used increased, the effectiveness of correction increased. The most effective, according to our data, is the use of the drug Calcemin Advance.

**Key words:** rats, senile age, hypercholesterolemic diet, osteoarthritis, third-generation calcium preparations.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кашталап В.В., Хрячкова О.Н., Барбараш О.Л. Статины и остеопороз. Креативная кардиология. 2016; 10 (4): 317-323.
2. Лузин В.И., Петросянц С.В., Грек О.А., Бережной Е.П., Астраханцев Д.А. Характеристика биологической деградации керамического гидроксиапатита, имплантированного в костный дефект, по данным рентгеноструктурного анализа. Травма. 2014; 15 (2): 20-24.
3. Мосягина Н.А. Влияние препарата кальция кальцемина на химический состав регенерата большеберцовой кости у крыс при повторном переломе на фоне сахарного диабета 2 типа. Морфологический альманах имени В.Г. Ковешникова. 2022; 4 (20): 120-126.
4. Мосягина Н.А., Савенко Л.Д. Химический состав регенерата большеберцовой кости при имплантации гидроксиапатитного материала ОК-015 у крыс при повторном переломе на фоне сахарного диабета 2 типа. Проблемы экологической и медицинской генетики и клинической иммунологии. 2022; 6 (174): 36-46.
5. Скрипникова И.А., Абилова Э.С., Алясова П.А., Алиханова Н.А., Худяков М.Б., Выгодин В.А. Ассоциации липопротеидов с костной массой у женщин в постменопаузе. Терапевтический архив. 2016; 88 (1): 82-88.
6. Kim Y.-H., Nam G.-E., Cho K.-H., Choi Y.S., Kim S.-M., Han B.-D. Low bone mineral density is associated with dyslipidemia in South Korean men: the 2008-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. Endocr. J. 2013; 60: 1179-1189. DOI: 10.1507/endocrj.EJ13-0224.
7. Jeong T.-D., Lee W., Choi S.-E., Kim J.S., Kim H.-K., Bae S.J. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre-and postmenopausal women. Biomed. Res. Int. 2014; 398397. DOI: 10.1155/2014/398397.
8. Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chihara K. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. Endocr J. 2002; 49 (2): 211-217. doi: 10.1507/endocrj.49.211.

## REFERENCES

1. Kashtalap V.V., Khryachkova O.N., Barbarash O.L. Statins and osteoporosis. Kreativnaya kardiologiya. 2016; 10 (4): 317-323 (in Russian).
2. Luzin V.I., Petrosyants S.V., Grek O.A., Berezhnoi E.P., Astrakhansev D.A. Kharakteristika biologicheskoi degradatsii keramicheskogo gidroksiapatita, implantirovanogo v kostnyi defekt, po dannym rentgenostruktturnogo analiza. Travma. 2014; 15 (2): 20-24 (in Russian).
3. Mosyagina N.A. Vliyanie preparata kal'tsiya kal'tsemin advans na khimicheskii sostav regenerata bol'shebertsovoi kosti u krysv pri povtornom perelome na fone sakharnogo diabeta 2 tipa. Morfologicheskii al'manakh imeni V.G. Koveshnikova. 2022; 4 (20): 120-126 (in Russian).
4. Mosyagina N.A., Savenko L.D. Khimicheskii sostav regenerata bol'shebertsovoi kosti pri implantatsii gidroksiapatitnogo materiala OK-015 u krysv pri povtornom perelome na fone sakharnogo diabeta 2 tipa. Problemy ekologicheskoi i meditsinskoi genetiki i klinicheskoi immunologii. 2022; 6 (174): 36-46 (in Russian).
5. Skripnikova I.A., Abirova E.S., Alyasova P.A., Alikhanova N.A., Khudyakov M.B., Vygodin V.A. Assotsiatsii lipoproteidov s kostnoi massoi u zhenshchin v postmenopauze. Terapevticheskii arkhiv. 2016; 88 (1): 82-88 (in Russian).
6. Kim Y.-H., Nam G.-E., Cho K.-H., Choi Y.S., Kim S.-M., Han B.-D. Low bone mineral density is associated with dyslipidemia in South Korean men: the 2008-2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. Endocr. J. 2013; 60: 1179-1189. doi: 10.1507/endocrj.EJ13-0224.
7. Jeong T.-D., Lee W., Choi S.-E., Kim J.S., Kim H.-K., Bae S.J. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre-and postmenopausal women. Biomed. Res. Int. 2014; 398397. doi: 10.1155/2014/398397.
8. Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sowa H, Chen Q, Chihara K. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. Endocr J. 2002; 49 (2): 211-217. doi: 10.1507/endocrj.49.211.