

УДК 577.121:616.71-007.234

РОЛЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ФОРМИРОВАНИИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО ОСТЕОПОРОЗА

Трифонова Е.Б.

*ФГУ «Уральский НИИ травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина» Минздравсоцразвития
России, Екатеринбург, e-mail: trifonlab@mail.ru*

В эксперименте на крысах линии Вистар определено значение метаболических систем организма в регуляции уровня минеральной плотности костной ткани при иммобилизации. Остеопороз моделировали ампутацией костей голени правой задней конечности, создавая неопороспособное бедро. Системный ответ организма на иммобилизацию зависел от степени снижения минеральной плотности костной ткани, и обнаружен уже через месяц эксперимента в костной и скелетной мышечной тканях, костном мозге, крови. Метаболическими предикторами регуляции уровня минеральной плотности костной ткани при формировании иммобилизационного остеопороза считаем дефицит магния костной ткани, изменение баланса биоэнергетики на фоне ускорения костного ремоделирования.

Ключевые слова: иммобилизационный остеопороз, костная ткань, метаболизм

THE VALUE OF METABOLIC PROCESSES IN FORMATION OF IMMOBILIZATION-INDUCED OSTEOPOROSIS

Trifonova E.B.

*Federal State Institution «The Ural V.D. Chaklin Research Institute for Traumatology and Orthopaedics
Health ministry and social Development of the Russian Federation»,
Ekaterinburg, e-mail: trifonlab@mail.ru*

There was identified the significance of metabolic systems of the organism in regulation of mineral density of a bone tissue in case of immobilization in the experiment on rats of Vistar. Osteoporosis was modeled by the amputation of bone of shin of the right back extremity, when the thigh was unmoved. A system response of the organism on immobilization was depended on the extent of decrease of mineral density of bone tissue. It was found in the bone and skeletal muscle tissue, bone marrow and blood a month later. There were identified key predictors of bone mineral density decrease to which we refer an expressed magnesium deficiency in bone tissue, change of bioenergetics balance under acceleration of bone remodeling.

Keywords: immobilization-induced osteoporosis, bone tissue, metabolism

Механизмы снижения минеральной плотности костной ткани (МПК) связаны с балансом процессов ее ремоделирования, которые в значительной степени зависят от функционального состояния обменных процессов остеогенных клеток. Наличие разнообразных механизмов, регулирующих процессы ремоделирования, предполагает существование многочисленных путей, вызывающих конкретные изменения структуры костной ткани. При иммобилизации инициирующим фактором снижения МПК выступает гипокинезия, оказывающая воздействие на все системы организма. Однако единой точки зрения на патогенез иммобилизационного остеопороза (ИОП) в доступной литературе нами не обнаружено.

Цель работы: оценить вклад различных метаболических путей в снижение МПК при иммобилизации.

Материалы и методы исследования

Моделирование ИОП проводили на 100 самцах крыс линии Вистар в возрасте трёх месяцев, у которых ампутировали кости голени правой задней конечности на уровне проксимального отдела, создавая

неопороспособное бедро¹. Через 90–100 суток после операции у животных, по данным морфологии, завершено формирование остеопоротических изменений в костной ткани². У всех крыс в течение года после операции с интервалом в 30 суток исследовали кровь, костный мозг, костную и мышечную ткани оперированной и контрлатеральной конечностей. Группы сравнения составили 40 интактных крыс аналогичного пола и возраста. Всех животных содержали и выводили из опыта в соответствующие сроки эксперимента (эвтаназию выполняли передозировкой эфира) с учетом положений международной конвенции о «Правилах работ с экспериментальными животными» (European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC).

Для биохимических исследований были взяты бедренные кости животных, очищенные от мышц, сухожилий, периоста; костный мозг, скелетные мышцы, кровь. Тканевые гомогенаты получали методом быстрой заморозки тканей в жидком азоте, далее измельчали в механическом микроразмельчителе, центрифугировали в режиме 0/+4 °С на рефрижераторной высокоскоростной центрифуге Sorval с использованием сахарозной и солевой сред выделения [6].

¹ Операции выполнены канд.мед.наук А.Ю. Кучиевым

² Морфометрия выполнена канд. мед. наук И.П. Кудрявцевой

В костных гомогенатах и в сыворотке крови крыс определяли маркеры костного обмена: активность общей и тартратрезистентной кислой фосфатазы (КФобщ, КФтарт) – метаболический маркер остеокластов, активность общей и термолabileйной щелочной фосфатазы (ЩФобщ, ЩФтерм) – метаболический маркер остеобластов; показатели биоэнергетики: активность лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы (ЛДГ, МДГ), концентрацию лактата (МК), пирувата (ПВК), общего белка, а также маркеры перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной системы (АОС): концентрацию малонового диальдегида (МДА), активность каталазы, пероксидазы. Для определения концентрации макроэлементов (кальций, неорганический фосфат, магний) применяли влажное озольнение в колбах Кьельдаля со смесью уксусного ангидрида и хлорной кислоты (соотношение 1:1) [1]. Исследования выполнены на высокотехнологичном лабораторном оборудовании: биохимическом анализаторе Specific basic (Konelab), ион-селективном анализаторе Microlyte 3 + 2 (Konelab), программируемом фотометре с проточной кюветой Stat Fax 1904 (Medica), спектрофотометре СФ-26 (ЛОМО), гематологическом анализаторе Cell Dyn 1700 (Abbott) унифицированными методами с использованием фирменных тест-систем, контрольных материалов и калибраторов (Konelab, Siemens, Abbott, Medica, Bio Rad

Biomedica, Biosource, Diagnostic systems Laboratories inc.) [6; 8].

Статистическая обработка полученных результатов выполнена дисперсионным, дискриминантным, регрессионным анализами. Из непараметрических критериев использовали критерии Манна-Уитни, Краскла-Уоллиса, медианный тест, тест Ньюмена-Кейлса. Для построения математической модели ИОП применяли математическое моделирование³.

Результаты исследования и их обсуждение

При развитии остеопоротических сдвигов выявили следующие метаболические особенности костной ткани крыс: рост активностей костных изоферментов кислой и щелочной фосфатаз с превалированием последней, соответственно рост фосфатазного индекса (ФИ = ЩФтерм/КФтарт) с 30 суток иммобилизации, что отражало ускорение костного ремоделирования (табл. 1), которое может сопровождаться потерей костной массы [3].

³ Математическое моделирование выполнено в институте математики и механики УрО РАН канд.ф.-м. наук К.С. Кобылкиным

Таблица 1

Динамика индекса фосфатаз костной ткани крыс при моделировании иммобилизационного остеопороза, ($M \pm m$)

Серия эксперимента	Срок наблюдения (сутки после операции)									
	до опер.	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Интактные		15,2 ± 3,4 <i>n</i> = 4	10,0 ± 3,1 <i>n</i> = 5	69,3 ± 21,1* <i>n</i> = 4	68,1 ± 7,6* <i>n</i> = 4	36,8 ± 6,0* <i>n</i> = 5	12,3 ± 5,4 <i>n</i> = 5	10,7 ± 9,9 <i>n</i> = 8	84,8 ± 24,3* <i>n</i> = 5	73,9 ± 16,9* <i>n</i> = 4
Опытные	16,8 ± 7,3 <i>n</i> = 5	33,8 ± 13,1 <i>n</i> = 5	36,4 ± 2,0* <i>n</i> = 5	75,0 ± 30,0* <i>n</i> = 5	978,0 ± 223,0** <i>n</i> = 4	523,0 ± 96,0** <i>n</i> = 4	288,0 ± 107,0** <i>n</i> = 5	10,0 ± 3,4 <i>n</i> = 5	27,3 ± 7,5* <i>n</i> = 5	12,8 ± 3,4* <i>n</i> = 4
		26,5 ± 7,1 <i>n</i> = 5	77,0 ± 37,0** <i>n</i> = 5	105,7 ± 17,5* <i>n</i> = 5	459,2 ± 290,0** <i>n</i> = 4	177,0 ± 53,7** <i>n</i> = 4	183,0 ± 86,0** <i>n</i> = 5	25,0 ± 9,8 <i>n</i> = 5	35,4 ± 10,7 <i>n</i> = 5	55,3 ± 10,6* <i>n</i> = 4

Примечания:

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной группой;

** – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном (до операции);

M – среднее, m – стандартное отклонение, n – число исследований.

Анализ содержания основных макроэлементов костной ткани у опытных крыс показал различный по продолжительности и абсолютной величине дефицит кальция (Ca), неорганического фосфата (Pn) и магния (Mg). Характерное для системного остеопороза снижение уровня Ca в костной ткани [4; 7] в условиях ИОП нами не выявлено, так как значимо низкие его концентрации в костной ткани (ниже в 2 раза,

чем в группе сравнения, $p \leq 0,05$) выявлены только на 90–120 сутки эксперимента. В период 30–90 суток опыта содержание Pn в костной ткани при ИОП ниже в 3,3–4,7 раза ($p \leq 0,05$), чем у интактных крыс. Максимальный прирост Pn в оперированной конечности составил 7,7 ммоль Pn/г ткани ($p \leq 0,05$), в контрлатеральной – 6,6 ммоль Pn/г ткани ($p \leq 0,05$), что ниже физиологического на 34,2%, то есть

дефицит Pn в костной ткани более выражен, чем дефицит Ca. Изменения концентрации Mg костной ткани у интактных и опытных крыс однонаправленны: тенден-

ции роста сменялись снижением, однако уровень Mg при ИОП значимо ниже весь период наблюдения, чем у интактных крыс (табл. 2).

Таблица 2

Динамика концентрации магния костной ткани крыс при моделировании иммобилизационного остеопороза (ммоль/г ткани), ($M \pm m$)

Серия эксперимента		Срок наблюдения (сутки после операции)								
		до опер.	30	60	90	120	150	180	240	270
Интактные			0,91 ± 0,44 <i>n</i> = 6	1,21 ± 0,37* <i>n</i> = 6	2,1 ± 0,6* <i>n</i> = 6	1,11 ± 0,46 <i>n</i> = 4	2,10 ± 0,8* <i>n</i> = 6	2,01 ± 0,74* <i>n</i> = 4	0,63 ± 0,09 <i>n</i> = 7	–
Опыт- ные	оперир. конечность	0,53 ± 0,07 <i>n</i> = 5	0,28 ± 0,07 <i>n</i> = 5	0,35 ± 0,18* <i>n</i> = 5	0,52 ± 0,43* <i>n</i> = 5	0,67 ± 0,06 <i>n</i> = 5	0,66 ± 0,4* <i>n</i> = 4	0,37 ± 0,02* <i>n</i> = 4	0,67 ± 0,08 <i>n</i> = 5	0,32 ± 0,09 <i>n</i> = 4
	контрлат. конечность		0,42 ± 0,03 <i>n</i> = 5	0,14 ± 0,06** <i>n</i> = 5	0,16 ± 0,09* <i>n</i> = 5	0,53 ± 0,15* <i>n</i> = 5	0,62 ± 0,45* <i>n</i> = 4	0,61 ± 0,09* <i>n</i> = 4	0,66 ± 0,05 <i>n</i> = 5	0,33 ± 0,06 <i>n</i> = 4

Примечания:

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной группой;

** – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном (до операции);

M – среднее, m – стандартное отклонение, n – число исследований.

Обнаруженные значительные нарушения минерализации костного матрикса выглядели следующим образом: дефицит кальция составил до 45% (90–120 сутки), неорганического фосфата – до 80% (30–180 сутки), магния – до 82% (30–240 сутки). Существенное снижение концентрации Pn негативно влияло на образование кристаллов гидроксиапатита, на фосфорилирование полифосфатзависимых ферментов, большое количество которых содержится в остеобластах, поэтому вполне вероятно их метаболическая «инертность», несмотря на обнаруженный нами рост активности ЩФтерм (маркер «ранних остеобластов»), то есть предполагаем нарушение процессов созревания остеобластов. Снижение уровня магния – облигатного кофактора аденилатциклазы-сАМР, которую считают основным регулятором минерализации [9], – также способствовало «неэффе-

ктивному» костеобразованию; а принимая во внимание роль магния в стабилизации рибосом и регуляции пула пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, участие в комплексах MgATP²⁻, его дефицит негативно влиял на анаболические процессы в костной ткани.

К факторам, определяющим течение костного ремоделирования, относят и энергетический потенциал ткани. В оперированной и контрлатеральной конечностях отметили разную динамику активности ЛДГ: снижение к 30 суткам в контрлатеральной конечности сменилось тенденцией роста, а в опытной конечности – наоборот (табл. 3), что связываем с формированием компенсаторного ответа на изменения васкуляризации, а также с активацией свободнорадикальных процессов и перераспределением субстратов окисления, поскольку иммобилизация является стрессорной реакцией.

Таблица 3

Динамика общей активности лактатдегидрогеназы костной ткани крыс при моделировании иммобилизационного остеопороза, МЕ/г ткани, ($M \pm m$)

Серия эксперимента		Срок наблюдения (сутки после операции)									
		до опер.	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Интактные			1118 ± 100 <i>n</i> = 5	661 ± 156* <i>n</i> = 4	496 ± 120* <i>n</i> = 6	427 ± 128* <i>n</i> = 5	545 ± 68* <i>n</i> = 4	561 ± 222* <i>n</i> = 4	582 ± 83* <i>n</i> = 7	1215 ± 160 <i>n</i> = 6	59 ± 0,5* <i>n</i> = 4
Опыт- ные	оперир. конечность	912 ± 73 <i>n</i> = 5	570 ± 52* <i>n</i> = 5	117 ± 26** <i>n</i> = 4	288 ± 164* <i>n</i> = 5	409 ± 109* <i>n</i> = 5	299 ± 87** <i>n</i> = 4	270 ± 85* <i>n</i> = 5	625 ± 101 <i>n</i> = 5	1245 ± 169* <i>n</i> = 5	245 ± 136** <i>n</i> = 4
	контрлат. конечность		367 ± 95* <i>n</i> = 5	546 ± 258* <i>n</i> = 4	846 ± 385 <i>n</i> = 5	885 ± 257* <i>n</i> = 5	497 ± 232* <i>n</i> = 4	577 ± 140* <i>n</i> = 5	593 ± 103* <i>n</i> = 5	1052 ± 99* <i>n</i> = 5	372 ± 63* <i>n</i> = 4

Примечания:

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной группой;

** – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном (до операции);

M – среднее, m – стандартное отклонение, n – число исследований.

Аэробные процессы в костной ткани у опытных крыс активированы в течение всего эксперимента (год наблюдения), за исключением 30 суток (табл. 4). Существенный рост общей активности МДГ

коррелировал с формированием остеопоротических изменений в костной ткани. Максимум активности в оперированной конечности выявили на 60 сутки (в 14,9 раз выше, чем у интактных крыс, $p \leq 0.05$).

Таблица 4

Динамика общей активности малатдегидрогеназы в костной ткани крыс при моделировании иммобилизационного остеопороза, МЕ/г ткани, ($M \pm m$)

Серия эксперимента		Срок наблюдения (сутки после операции)									
		до опер	30	60	90	120	150	180	210	240	270
Интактные			303 ± 139 <i>n</i> = 5	40 ± 9,5* <i>n</i> = 4	29,4 ± 5,8* <i>n</i> = 5	19,4 ± 15,3* <i>n</i> = 4	17,4 ± 3,1* <i>n</i> = 5	82 ± 39 <i>n</i> = 4	27,6 ± 3,6* <i>n</i> = 5	34,3 ± 9,6* <i>n</i> = 5	68 ± 12,5* <i>n</i> = 4
Опытные	оперир. конечность	270 ± 33 <i>n</i> = 5	53 ± 15** <i>n</i> = 5	599 ± 29,7** <i>n</i> = 4	519 ± 64** <i>n</i> = 5	178 ± 72* <i>n</i> = 5	252 ± 82* <i>n</i> = 4	186 ± 28** <i>n</i> = 5	208 ± 19 <i>n</i> = 5**	81 ± 11** <i>n</i> = 5	222 ± 34* <i>n</i> = 4
	контрлат. конечность		110 ± 68** <i>n</i> = 5	462 ± 115** <i>n</i> = 4	648 ± 89** <i>n</i> = 5	528 ± 218* <i>n</i> = 5	192 ± 64* <i>n</i> = 4	295 ± 34* <i>n</i> = 5	341 ± 106* <i>n</i> = 5	85 ± 25** <i>n</i> = 5	214 ± 43* <i>n</i> = 4

Примечания:

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной группой;

* – $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном (до операции);

M – среднее, *m* – стандартное отклонение, *n* – число исследований.

Анализируя динамику активности МДГ, полагаем, что уровень оксигенации костной ткани при ИОП вполне достаточен, что согласуется с данными литературы о высокой степени васкуляризации остеопоротических отломков [2]. Эти данные отражали принципиально иное соотношение аэробных и анаэробных реакций в кости при формировании ИОП – превалирование аэробного окисления, что считаем его патогенетической особенностью, поскольку в норме в костной ткани превалирует анаэробное окисление.

У опытных крыс в сыворотке крови отметили незначительную тенденцию роста фосфатазного индекса (в 1,7 раза по сравнению с фоном), обусловленную более низкой активностью КФтарт в отличие от её активности в костной ткани; значимый рост концентрации кальция на 90–150 сутки (максимум на 120 сутки, $3,16 \pm 0,07$ ммоль/л). Гиперкальциемия, вероятно, связана с потерей «костного» кальция. Диапазон референсных величин концентрации *Pn* в сыворотке крови интактных крыс составил от 0,8 до 2,7 ммоль/л, а при ИОП – несколько ниже от 0,7 до 2,1 ммоль/л. К периоду окончательного формирования остеопоротических сдвигов в костной ткани (90–105 сутки) уровень магнемии значимо выше в 1,2 раза ($0,81 \pm 0,06$ ммоль/л), чем в группе сравнения ($0,67 \pm 0,12$ ммоль/л).

Метаболический ответ костной ткани и крови при развитии ИОП несколько отличался, что связываем с потерей при иммобилизации части неколлагеновых белков, которые относят к локальным регуляторам остеогенеза [5].

Заключение. Таким образом, проведенный эксперимент показал, что развитие ИОП сопровождалось значимыми изменениями обмена тканей опорно-двигательного аппарата. Метаболический ответ на иммобилизацию формировался уже к 30 суткам, что гораздо раньше, чем по данным морфометрии (90 сутки). Изменения метаболических систем зависели от степени формирования остеопоротических изменений и носили системный характер, поскольку аналогичны в оперированной и контрлатеральной конечностях.

Патогенетическими особенностями снижения МПК при иммобилизации считаем ускорение костного ремоделирования, изменение баланса реакций биоэнергетики и выраженный дефицит магния в костной ткани. В соответствии с полученной нами математической моделью экспериментального ИОП (Положительное Решение от 21.10.2010 о выдаче Патента РФ на изобретение по Заявке № 2009137915 /053607/) к основным предикторам снижения МПК в условиях иммобилизации относим уровень магния в костной ткани и баланс реакций биоэнергетики тканей опорно-двигательного аппарата [10].

Список литературы

1. Биохимические исследования зрелой костной ткани и дистракционного регенерата кости: информационное письмо / сост.: К.С. Десятниченко. – Курган: РНЦ ВТО, 1992. – 12 с.
2. Гюльназарова С.В. Иммобилизационный остеопороз: патогенез и принципы лечения несращений костей на этом фоне. Обзор литературы и собственные данные // Вестник травматологии и ортопедии им. В.Д. Чаклина. – 2010. – № 2. – С. 5–12.
3. Долгов В.В. Лабораторная диагностика обмена костной ткани / В.В. Долгов, И.П. Ермакова // Остеопороз и остеопатии. – 2000. – № 4. – С. 29–39.
4. Ермакова И.П. Гормональная и клеточная регуляция ремоделирования и потерь костной ткани у мужчин после ортотопической трансплантации сердца / И.П. Ермакова, М.Ш. Хубутя, И.А. Пронченко [и др.] // Остеопороз и остеопатии. – 2006. – № 1. – С. 2–5.
5. Лунева С.Н. Биохимические аспекты влияния низкомолекулярных неколлагеновых белков костного матрикса на заживление внутрисуставных переломов / С.Н. Лунева, И.В. Шипицына, А.Н. Накоскин // Остеопороз и остеоартроз – проблема XXI века: материалы научно-практической конференции с международным участием (Курган, 7-8 октября 2009 года). – Курган, 2009. – С. 135–136.
6. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): учебное пособие. / под ред. проф. М.И. Прохоровой. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с.
7. Рожинская Л.Я. Системный остеопороз: практическое руководство для врачей / Л.Я. Рожинская. – 2-е изд. – М.: Мокеев, 2000. – 196 с.
8. Энциклопедия клинических лабораторных тестов / под ред. Н.У. Тица. – М.: Лабинформ, 1997. – 960 с.
9. Chek J.B. Effects of hypokinesia on cyclic nucleotides and hormonal regulation of calcium metabolism in rats / J.B. Chek, A.I. Laniko // East. Afr. Med. J. – 2002. – Vol. 79, № 4. – P. 210–213.
10. Trifonova E.B. Modeling of the immobilized osteoporosis / E.B. Trifonova, K.S. Kobylkin // Osteoporosis Int. – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 305.

Рецензенты:

Данилова И.Г., д.б.н., зав. лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения, г. Екатеринбург;

Базарный В.В., д.м.н., профессор кафедры клинической лабораторной и микробиологической диагностики, главный научный сотрудник отдела общей патологии ЦНИЛ ГОУ ВПО «Уральской государственной медицинской академии Росздрава», г. Екатеринбург.