

УДК 616.71–007.234–092.9: 615.916:175

ХАРАКТЕР РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ КОСТЕЙ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НИТРАТА НАТРИЯ

Сорокин Б.В., Костенко В.А.

Высшее государственное учебное заведение Украины «Украинская медицинская стоматологическая академия», Полтава, Украина

Известно, что избыточное образование оксида азота (NO) из экзогенных предшественников (нитратов и нитритов) существенно изменяет направленность физиологических эффектов NO, приводит к трудно прогнозируемым последствиям. Механизмы действия избыточного количества NO на костную ткань выяснены недостаточно. Целью работы было изучение маркеров ремоделирования костной ткани различных отделов скелета (большеберцовая кость, позвонки) белых крыс при воспроизведении глюкокортикоидного остеопороза на фоне хронической интоксикации нитратом натрия. В эксперименте на 40 белых крысах линии Вистар массой 180–230 г исследовали показатели активности щелочной фосфатазы, кислой фосфатазы и её тартратрезистентной изоформы в сыворотке крови кинетическим методом. Выделяли и скелетировали большеберцовые кости (ББК), а также третий поясничный позвонок, проводили их остеометрию, рассчитывали индекс Simon, показатели плотности и минеральной насыщенности костей. Выявили, что моделирование глюкокортикоидного остеопороза на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается высоким костным обменом, при котором повышенная резорбция не компенсируется процессом формирования кости. При этом отмечается снижение плотности ББК и поясничных позвонков, их прочностных характеристик, минеральной насыщенности поясничных позвонков. Полученные результаты подчеркивают опасность применения препаратов-донаторов NO для лечения остеопороза в загрязненных неорганическими нитросоединениями регионах.

Ключевые слова: ремоделирование костей, экспериментальный глюкокортикоидный остеопороз, хроническая интоксикация нитратом натрия, оксид азота.

Введение

Под ремоделированием кости понимают естественный синхронизированный во времени механизм разрушения и одновременного воссоздания структур костной ткани, обеспечивающий структурную адаптацию кости к изменяющимся условиям функционирования. Этот процесс включает фазы активации остеокластов, резорбции кости, реверсии – активации остеобластов, формирования кости, минерализации костного матрикса и покоя [10].

При остеопорозе (ОП) происходит нарушение процессов ремоделирования кости, сопровождающееся изменениями биохимических маркеров и показателей структурной композиции костной ткани [4, 10]. Выделяют состояния с высоким костным обменом, при котором резорбция не компенсируется нормальным или повышенным процессом костеобразования; а также с низким костным обменом, когда процесс резорбции находится на нормальном или даже пониженном уровне, но костеобразование при этом замедлено (например, при сенильном ОП).

В последние годы сообщается о негативном влиянии факторов окружающей среды на метаболизм и структуру костной ткани. В эксперименте на белых крысах показано, что хроническая интоксикация нитратом натрия приводит к деполимеризации биополимеров костной ткани (гликозаминогликанов, фуко- и сиалогликопротеинов), связанной с образованием продукта биотрансформации нитрат- и нитрит-ионов – оксида азота (NO) и, при взаимодействии последнего с супероксидным анион-радикалом, высокоокислительного пероксинитрита [2].

В литературе приводится противоречивая информация в отношении эффектов NO на метаболизм, функционирование и структуру костей [8, 9, 12]. Выявлена роль NO как медиатора действия цитокинов на активность остеобластов, направленность которого зависит от концентрации метаболитов NO. С одной стороны, сообщается,

что увеличение продукции NO приводит к снижению минеральной плотности костей, уменьшению количества остеобластов, увеличению остеокластов, что корректируется ингибиторами индуцибельной NO-синтазы [7]. С другой стороны, установлена ключевая роль эндотелиальной NO-синтазы в регуляции активности остеобластов и образовании костной ткани [9].

Известно, что избыточное образование NO из экзогенных предшественников (нитратов и нитритов) существенно изменяет направленность физиологических эффектов оксида азота, приводит к трудно прогнозируемым последствиям [3]. Однако механизмы действия избыточного количества NO на костную ткань выяснены недостаточно.

Целью работы было изучение маркеров ремоделирования костной ткани разных отделов скелета (большеберцовая кость, позвонки) белых крыс при воспроизведении глюкокортикоидного остеопороза на фоне хронической интоксикации нитратом натрия.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 40 белых крысах линии Вистар массой 180–230 г. В первой серии необходимые показатели изучали у интактных животных, во второй – после интрагастрального введения нитрата натрия (200 мг/кг массы тела) в течение 30 суток, в третьей – воспроизводили экспериментальный глюкокортикоидный ОП, в четвертой – глюкокортикоидный ОП воспроизводили на фоне хронической интоксикации нитратом натрия.

Для моделирования глюкокортикоидного ОП крысам через сутки (в течение 45 суток) внутримышечно вводили 2,5% раствор гидрокортизона ацетата в дозе 50 мг/кг массы тела [1]. При воспроизведении ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия гидрокортизона ацетат вводили, начиная с 16 суток интоксикации.

При проведении исследования руководствовались

принципами экспериментальной биоэтики. По истечении сроков эксперимента животных декапитировали под эфирным наркозом.

В сыворотке крови исследовали активность фермента – маркера формирования костной ткани – щелочной фосфатазы, маркеров резорбции кости – кислой фосфатазы и её тартратрезистентной изоформы кинетическим методом с использованием наборов фирмы “Ольвекс диагностика” (Россия).

Выделяли и скелетировали большеберцовые кости (ББК), а также третий поясничный позвонок. Проводили их остеометрию штангенциркулем с точностью до 0,05 мм. Помимо этого рассчитывали индекс Simon (как соотношение максимальной длины и кубического корня массы костного органа) [11], показатели плотности и минеральной насыщенности костей [5].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для проверки распределения на нормальность применяли расчет критерия Шапиро-Уилка. Если данные соответствовали нормальному распределению, то для их сравнения использовали t-критерий Стьюдента для независимых выборок. В случае, когда ряды данных не подлежали нормальному распределению, статистическую обработку осуществляли с использованием непараметрического метода – теста Манна-Уитни. Статистические расчеты проводили с использованием программ “Microsoft Excel 2007” и “StatisticSoft 6.0”.

Результаты и обсуждение

Нарушение процессов ремоделирования кости, как правило, сопровождается возникновением отклонений в уровне ряда биохимических маркеров. Так, моделирование ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается изменением показателей маркеров резорбции кости (табл. 1): увеличением активности кислой фосфатазы и ее костной изоформы – тартрат-резистентной кислой фосфатазы – соответственно, на 45,9% (p<0,01) и 44,3% (p<0,01) по сравнению с данными первой серии. Примечательно, что введение нитрата натрия и изолированное моделирование ОП существенно не влияет на активность этих ферментов.

Таблица 1 - Показатели активности ферментов – маркеров формирования и резорбции кости у крыс – при воспроизведении ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия (M ± m, n = 20)

Характер исследований	Показатели активности ферментов крови		
	Щелочная фосфатаза, ед. акт.	Кислая фосфатаза, ед. акт.	Тартрат-резистентная кислая фосфатаза, ед. акт.
Интактная группа	297.6 ±8.9	10.9 ±0.6	6.1 ±0.5
Введение нитрата натрия	326.2 ±18.0	12.9 ±1.1	7.0 ±0.8
Моделирование ОП	285.7 ±14.3	14.4 ±1.7	7.4 ±0.6
Нитрат натрия + ОП	278.6 ±17.7	15.9 ±1.3 *	8.8 ±0.5 *

При исследовании всех экспериментальных групп не выявлено значимых изменений активности маркера формирования кости – щелочной фосфатазы.

Полученные нами данные свидетельствуют, что ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия следует считать состоянием с высоким костным обменом, при котором повышенная резорбция не компенсируется нормальным или повышенным процессом костеобразования.

При оценке остеометрических показателей костей при воспроизведении ОП на фоне хронической интоксикации

нитратом натрия (табл. 2) обращает на себя внимание снижение массы нативной ББК – соответственно, на 38.0% (p<0,015) и 37,9% (p<0,01) по сравнению с данными первой и второй серии, а также позвонков – на 26,7% (p<0,001) по сравнению с данными интактной группы.

Таблица 2 - Остеометрические характеристики костей при воспроизведении ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия (M ± m, n = 20)

Характер исследований	Максимальная длина кости или высота тела позвонка, мм		Масса нативной кости, мг		Индекс Simon	
	ББК	Позвонки	ББК	Позвонки	ББК	Позвонки
Интактная группа	39.2 ±0.5	6.45 ±0.07	515.5 ±45.6	193.8 ±8.5	4.92 ±0.08	1.12 ±0.01
Введение нитрата натрия	38.9 ±0.6	6.41 ±0.09	515.2 ±37.2	181.5 ±18.3	4.88 ±0.11	1.14 ±0.02
Моделирование ОП	37.9 ±0.5	6.30 ±0.11	389.8 ±32.4	162.5 ±13.3	5.22 ±0.08 *	1.16 ±0.01 *
Нитрат натрия + ОП	37.3 ±0.4	6.28 ±0.06	319.7 ±15.4 **	142.1 ±2.0 *	5.47 ±0.06 **/**	1.20 ±0.01 **/**

Величина индекса Simon достоверно увеличивается при расчете показателей ББК и позвонков при изолированном моделировании ОП – соответственно, на 6,1% (p<0,05) и 3,6% (p<0,05) по сравнению с данными первой серии.

Воспроизведение ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается существенным повышением величины индекса Simon при расчете показателей ББК и позвонков как по сравнению с данными интактной группы – соответственно, на 11,2% (p<0,001) и 7,1% (p<0,001), так и других экспериментальных серий: второй – соответственно на 12,1% (p<0,01) и 5,3 (p<0,05) – и третьей – соответственно на 4,8% (p<0,05) и 3,4% (p<0,05).

При исследовании показателей структурной композиции костей (табл. 3) мы выявили значимое снижение плотности ББК и позвонков (соответственно, на 13.1% (p<0,05) и 14,0% (p<0,01)) и минеральной насыщенности позвонков (на 16,2%, p<0,05) при изолированном моделировании ОП.

Таблица 3 - Количественные показатели структурной композиции костей при воспроизведении ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия (M±m, n=20)

Характер исследований	Плотность, г/см ³		Минеральная насыщенность, г/см ³		Зольность, %	
	ББК	Позвонки	ББК	Позвонки	ББК	Позвонки
Интактная группа	0.84 ±0.03	1.21 ±0.03	0.46 ±0.02	0.68 ±0.03	55.6 ±4.6	56.2 ±3.6
Введение нитрата натрия	0.85 ±0.06	1.21 ±0.06	0.47 ±0.04	0.69 ±0.06	55.5 ±4.1	58.9 ±6.7
Моделирование ОП	0.73 ±0.03 *	1.04 ±0.03 *	0.39 ±0.02	0.57 ±0.03 *	54.6 ±4.8	55.7 ±3.6
Нитрат натрия + ОП	0.64 ±0.02 **/**	1.08 ±0.03 *	0.37 ±0.02 *	0.53 ±0.03 **/**	54.0 ±2.4	49.1 ±3.5

Воспроизведение ОП на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается существенным уменьшением величины плотности ББК – на 23.8% (p<0.001) по сравнению с данными первой серии, на 24.7% (p<0.02) – второй серии, на 12.3% (p<0.05) – третьей серии опытов. В этих условиях также достоверно снижается плотность позвонков – на 10.7% (p<0.02) по сравнению с данными интактной группы.

При этом минеральная насыщенность ББК на 19.6% (p<0.02) уступает величине первой серии опытов, а по-

звонков – соответственно, на 22.1% ($p < 0.01$) и 23.2% ($p < 0.05$) уступает данным как первой, так и второй экспериментальных групп.

В то же время во всех сериях опытов существенных изменений процента зольности мы не выявили.

Таким образом, моделирование глюкокортикоидного ОП на фоне избыточного образования NO из экзогенного источника (нитратов) сопровождается увеличением резорбции костной ткани с последующим снижением её плотности, минеральной насыщенности и прочностных характеристик. Учитывая данные литературы, свидетельствующие об увеличении минеральной плотности костной ткани и снижении её резорбции при применении органических нитратов (нитроглицерина и др.) [6], можно заключить о дозозависимом характере нарушений ремоделирования костей в организме млекопитающих.

Литература

1. Батура, І.О. Морфологічні характеристики остеонних констукцій в умовах високих концентрацій глюкокортикоїдів в організмі експериментальних тварин / І.О. Батура // Укр. морфол. альм. – 2005. – № 1. – С. 107.
2. Вплив пригнічення та індукції NO-синтаз на біохімічний склад кісткової тканини нижньої щелепи при відтворенні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К.П. Должкова [та ін.] // Пробл. екол. та мед. – 2010. – Т. 14, № 1–2. – С. 35–38.
3. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко [та ін.] // Актуал. пробл. сучасн. мед. : Вісн. Укр. мед. стоматол. акад. – 2011. – Т. 11, № 3. – С. 150-154.
4. Патогенетические механизмы и лабораторная диагностика метаболических нарушений при остеопорозе / Л.И. Алехнович [и др.] // Медицина. – 2012. – № 2. – С. 19-29.
5. Ступаков, Г.П. Костная система и невесомость / Г.П. Ступаков, А.И. Воложин. – М. : Наука, 1989. – 184 с.
6. Effect of nitroglycerin ointment on bone density and strength in postmenopausal women: a randomized trial / Jamal S.A. [et al.] // JAMA. – 2011. – Vol. 305, № 8. – P. 800-807.
7. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis / K.E. Armour [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 1999. – Vol. 14, № 12. – P. 2137-2142.
8. Increased nitric oxide-mediated vasodilation of bone resistance arteries is associated with increased trabecular bone volume after endurance training in rats / J.M. 2nd Dominguez [et al.] // Bone. – 2010. – Vol. 46, № 3. – P. 813-819.
9. Nitric oxide and bone / R.J. Hof. [et al.] // Immunology. – 2001. – Vol. 103, № 3. – P.255-261.
10. Seeman, E. Bone modeling and remodeling / E. Seeman // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. – 2009. – Vol.19, №3.– P. 219-233.
11. The effects of simulated increases in body weight for 60 days on robusticity and mineral content of limb bones of hypophysectomized rats / M.R. Simon [et al.] // Anat. Rec. – 1984. – Vol. 210, № 2. – P. 333-341.
12. Wimalawansa, S.J. Nitric oxide and bone / S.J. Wimalawansa // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1192. – P. 391-403.

ших. Этот факт подчеркивает опасность использования донаторов NO для лечения остеопороза у пациентов, проживающих в загрязненных неорганическими нитросоединениями регионах.

Выводы

1. Моделирование глюкокортикоидного остеопороза на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается высоким костным обменом, при котором повышенная резорбция не компенсируется процессом формирования кости.
2. Воспроизведение глюкокортикоидного остеопороза на фоне хронической интоксикации нитратом натрия сопровождается снижением плотности большеберцовой кости и поясничных позвонков, их прочностных характеристик (увеличение индекса Simon), минеральной насыщенности поясничных позвонков.

Literature

1. Batura, I.O. Morfolohichni kharakterystyky osteonnykh konstruksiy v umovakh vysokoykh kontsentratsiy hlyukokortykoidiv v orhanizmi eksperymental'nykh tvaryn / I.O. Batura // Ukr. morfol. Al'm. – 2005. – № 1. – S. 107.
2. Vplyv pryhnychennya ta induksii NO-syntaz na biokhimichniy sklad kistkovoї tkanyny nyzhn'oi shcheply pry vidtvorenni ii perelomu na tli khronichnoi intoksykatsii nitratom natriyu / K.P. Dolzhkova [ta in.] // Probl. ekol. ta med. – 2010. – T. 14, № 1–2. – S. 35–38.
3. Mekhanizmy avtorehulyatsii utvorennya oksydu azotu v orhanizmi ssavtsiv ta ikh porushennya pry rozvytku patolohichnykh protsesiv / V.O. Kostenko [ta in.] // Aktual. probl. suchasn. med. : Visn. Ukr. med. stomatol. akad. – 2011. – T. 11, № 3. – С. 150-154.
4. Patogeneticheskiye mekhanizmy i laboratornaya diagnostika metabolicheskikh narusheniy pri osteoporoze / L.I. Alekhnovich [i dr.] // Meditsina. – 2012. – № 2. – S. 19-29.
5. Stupakov, G.P. Kostnaya sistema i nevesomost' / G.P. Stupakov, A.I. Volozhin. – M. : Nauka, 1989. – 184 s.
6. Effect of nitroglycerin ointment on bone density and strength in postmenopausal women: a randomized trial / Jamal S.A. [et al.] // JAMA. – 2011. – Vol. 305, № 8. – P. 800-807.
7. Evidence for a pathogenic role of nitric oxide in inflammation-induced osteoporosis / K.E. Armour [et al.] // J. Bone Miner. Res. – 1999. – Vol. 14, № 12. – P. 2137-2142.
8. Increased nitric oxide-mediated vasodilation of bone resistance arteries is associated with increased trabecular bone volume after endurance training in rats / J.M. 2nd Dominguez [et al.] // Bone. – 2010. – Vol. 46, № 3. – P. 813-819.
9. Nitric oxide and bone / R.J. Hof. [et al.] // Immunology. – 2001. – Vol. 103, № 3. – P.255-261.
10. Seeman, E. Bone modeling and remodeling / E. Seeman // Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. – 2009. – Vol.19, №3.– P. 219-233.
11. The effects of simulated increases in body weight for 60 days on robusticity and mineral content of limb bones of hypophysectomized rats / M.R. Simon [et al.] // Anat. Rec. – 1984. – Vol. 210, № 2. – P. 333-341.
12. Wimalawansa, S.J. Nitric oxide and bone / S.J. Wimalawansa // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – Vol. 1192. – P. 391-403.

PATTERN OF BONE REMODELING UNDER EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS AND CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

Sorokin B.V., Kostenko V.A.

Higher State Educational Institution of Ukraine "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

It is known that the excessive formation of nitric oxide (NO) from exogenous precursors (nitrates and nitrites) significantly alters the direction of the physiological effects produced by NO and leads to consequences difficult to be predicted. The mechanisms of action of NO excess on the bone tissue are still little known. The aim of the study was to study the bone remodeling markers in rats' different skeletal areas (tibia, vertebrae) in modeled glucocorticoid-induced osteoporosis and chronic sodium nitrate intoxication. The experiment involved 40 Wistar white rats weighing 180-230 g. The activity of alkaline phosphatase, acid phosphatase and its tartrate-resistant isoforms in blood serum were studied by the kinetic method. The tibial bone and the third lumbar vertebra were isolated and skeletonized. We determined their osteometric indices, Simon index, density and mineral saturation of the bones. It has been found out that the modeling of glucocorticoid osteoporosis in the course of chronic intoxication with sodium nitrate is accompanied by high bone turnover, in which increased resorption is not compensated by the process of bone formation. In this case, there is a decrease of density in the lumbar vertebrae and tibial bone, their strength properties, and mineral saturation of the lumbar vertebrae. The results underscore the risk of drugs – NO donors in the treatment of osteoporosis in the regions contaminated with inorganic nitrocompounds.

Key words: bone remodeling, experimental glucocorticoid osteoporosis, chronic sodium nitrate intoxication, nitric oxide.

Адрес для корреспонденции: e-mail: kostenko11111@rambler.ru

Поступила 20.11.2013