

УДК [57.084.1+611.018.4]:616-08-039.71
DOI <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2025.2.8>

С.В. Шпак,

кандидат медичних наук, доцент,
Одеський національний медичний університет,
Валіховський провулок, 2, м. Одеса, Україна,
індекс 65082 sergeyshpak@ukr.net

КОРЕКЦІЯ ЗМІН ПОКАЗНИКІВ РЕЗОРБЦІЇ У КІСТКОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ ВИКЛИКАНИХ МОДЕЛЮВАННЯМ ХРОНІЧНОГО СТРЕСУ ЗА ДОПОМОГОЮ ЛІКУВАЛЬНО-ПРОФІЛАКТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ

Хронічний психоемоційний стрес зумовлює дисбаланс ремоделювання кісткової тканини, що проявляється підвищеною резорбцією й пригніченням остеогенезу. Водночас комплексні фармакологічні стратегії з антиоксидантними та мембраностабілізуючими властивостями залишаються недостатньо вивченими як інструмент корекції стрес-індукованих кісткових порушень. **Метою дослідження було** оцінити ефективність лікувально-профілактичного комплексу (ЛПК) препаратів щодо нормалізації показників резорбції у кістковій тканині щурів за умов моделювання хронічного звукового стресу. **Матеріали та методи.** У дослідженні використано 34 щури-самці лінії Wistar (2-місячного віку, маса тіла 140 ± 8 г), яких розподілили на три групи: інтактну ($n=10$), зі змодельованим хронічним звуковим стресом ($n=12$) та зі змодельованим стресом із подальшим застосуванням ЛПК ($n=12$). Упродовж 50 діб тваринам 2-ї та 3-ї груп моделювали хронічний звуковий стрес за допомогою ультразвукового відлякувача шкідників. У групі «стрес + ЛПК» тварини додатково отримували лікувальний комплекс препаратів. У гомогенатах щелеп визначали активність кислої фосфатази (КФ), лужної фосфатази (ЛФ) та індекс мінералізації (ЛФ/КФ). Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою програми STATISTICA 6.1 з використанням t-критерію Стьюдента ($p < 0,01$ вважали достовірним). **Результати дослідження.** Хронічний стрес підвищував активність КФ на 23,7% та знижував активність ЛФ на 33,0% порівняно з інтактними тваринами, що супроводжувалося падінням індексу мінералізації на 51,3%. Застосування ЛПК достовірно зменшило активність КФ на 31,2% і підвищило активність ЛФ на 19,5% відносно стрес-контролю, відновивши індекс мінералізації до 76% від інтактного рівня. **Висновки.** Лікувально-профілактичний комплекс препаратів ефективно коригує стрес-індуковані порушення ремоделювання кісткової тканини, знижуючи резорбцію та відновлюючи остеогенну активність. Результати підтверджують доцільність застосування ЛПК для профілактики кісткових ускладнень, асоційованих із хронічним стресом.

Ключові слова: стрес, кісткова тканина, кисла фосфатаза, щури, експеримент.

S.V. Shpak

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor,
Odesa National Medical University,
2 Valikhovsky lane, Odesa, Ukraine, postal code 65082

CORRECTION OF BONE RESORPTION PARAMETERS IN RATS INDUCED BY MODELLING CHRONIC STRESS BY A THERAPEUTIC-PROPHYLACTIC COMPLEX

Chronic psycho-emotional stress disrupts bone remodelling, leading to enhanced resorption and suppressed osteogenesis. Comprehensive pharmacological strategies possessing antioxidant and membrane-stabilising properties remain insufficiently explored as means of correcting stress-induced skeletal alterations. **Aim of the study.** To evaluate the efficacy of a therapeutic-prophylactic complex in normalising bone resorption parameters in rats subjected to a model of chronic acoustic stress. **Materials and methods.** The study included 34 male Wistar rats (2 months old, body weight 140 ± 8 g), which were divided into three groups: an intact group ($n=10$), a group with induced chronic sound stress ($n=12$), and a group with induced stress followed by administration of a therapeutic-prophylactic complex (TPC) ($n=12$). Over 50 days, the rats in the second and third groups were exposed to chronic sound stress using an ultrasonic pest repellent. In the "stress + TPC" group, the rats additionally received the therapeutic-prophylactic complex. In mandibular homogenates, the activities of acid phosphatase (AP), alkaline phosphatase (ALP) and the mineralisation index (ALP/AP) were determined. Statistical processing was performed using STATISTICA 6.1 with Student's t-test ($p < 0.01$ was considered significant). **Results.** Chronic stress increased AP activity by 23.7% and reduced ALP activity by 33.0% versus intact controls, resulting in a 51.3% decline in the mineralisation index. TPC administration lowered AP activity by 31.2% and elevated ALP activity by 19.5% relative to the stress group, restoring the mineralisation index to 76% of the control value. **Conclusions.** The therapeutic-prophylactic drug complex effectively corrects stress-induced disturbances in bone remodelling by attenuating resorption and reinstating osteogenic activity. These findings support the prophylactic use of TPC to mitigate bone complications associated with chronic stress.

Key words: stress, bone tissue, acid phosphatase, rats, experiment.

Хронічне психоемоційне навантаження активує гіпоталамо-гіпофізарно-надниркову вісь, зумовлюючи надлишкове вивільнення каталітичних глюкокортикоїдів і формування системної стрес-реакції [1]. Одночасно зростає генерація реактивних форм кисню, що у поєднанні з низькорівневим запаленням ушкоджує клітинні мембрани та ініціює каскад ремоделювання кісткової тканини в бік резорбції [2].

Надмірне й тривале підвищення рівня ендогенних глюкокортикоїдів пригнічує експресію остеопротегерину й підсилює синтез RANKL, активуючи остеокластогенез і прискорюючи втрату кісткової маси [3]. При цьому інтенсивність деструкції тісно корелює з оксидативним стресом і системним запальним фоном.

Баланс між кісткоутворенням та резорбцією оцінюють за біохімічними маркерами: лужна фосфатаза (ЛФ) відображає активність остеобластів і мінералізацію матриксу, тоді як кисла фосфатаза (TRAP) є інтегральним індикатором остеокластичної резорбції [4]. Зміщення показника ЛФ/КФ у бік зменшення свідчить про перевагу катаболічних процесів у кістці.

Оксидативно-запальні механізми стрес-індукованого ушкодження кісткової тканини підтримуються дисбалансом антиоксидантної системи. Сучасні дослідження демонструють, що природні та синтетичні антиоксиданти, особливо у складі багатокомпонентних композицій, потенційно здатні гальмувати резорбцію, посилювати остеогенез і відновлювати мінералізацію [5].

Моделльні експерименти на тваринах підтверджують зв'язок між підвищеним оксидативним навантаженням, викликаним хронічним стресом, і прогресивною втратою альвеолярної кістки; водночас фармакологічна корекція антиоксидантами та мембраностабілізаторами достовірно знижує активність резорбтивних ферментів і покращує мінералізаційний індекс [6].

Дослідження впливу лікувально-профілактичного комплексу препаратів на біохімічні маркери ремоделювання кісткової тканини за умов хронічного стресу є актуальним з огляду на зростання поширеності стрес-асоційованих метаболічних уражень скелета та обмеженість даних щодо ефективності комплексних терапевтичних підходів.

Мета даного дослідження. Оцінка впливу лікувального комплексу препаратів на показники резорбції у кістковій тканині щурів на тлі моделювання хронічного стресу.

Матеріал та методи дослідження. Були проведені експериментальні дослідження, в процесі яких було використано 34 щурах-самцях лінії Wistar стадного розведення, 2-х місячного віку із середньою масою тіла 140 ± 8 г. Тварин утримували у звичайних умовах віварію при природному освітленні та з вільним доступом до води та їжі. На протязі всього періоду проведення експерименту були дотримані чітко мікрокліматичні умови навколишнього середовища віварію: темпера-

тура – $(19-23^{\circ}\text{C})$ та вологість – $(50-75\%)$. Експериментальні дослідження проводили в лабораторії біохімії та віварію ДУ «Інститут стоматології та щелепно-лицьової хірургії Національної академії медичних наук України» (ДУ «ІСЦЛХ НАМН»). Усі експерименти на щурах проводилися за затвердженими в ДУ «ІСЦЛХ НАМН» стандартними операційними процедурами, розробленими відповідно до Методичних вказівок Фармакологічного Комітету МОЗ України та Міжнародних правил роботи з лабораторними тваринами [7, 8].

Тварин розподілили на 3 групи наступним чином:

1 – інтактна (стандартний раціон віварію), $n=10$;

2 – модель хронічного звукового стресу, $n=12$;

3 – модель хронічного звукового стресу + комплекс препаратів, $n=12$.

Стрес моделювали за допомогою ультразвукового відлякувача шкідників LS-912 (виробник «Leaven Enterprise», Тайвань), що діє у чутному та ультразвуковому діапазонах та має частоту від 30 до 65 кГц. Звуковий тиск 130 дБ, потужність 1,5 Вт на площі до 232 м^2 .

Моделювання звукового стресу ультразвуком у щурів 2 та 3 групи здійснювали протягом 5 діб, по 6 годин на день за наступною схемою: на протязі 2-х днів – застосовували ультразвук із частотою 30 кГц, наступні 2 дні – по 40 кГц, наступні 2 дні – по 50 кГц, наступні 2 дні – по 60 кГц. Далі схему повторювали за допомогою ультра звуку. До ультра звуку кожного дня додавали чутний звук по 1 годині за допомогою фіксації кнопки контролю звуку на відлякувачі. На одному рівні з клітками тварин встановлювали відлякувач на відстані 3 м від них.

Тривалість експерименту склала 50 днів. Дослідних тварин виводили із експерименту етаназією під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом кровопускання з серця. У гомогенатах щелеп із розрахунку (75 мг/мл $0,1 \text{ М}$ цитратного буфера, $\text{pH } 6$) визначали активність маркера кісткоутворення – лужну фосфатазу (ЛФ) по гідролізу пара-нітрофенілфосфата при ($\text{pH } 10,5$), активність КФ – маркера резорбції. Індекс мінералізації розраховували по співвідношенню ЛФ/КФ [9, с. 50].

При статистичній обробці отриманих результатів використовувалася комп'ютерна програма STATISTICA 6.1. для оцінки їхньої достовірності та похибок вимірювань. Статистично значущу відмінність між альтернативними кількісними ознаками з розподілом, відповідним нормаль-

ному закону, оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента. Різницю вважали статистично значущою при $p < 0,01$ [10].

Результати та їх обговорення. На даному етапі дослідження вивчали вплив ЛПК препаратів на показники резорбції в кістковій тканині щурів на тлі хронічного стресу (табл.).

Лужна фосфатаза – неспецифічна монофосфостераза, присутня у остеобластах, фібробластах, макрофагах, слинних залозах, поліморфноядерних лейкоцитах, шлунково-кишковому тракті та у альвеолярній кістці. Лужна фосфатаза – каталізує реакцію відщеплення неорганічного фосфату і таким чином приводить до утворення проміжної сполуки – фосфосерилу. Цей фермент суттєво пов'язаний з активністю остеобластів, активність її може змінюватись при стоматологічних патологіях – карієсі, періімплантатах, захворюваннях пародонта, та ін. Фермент – кисла фосфатаза, яка діє при низьких значеннях рН (4,8) приводить до руйнування твердих тканин зуба.

За умов моделювання хронічного звукового стресу у дослідних щурів відбуваються негативні зміни у метаболізмі кісткової тканини щелеп. Так, із представлених цифрових даних таблиці 5 свідчить, що активність маркера остеобластів – активність лужної фосфатази у кістковій тканині щелеп дослідних тварин 2-ої групи за умов стресу суттєво знизилась на 33,0% ($p < 0,001$). Водночас, активність кислої фосфатази – показник маркеру остеорезорбції, що відображає розпад гідроксипатиту у кістковій тканині підвищилась на 23,7% ($p < 0,001$), у порівнянні із показниками інтактної групи. Також, на тлі моделювання хронічного звукового стресу індекс мінералізації по відношенню лужної фосфатази до кислої фосфатази значно знизився на 51,3% ($p_1 < 0,001$), що говорить про суттєве зрушення процесу ремоделювання кісткової тканини – про збільшення її резорбції.

Тривале застосування композиції препаратів на тлі хронічного стресу у 3-ій групі дослідних тварин сприяло достовірному зниженню кістко-

Таблиця 1

Показники резорбції в кістковій тканині щурів при хронічному стресі та під впливом лікувального-профілактичного комплексу препаратів, $M \pm m$

Показники Групи щурів	Активність кислої фосфатази, мккат/кг	Активність лужної фосфатази, мккат/кг	Індекс мінералізації ЛФ/КФ
Інтактна група, n=10	3,33±0,21	54,19±2,27	16,27±1,10
Хронічний стрес, n=12	4,58±0,32 $p < 0,01$	36,28±1,43 $p < 0,001$	7,92±0,56 $p < 0,001$
Хронічний стрес+ЛПК, n=12	3,49±0,16 $p > 0,6$ $p_1 < 0,02$	43,47±2,20 $p < 0,002$ $p_1 < 0,02$	12,45±0,98 $p < 0,001$ $p_1 < 0,002$

Примітка: p – достовірність відмінностей від показників в інтактній групі; p_1 – достовірність відмінностей від показників у групі «хронічний стрес».

вої кислої фосфатази (рН4,8) на 31,2% ($p_1 < 0,02$) та достовірному підвищенню маркера остеокластів – активності лужної фосфатази (рН 10,5) на 19,5% ($p_1 < 0,02$), по відношенню до показників 2-ої групи хронічний звуковий стрес. Отже, тривале застосування ЛПК препаратів за умов хронічного стресу призводить до стабілізації лізосомальних мембран та до зниження інтенсивності руйнування кісткової тканини щурів і говорить про активацію процесів мінералізації у кістковій тканині тварин. При цьому, мінералізуючий індекс, який слугує про перевагу одного із складових процесу ремоделювання кісткової тканини тварин – резорбції чи остеогенезу, віро-

гідно збільшився на 57,1% ($p_1 < 0,0025$), у порівнянні із показниками 2-ої групи (хронічний стрес).

Таким чином, регулярне, пероральне довготривале застосування комплексу препаратів на тлі патології (хронічний звуковий стрес) стимулює процеси кісткоутворення та активність остеобластів.

Висновки:

1. Хронічний звуковий стрес порушує метаболічний баланс кісткової тканини щурів, достовірно підвищуючи активність кислої фосфатази та знижуючи лужну фосфатазу, що свідчить про перевагу компонента ремоделювання.

2. Лікувально-профілактичний комплекс препаратів забезпечує біохімічну корекцію стрес-індукованих змін: зменшує активність КФ, підвищує активність ЛФ і відновлює індекс мінералізації до рівня, близького до інтактного.

3. Отримані дані демонструють перспективність комбінованої фармакотерапії як засобу профілактики та лікування стрес-асоційованих порушень ремоделювання кісткової тканини.

4. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на оптимізацію дозувальних режимів для клінічного застосування.

Література:

1. Wippert P.M., Rector M., Kuhn G., Wuertz-Kozak K. Stress and alterations in bones: an interdisciplinary perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017. №8. P. 96. DOI: 10.3389/fendo.2017.00096

2. Ng J.S., Chin K.Y. Potential mechanisms linking psychological stress to bone health. *Int J Med Sci*. 2021. №18(3). P. 604–614.

3. Kelly R.R., McDonald L.T., Jensen N.R., Sidles S.J., LaRue A.C. Impacts of psychological stress on osteoporosis: clinical implications and treatment interactions. *Front Psychiatry*. 2019. №10. P. 200. DOI: 10.3389/fpsy.2019.00200

4. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020. №754. P. 144855. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855

5. Marcucci G., Domazetovic V., Nediani C., Ruzzolini J., Favre C., Brandi M.L., et al. Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches. *Antioxidants (Basel)*. 2023. №12(2). P. 373. DOI: 10.3390/antiox12020373

6. Castro M.M.L., Nascimento P.C., Souza-Monteiro D., Santos S.M., Arouck M.B., Garcia V.B., et al. Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats. *Int J Mol Sci*. 2020. №21(10). P. 3728. DOI: 10.3390/ijms21103728

7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasbourg. Council of Europe, 1986. №123. 51 p. Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.

8. Наказ України «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах». Міністерство освіти і науки України. 2012. №249.

9. Методи дослідження стану кишечника та кісток у лабораторних щурів. Довідник / О.А. Макаренко, та ін. Одеса: видавець С.Л. Назарчук, 2022. 81 с.

10. Рогач І.М., Керецман А.О., Сіткар А.Д. Правильно вибраний метод статистичного аналізу – шлях до якісної інтерпретації даних медичних досліджень. *Науковий вісник Ужгородського університету*. 2017. Вип. 2. С. 124–28.

References:

1. Wippert, P. M., Rector, M., Kuhn, G., & Wuertz-Kozak, K. (2017). Stress and alterations in bones: an interdisciplinary perspective. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 96. DOI: 10.3389/fendo.2017.00096

2. Ng, J. S., & Chin, K. Y. (2021). Potential mechanisms linking psychological stress to bone health. *International Journal of Medical Sciences*, 18(3), 604–614.

3. Kelly, R. R., McDonald, L. T., Jensen, N. R., Sidles, S. J., & LaRue, A. C. (2019). Impacts of psychological stress on osteoporosis: clinical implications and treatment interactions. *Frontiers in Psychiatry*, 10, 200. DOI: 10.3389/fpsy.2019.00200

4. Vimalraj, S. (2020). Alkaline phosphatase: structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*, 754, 144855. DOI: 10.1016/j.gene.2020.144855

5. Marcucci, G., Domazetovic, V., Nediani, C., Ruzzolini, J., Favre, C., Brandi, M. L., & et al. (2023). Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches. *Antioxidants*, 12(2), 373. DOI: 10.3390/antiox12020373

6. Castro, M. M. L., Nascimento, P. C., Souza-Monteiro, D., Santos, S. M., Arouck, M. B., Garcia, V. B., & et al. (2020). Blood oxidative stress modulates alveolar bone loss in chronically stressed rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3728. DOI: 10.3390/ijms21103728

7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986). Strasbourg. Council of Europe. Retrieved from <https://rm.coe.int/168007a67b>.

8. Nakaz Ukrainy «Pro zatverdzhennya Poryadku provedennya naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperimentiv na tvarynah» [Order of Ukraine «On Approval of the Procedure for Conducting Experiments and Experiments on Animals by Scientific Institutions»]. *Ministerstvo osvity i nauky Ukrainy – Ministry of Education and Science of Ukraine*. zakon.rada.gov.ua. [in Ukrainian].

9. Makarenko O.A., Khromahina L.M., Khodakov I.V., Maikova H.V., Mudryk L.M., Kika V.V., & Mohilevska T.V. (2022). *Metody doslidzhennia stanu kyshechnyku ta kistok u laboratornykh shchuriv. Dovidnyk [Methods for studying the state of the intestine and bones in laboratory rats. Handbook]*. Odesa : vydavets S.L. Nazarchuk.

10. Rohach, I.M., Keretsman, A.O., & Sitkar, A.D. (2017). Pravylno vybranyy metod statystychnoho analizu – shlyakh do yakisnoyi interpretatsiyi danykh medychnykh doslidzen [Correct choice of statistical analysis method is the key way to high-quality interpretation of data of medical research]. *Naukovyy visnyk Uzhhorodskoho universytetu – Scientific Bulletin of Uzhgorod University*, 2(56), 124–28 [in Ukrainian].