

Диет-индуцированные модели метаболических нарушений. Сообщение 7: экспериментальный остеопороз

М.Н. Макарова, доктор медицинских наук, директор,

В.Г. Макаров, доктор медицинских наук, профессор, зам. директора

Санкт-Петербургский институт фармации,

188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Ключевые слова: остеопороз, диет-индуцированные модели

Резюме

Высокий уровень заболеваемости остеопорозом диктует необходимость поиска путей его эффективной профилактики и лечения, в том числе и путем экспериментов на животных. Из огромного количества моделей на разных видах животных (грызунах, кроликах, овцах и т.д.) наиболее часто используются крысы, которые не только имеют сходство патофизиологических реакций скелета с таковыми у человека, но и удобны в обслуживании, содержании и разведении, дешевы и не имеют таких этических ограничений, как собаки, кошки, обезьяны и т.п. При этом применяют в основном крыс диких аутбредных линий (Sprague Dawley и др.).

Для индукции остеопороза наиболее пригодны комплексные методы, сочетающие в себе овариоэктомию у самок или орхидэктомию у самцов, с одновременным введением глюкокортикостероидов на фоне рациона питания, дефицитного по кальцию, а иногда и по фосфору, и витамину D. При этом самки предпочтительнее самцов в связи с более быстрым развитием у них остеопороза. Обычно для моделирования остеопороза применяют синтетические рационы питания с содержанием 0,1% кальция и меньше (контрольные животные получают рацион с 0,6 до 1,1% кальция).

Для оценки наличия остеопороза у экспериментальных животных следует использовать показатели, характеризующие как интенсивность формирования костной ткани (активность щелочной фосфатазы, содержание остеокальцина и проколлаген I полипептидов сыворотки крови), так и уровень резорбции костей (активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы сыворотки крови, содержание гидроксипролина и пиридинолинов в моче). Кроме того, важно выявление содержания кальция и фосфора в сыворотке крови, выведение кальция с мочой, минеральная плотность костных тканей, масса бедренных костей и их испытание на разрыв, а также гистоморфология костных тканей. У животных с остеопорозом наиболее часто изменяются показатели, характеризующие прочность костных тканей и их массу, активность

щелочной фосфатазы, массы тела, выведения кальция с мочой. При этом содержание кальция и фосфора сыворотки крови существенно не изменяется.

Введение

Высокий уровень заболеваемости остеопорозом, тяжелые отдаленные последствия (переломы, ограничение подвижности), высокая смертность, большие финансовые затраты на лечение и резкое снижение качества жизни больных свидетельствуют о тяжести этого заболевания у людей. Причем рост продолжительности жизни населения планеты в настоящее время ведет к увеличению заболеваемости остеопорозом, сопутствующей старению. Для лучшего понимания многофакторной природы остеопороза и разработки новых профилактических и лечебных методов необходимо использование экспериментальных моделей этого заболевания на животных.

Для моделирования остеопороза используются разные виды животных: грызуны, кролики, овцы, свиньи, собаки, кошки и обезьяны. При этом известно множество моделей индукции остеопороза у животных: овариоэктомия и орхидэктомия, введение кортикостероидов, дефицит кальция, иммобилизация конечности, применение генетически модифицированных животных, предрасположенных к остеопорозу, и др.

Цель настоящего обзора литературы – обоснование наиболее адекватных моделей диет-индуцированного остеопороза для проведения экспериментальных исследований по поиску путей лечения и профилактики этого заболевания.

Характеристика остеопороза

Остеопороз (ОП) – хроническое, прогрессирующее, системное заболевание костной ткани, характеризующееся уменьшением ее минеральной плотности, снижением костной массы в единице объема и нарушением структуры, что приводит к снижению прочности костей и повышению риска их переломов [1–4].

Выделяют первичный (постменопаузальный, сенильный и идиопатический) и вторичный ОП. При этом до 85% случаев составляет первичный ОП. В частности постменопаузальный остеопороз, называемый «молчаливой эпидемией», поражает около 50% женщин в постменопаузе [5]. Причинами вторичного ОП, наряду с заболеваниями эндокринной системы (сахарный диабет, гиперпаратиреоз, тиреотоксикоз и др.), кишечника (хронический энтерит, болезнь Крона, целиакия, язвенный колит), почек (хроническая почечная недостаточность), печени, крови (множественная миелома, лейкемия и др.), алкоголизмом, является длительный прием глюкокортикостероидов и недостаточная обеспеченность кальцием и витамином D [1, 6].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила ОП в число 10 основных современных массовых неинфекционных заболеваний, причем по своей медицинской и социально-экономической значимости ОП занимает 4-е место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, а также сахарного диабета. По данным ВОЗ, в конце XX века в пересчете на все население старше 50 лет остеопороз выявлялся у 13–18% женщин и 7–8% мужчин. В связи с прогрессирующим старением населения мира распространенность остеопороза в XXI веке увеличивается [1].

По частоте госпитализаций ОП стоит вслед за инсультом, инфарктом миокарда и раковыми заболеваниями [2]. Увеличение распространенности ОП диктует необходимость разработки

адекватных мер по профилактике и лечению этого непростого заболевания, в том числе путем экспериментальных исследований на животных.

Остановимся на таких основных факторах риска возникновения ОП, как дефицит половых гормонов и неполноценное питание. При этом на одно из первых мест следует поставить дефицит женских и мужских половых гормонов, недостаточную обеспеченность организма кальцием и витамином D, а также факторы, ведущие к их дефициту [7].

Виды животных и рационы питания, используемые для индукции остеопороза

Идеальная модель экспериментального остеопороза должна соответствовать комплексу различных критериев. При этом выделяют 3 основных аспекта: удобство, релевантность и целесообразность [4]. Удобство характеризуется легкостью обслуживания, содержания и низкой стоимостью разведения экспериментальных животных, в то время как релевантность определяется соответствием данных, получаемых на животных, таковым у человека. И наконец, целесообразность оценивается по комплексу таких факторов, как доступность животных, эффективность их использования, этические соображения и генетическое единообразие между видами.

Указанным критериям лучше всего соответствуют грызуны (в основном крысы и мыши). Поэтому их наиболее часто используют для экспериментального моделирования остеопороза [4, 8]. Грызуны недороги, просты в разведении и уходе, имеют небольшую продолжительность жизни и четкие генетические линии [4]. Методик индукции остеопороза на грызунах (в частности, мышах линии SAMP6) довольно много: удаление яичников и яичек, кальций-дефицитный рацион, введение кортикостероидов, иммобилизация и генетическая модификация [4]. Однако моделям на грызунах присущи и многочисленные ограничения, сужающие круг возможностей их использования: отсутствие Гаверсовой системы (остеонов), медленное уменьшение костной массы, они слишком малы для исследования протезирования и отбора достаточного количества крови (особенно мыши) и др. [4].

Кроме того, есть исследователи, которые используют модели остеопороза на кроликах, овцах и мини-свиньях, очень редко – на козах, собаках, кошках и обезьянах. Следует отметить, что хотя мини-свиньи и обезьяны физиологически наиболее близки человеку, они очень дороги как сами по себе, так и в обслуживании, особенно это касается обезьян, в отношении которых очень важен еще и этический аспект, так же как и в отношении собак и кошек. Модели на кроликах и овцах довольно широко распространены, но эти животные как травоядные, менее близки организму человека [4]. Кроме того, для развития остеопороза у овец и редко используемых коз необходимо от 6 до 30 мес [9], что гораздо дольше, чем у грызунов. Моделирование наиболее распространенного постменопаузального ОП осуществляется с помощью овариоэктомии [10], которая, наряду с прочими изменениями, приводит к увеличению хрупкости костей и снижению прочности костной ткани [5].

Кальций и фосфор необходимы для нормального роста и минерализации костных тканей, однако и у овец, и у таких маложивущих животных, как мыши и крысы, одним только кальций-фосфор-дефицитным рационом добиться остеопороза довольно сложно, поэтому дополнительно используют овариоэктомию/орхидэктомию и для ускорения процесса – введение глюкокортикостероидов [8–10]. Так, например, дексаметазон в дозе 0,3 мг/кг, вводимый овариоэктомированным крысам даже 1 раз в 2 нед в течение не менее 1 мес, существенно снижает плотность костной ткани в позвонках, а через 3 мес – в костях таза [11]. Следует отметить, что как овариоэктомия усиливает остеопоретическое действие

кальций-дефицитного рациона, так и создание дефицита кальция ускоряет развитие остеопороза у овариоэктомированных животных. Иногда используют рационы, дефицитные по кальцию, фосфору и витамину D [9].

Самки крыс, подвергнутые овариоэктомии, участвуют в экспериментах гораздо чаще, чем самцы с удаленными яичками, так как у последних остеопороз развивается медленнее. Так, например, J.H. Park et al. [12] использовали молодых 6-недельных овариоэктомированных самок Sprague–Dawley, получавших 12 нед рацион питания с 0,1% кальция; контролем служили овариоэктомированные животные на рационе питания с 0,6% кальция. X.Gao et al. [10] также предлагают рацион с 0,1% кальция, однако для контроля рекомендуют рацион питания с 1,1% кальция в течение 12 нед у крыс 8-недельного возраста. Для формирования синтетического рациона питания, дефицитного по кальцию и фосфору, грызунам предлагается стандартный рацион и солевая смесь без этих 2 элементов следующего состава (%): KCl – 57,7; NaCl – 20,9; MgSO₄ – 17,9; FeSO₄·7H₂O – 3,22; CuSO₄·5H₂O – 0,078; NaF – 0,133; CoCl₂·6H₂O – 0,004; KI – 0,01; MnSO₄·5H₂O – 0,06; ZnSO₄·7H₂O – 0,44; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O – 0,005. При этом необходимо учитывать, что казеин содержит 22 мг% кальция и 400 мг% фосфора [13].

Показатели, используемые для оценки остеопороза у животных

Для подтверждения развития остеопороза у экспериментальных животных используют такие показатели, как содержание кальция, фосфора и остеокальцина в сыворотке крови, кальция, гидроксипролина и пиридинолинов – в моче, активность щелочной фосфатазы и тартрат-резистентной кислой фосфатазы сыворотки крови, минеральную плотность костных тканей, массу бедренных костей и их испытание на разрыв, а также денситометрию и гистоморфологию костных тканей [10, 12, 14, 15].

Так, в частности, если активность щелочной фосфатазы является маркером формирования костной ткани, то активность тартрат-резистентной кислой фосфатазы – маркер резорбции костей [16]. Кроме того, о формировании костной ткани свидетельствуют содержание остеокальцина и проколлаген I полипептидов в сыворотке крови, а уровень костной резорбции отражают такие показатели, как гидроксипролин и пиридинолины мочи [15]. Согласно определению ВОЗ, о развитии остеопороза свидетельствует снижение минеральной плотности костной ткани более чем на 2,5 стандартных отклонения [5]. Что касается костной массы, то ее существенное снижение (более 30%) в губчатой кости проксимального метафиза большеберцовой кости отмечается у крыс уже на 14-й день после овариоэктомии, в шейке бедренной кости – на 30-й день, в теле поясничного позвонка – на 60-й день [8].

Согласно данным таблицы, развитие остеопороза у овариоэктомированных крыс на кальций-дефицитном рационе сопровождается существенным увеличением активности щелочной фосфатазы и небольшим – тартрат-резистентной кислой фосфатазы, снижением веса высушенной бедренной кости и ее золы, а также уменьшением усилия, необходимого для разрыва кости, на фоне выраженного роста массы тела. Кроме того, отмечено выраженное уменьшение плотности костной ткани бедра и позвоночника. При этом, если содержание кальция и фосфора в сыворотке крови существенно не менялось, то выведение кальция с мочой у подопытных крыс было в 3 раза меньше, чем у контрольных.

Некоторые показатели, используемые для оценки остеопороза у крыс на различных рационах

Показатель	Рационы			
	СР	КаДР	СР	КаДР
	Виды животных			
	Крысы Sprague–Dawley		Крысы Sprague–Dawley	
Кальций сыворотки, мг/дл	9,23±0,11	9,18±0,23	8,96±0,33	9,17±0,64
Кальций мочи, мг/дл	–	–	1,04±0,19	0,35±0,02*
Фосфор сыворотки, мг/дл	5,47±0,30	5,95±0,43	–	–
Щелочная фосфатаза, Ед/л	30,97±1,09	57,88±2,92*	32,83±3,42	68,68±10,80*
Тартрат-резистентная кислая фосфатаза, Ед/л	30,69±,84	37,96±6,35	10,87±0,95	12,87±1,68
Вес высушенной бедренной кости, г/100 г массы тела	0,378±0,013	0,284±0,010*	–	–
Вес золы бедренной кости, г/100 г массы тела	0,239±0,008	0,154±0,008*	–	–
Усилие для разрыва кости, 106 дин/100 г массы тела	7,0±0,3	4,1±0,1*	21,1±0,9	12,1±0,5*
МПК голени, мг/ см ²	–	–	167,1±3,0	113,5±1,4*
МПК позвоночника, мг/см ²	–	–	202,1±3,4	150,9±1,5*
Масса тела, г	321,81±11,10	432,81±18,10*	277,0±10,8	354,7±4,8*
Время на рационе, нед	12		9	
Источник	[12]		[17]	

Примечания. СР – стандартный рацион контрольных крыс (0,6% кальция); КаДР – кальций-дефицитный рацион овариоэктомированных крыс (0,1% кальция); МПК – минеральная плотность костной ткани; * – $p < 0,05$.

Заключение

Как показал анализ современной литературы, наиболее адекватными моделями остеопороза по большинству критериев являются часто используемые исследователями грызуны (крысы и мыши). Для непосредственного моделирования остеопороза чаще всего применяют овариоэктомию у самок, реже – орхидэктомию у самцов с одновременным содержанием животных на кальций-дефицитном рационе 0,1% кальция. При этом самки животных используются гораздо чаще, так как у самцов остеопороз развивается медленнее. Для

ускорения развития остеопороза дополнительно используют введение глюкокортикостероидов (например, дексаметазон в дозе 0,3 мг/кг). Реже применяют рационы со сниженным содержанием не только кальция, но и фосфора и (или) витамина D.

Для оценки наличия остеопороза и эффективности исследуемых лечебно-профилактических средств широко применяют такие показатели, как содержание кальция и фосфора в сыворотке крови, кальция, гидроксипролина и пиридинолинов – в моче, активность щелочной фосфатазы и тартрат-резистентной кислой фосфатазы сыворотки крови, массу бедренных костей и их испытание на разрыв, минеральную плотность и гистоморфологию костных тканей.

При этом у овариоэктомированных животных на кальций-дефицитном рационе отмечаются наиболее выраженные изменения активности щелочной фосфатазы, выведения кальция с мочой, плотности костных тканей, массы высушенных костных тканей и их золы, а также усилия, необходимого для разрыва костей.

Список литературы

1. Смолянский Б.Л., Лифляндский В.Г. Лечение остеопороза. – СПб.: Издательский дом «Нева», 2006: 256. [Smolyanskii B.L., Lifyandskii V.G. Lechenie osteoporoz. SPb.: Izdatel'skii dom «Neva», 2006: 256 (in Russ)].
2. Наумов А.В., Верткин А.Л. Остеопороз. Руководство для практических врачей. Серия «Амбулаторный прием» М.: Эксмо, 2014: 127. [Naumov A.V., Vertkin A.L. Osteoporoz. Rukovodstvo dlya prakticheskikh vrachei. Seriya «Ambulatornyi priem» M.: Eksmo, 2014: 127 (in Russ)].
3. Henriksen K., Christiansen C., Karsdal M.A. Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Climacteric*. 2015;18 Suppl 2:10-8. DOI: 10.3109/13697137.2015.1101256.
4. Calciolari E., Donos N., Mardas N. Osteoporotic Animal Models of Bone Healing: Advantages and Pitfalls. *J. Invest. Surg.*, 2017 Oct; 30 (5): 342–50. DOI: 10.1080/08941939.2016.1241840
5. Satpathy S., Patra A., Ahirwar B. Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis. *J. Complement. Integr. Med.* 2015 Dec; 12 (4): 251–66. DOI: 10.1515/jcim-2015-0034.
6. Eastell R., O'Neill T.W., Hofbauer L.C., Langdahl B., Reid I.R., Gold D.T., Cummings S.R. Postmenopausal osteoporosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016 Sep 29;2:16069. DOI: 10.1038/nrdp.2016.69.
7. Смолянский Б.Л., Лифляндский В.Г. Лечебное питание. Карманный справочник. М.: «ОЛМА Медиа Групп», 2010: 800. [Smolyanskii B.L., Lifyandskii V.G. Lechebnoe pitanie. Karmannyi spravochnik. M.: «OLMA Media Grupp», 2010: 800 (in Russ)].
8. Ларцев Ю.В., Шерешовец А.А. Выбор оптимальной экспериментальной модели остеопороза. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2015. т.17; 5 (3): 810–12. [Lartsev Yu.V., Shereshovets A.A. Vybora optimal'noi eksperimental'noi modeli osteoporoz. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2015. Vol.. 17; 5 (3): 810–2 (in Russ)].
9. Dias I.R., Camassa J.A., Bordelo J.A., Babo P.S., Viegas C.A., Dourado N., Reis R.L., Gomes M.E. Preclinical and Translational Studies in Small Ruminants (Sheep and Goat) as Models for Osteoporosis Research. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2018 Apr; 16 (2): 182–7. DOI: 10.1007/s11914-018-0431-2.
10. Gao X., Ma W., Dong H., Yong Z., Su R. Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014 Jul 15; 7 (8): 5123–8.
11. Zhang Z., Ren H., Shen G., Qiu T., Liang D., Yang Z., Yao Z., Tang J., Jiang X., Wei Q. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. *Biomed. Pharmacother.* 2016 Dec; 84: 438–46. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.045.
12. Park J.H., Omi N., Nosaka T., Kitajima A., Ezawa I. Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. *J. Bone Miner. Metab.* 2008; 26 (3): 218–25. DOI: 10.1007/s00774-007-0822-4.

13. Aikawa Y., Agata U., Kakutani Y., Kato S., Noma Y., Hattori S., Ogata H., Ezawa I., Omi N. The Preventive Effect of Calcium Supplementation on Weak Bones Caused by the Interaction of Exercise and Food Restriction in Young Female Rats During the Period from Acquiring Bone Mass to Maintaining Bone Mass. *Calcif. Tissue Int.* 2016 Jan; 98 (1): 94–103. DOI: 10.1007/s00223-015-0067-5. Epub 2015 Oct 28.
14. Lelovas P.P., Xanthos T.T., Thoma S.E., Lyritis G.P., Dontas I.A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp. Med.* 2008 Oct; 58 (5): 424–30.
15. Vasikaran S.D. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2008; 45 (2): 221–58. DOI: 10.1080/10408360801949442.
16. Aikawa Y., Agata U., Kakutani Y., Higano M., Hattori S., Ogata H., Ezawa I., Omi N. The Interaction of Voluntary Running Exercise and Food Restriction Induces Low Bone Strength and Low Bone Mineral Density in Young Female Rats. *Calcif. Tissue Int.* 2015 Jul; 97 (1): 90–9. DOI: 10.1007/s00223-015-0005-6.
17. Hattori S., Agata U., Park J.H., Imura Y., Tokuda S., Ezawa I., Omi N. The relationship between salivary calcium concentration and differences in bone mineral density level in female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2014; 60 (3): 152–8.

Diet-induced models of metabolic disorders. Report 7: Experimental osteoporosis

M.N. Makarova,
V.G. Makarov

«Institute of Preclinical Research» Ltd. 188663, Russia, Leningrad oblast, Vsevolzhskiy district,
Kuzmolovskiy t.s., Zavodskaya st. 3-245

E-mail: makarova.mn@doclinika.ru

Keywords: osteoporosis, diet-induced model

Abstract

The high incidence of osteoporosis dictates the need to find ways to effectively prevent and treat it, including in animal experiments. Of the huge number of models on different types of animals (rodents, rabbits, sheep, etc.), the most part is used by rats, which not only have a similarity of pathophysiological reactions of the skeleton with those of man, but also convenient to maintain, maintain and breed, cheap and do not have such ethical restrictions as dogs, cats and monkeys, etc. In this case, apply mainly rats wild outbred lines (Sprague Dawley, etc.).

For the induction of osteoporosis, the most appropriate are complex methods that combine ovariectomy in females or orchidectomy in males, with simultaneous administration of corticosteroids against the background of a diet deficient in calcium, and sometimes in phosphorus and vitamin D. In This case, females are preferable to males due to the faster development of osteoporosis. Usually, synthetic diets containing 0.1% and less calcium are used to model osteoporosis (control animals receive a diet with 0.6–1.1% calcium).

To assess the presence of osteoporosis in experimental animals should be used indicators characterizing both the intensity of bone formation (activity of alkaline phosphatase, the content of osteocalcin and procollagen I serum polypeptides), and the level of bone resorption (activity of tartrate-resistant acid phosphatase of blood serum, the content of hydroxyproline and pyridinolines in urine). In addition, it is important to the content of calcium and phosphorus in the blood serum, excretion of calcium in the urine, bone mineral density, weight of the thighs and their rupture test, as well as histomorphology of bone tissues. It is shown that the greatest changes in animals with osteoporosis are characteristic of indicators characterizing the strength of bone tissues and their weight, the activity of alkaline phosphatase, body weight, excretion of calcium in the urine, while the content of calcium and serum phosphorus does not change significantly.

Full text available only in Russian

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Смолянский Б.Л., Лифляндский В.Г. Лечение остеопороза. – СПб.: Издательский дом «Нева», 2006: 256. [Smolyanskii B.L., Lifyandskii V.G. Lechenie osteoporoz. SPb.: Izdatel'skii dom «Neva», 2006: 256 (in Russ)].
2. Наумов А.В., Верткин А.Л. Остеопороз. Руководство для практических врачей. Серия «Амбулаторный прием» М.: Эксмо, 2014: 127. [Naumov A.V., Vertkin A.L. Osteoporoz. Rukovodstvo dlya prakticheskikh vrachei. Seriya «Ambulatornyi priem» M.: Eksmo, 2014: 127 (in Russ)].
3. Henriksen K., Christiansen C., Karsdal M.A. Role of biochemical markers in the management of osteoporosis. *Climacteric*. 2015;18 Suppl 2:10-8. DOI: 10.3109/13697137.2015.1101256.
4. Calciolari E., Donos N., Mardas N. Osteoporotic Animal Models of Bone Healing: Advantages and Pitfalls. *J. Invest. Surg.*, 2017 Oct; 30 (5): 342–50. DOI: 10.1080/08941939.2016.1241840
5. Satpathy S., Patra A., Ahirwar B. Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis. *J. Complement. Integr. Med.* 2015 Dec; 12 (4): 251–66. DOI: 10.1515/jcim-2015-0034.
6. Eastell R., O'Neill T.W., Hofbauer L.C., Langdahl B., Reid I.R., Gold D.T., Cummings S.R. Postmenopausal osteoporosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016 Sep 29;2:16069. DOI: 10.1038/nrdp.2016.69.
7. Смолянский Б.Л., Лифляндский В.Г. Лечебное питание. Карманный справочник. М.: «ОЛМА Медиа Групп», 2010: 800. [Smolyanskii B.L., Lifyandskii V.G. Lechebnoe pitanie. Karmannyi spravochnik. M.: «OLMA Media Grupp», 2010: 800 (in Russ)].
8. Ларцев Ю.В., Шерешовец А.А. Выбор оптимальной экспериментальной модели остеопороза. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 2015. т.17; 5 (3): 810–12. [Lartsev Yu.V., Shereshovets A.A. Vybore optimal'noi eksperimental'noi modeli osteoporoz. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*, 2015. Vol.. 17; 5 (3): 810–2 (in Russ)].
9. Dias I.R., Camassa J.A., Bordelo J.A., Babo P.S., Viegas C.A., Dourado N., Reis R.L., Gomes M.E. Preclinical and Translational Studies in Small Ruminants (Sheep and Goat) as Models for Osteoporosis Research. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2018 Apr; 16 (2): 182–7. DOI: 10.1007/s11914-018-0431-2.
10. Gao X., Ma W., Dong H., Yong Z., Su R. Establishing a rapid animal model of osteoporosis with ovariectomy plus low calcium diet in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2014 Jul 15; 7 (8): 5123–8.
11. Zhang Z., Ren H., Shen G., Qiu T., Liang D., Yang Z., Yao Z., Tang J., Jiang X., Wei Q. Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. *Biomed. Pharmacother.* 2016 Dec; 84: 438–46. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.045.
12. Park J.H., Omi N., Nosaka T., Kitajima A., Ezawa I. Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. *J. Bone Miner. Metab.* 2008; 26 (3): 218–25. DOI: 10.1007/s00774-007-0822-4.
13. Aikawa Y., Agata U., Kakutani Y., Kato S., Noma Y., Hattori S., Ogata H., Ezawa I., Omi N. The Preventive Effect of Calcium Supplementation on Weak Bones Caused by the Interaction of Exercise and Food Restriction in Young Female Rats During the Period from Acquiring Bone Mass to Maintaining Bone Mass. *Calcif. Tissue Int.* 2016 Jan; 98 (1): 94–103. DOI: 10.1007/s00223-015-0067-5. Epub 2015 Oct 28.
14. Lelovas P.P., Xanthos T.T., Thoma S.E., Lyritis G.P., Dontas I.A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp. Med.* 2008 Oct; 58 (5): 424–30.
15. Vasikaran S.D. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2008; 45 (2): 221–58. DOI: 10.1080/10408360801949442.
16. Aikawa Y., Agata U., Kakutani Y., Higano M., Hattori S., Ogata H., Ezawa I., Omi N. The Interaction of Voluntary Running Exercise and Food Restriction Induces Low Bone Strength and Low Bone Mineral Density in Young Female Rats. *Calcif. Tissue Int.* 2015 Jul; 97 (1): 90–9. DOI: 10.1007/s00223-015-0005-6.
17. Hattori S., Agata U., Park J.H., Imura Y., Tokuda S., Ezawa I., Omi N. The relationship between salivary calcium concentration and differences in bone mineral density level in female rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 2014; 60 (3): 152–8.