

## **ВЛИЯНИЕ ДЕФИЦИТА ЭСТРОГЕНОВ И ИНЪЕКЦИЙ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТНОЙ ТКАНИ У ЖИВОТНЫХ**

© 2009 Е.В. Писарева, М.Ю. Власов

Самарский государственный университет, г. Самара

Поступила 22.03.2009

Исследованы процессы резорбции костной ткани крыс при эстрогенодефицитном и гиперглюкокортикоидном состояниях. Оценку активности развития процессов остеорезорбции проводили комплексными биохимическими и морфологическими методами. Выявлены изменения уровня основных биохимических маркеров коллагенового обмена в исследованных моделях. Полученные результаты подтверждены морфологическими данными.

Ключевые слова: остеопороз, остеорезорбция, глюкокортикоиды, гипозэстрогенемия.

Большинство физиолого-биохимических процессов в органах зависят от функционального состояния соединительной ткани, которая, обладая механическими, защитными и пластическими свойствами, в конечном счете, поддерживает гомеостаз [1,2]. Поэтому главными причинами заболеваний опорно-двигательной системы являются нарушения обменных процессов в организме, сопровождающиеся деструкцией специализированного вида соединительной ткани – костной ткани. Процессы метаболизма последней обеспечиваются сложными взаимосвязанными механизмами регуляции. При снижении процессов костеобразования и усилении процессов резорбции кость подвергается атрофии, что обозначают термином «остеопороз» [3,4].

Наиболее часто встречающийся и всесторонне изучаемый сегодня тип остеопороза – постменопаузальный остеопороз, который развивается в связи с гипофункцией яичников. Вместе с этим терапия большого количества заболеваний связана с применением препаратов глюкокортикоидов, побочным эффектом такого лечения является развитие «стероидного остеопороза». За последние 20 лет достигнут значительный прогресс в представлении о патофизиологии и лечении остеопороза, это привело к пониманию того, что профилактика и терапия остеопороза являются реальной задачей [5]. При разработке новых способов лечения, особенно на доклиническом этапе исследований, необходимы адекватные модели развития резорбции костной ткани, затрагивающие разные патогенетические механизмы. Изучению таких моделей посвящено данное исследование.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Исследования проведены на беспородных половозрелых крысах-самках массой 180-290 г и самцах массой 200- 320 г.

На первом этапе эксперимента наблюдали влияние гипозэстрогенного состояния на животных. Исследования проводилось на беспородных половозрелых крысах-самках возрастом 6 месяцев и 1,5 года. Из них было сформировано 2 группы разных возрастов: группа шестимесячных крыс весом 180-200 г и группа полугодовалых крыс весом 230-280 г. Гипозэстрогенное состояние достигалось путем двусторонней овариоэктомии. Кастрация проводилась стандартным способом [6]. После овариоэктомии у животных брали влажалищные мазки каждый день в течение 7 суток. В эксперимент включали только тех крыс, у которых не было обнаружено циклических изменений во время этого периода. Срок наблюдения после овариоэктомии 2,5 мес. Контрольными группами служили интактные животные, содержащиеся в идентичных условиях.

На втором этапе создавали гиперглюкокортикоидную модель остеопороза, для чего самцам крыс ежедневно однократно в одно и то же время вводили внутривенно гидрокортизон в дозе 40 мг/кг на протяжении 28 суток.

На каждом этапе эксперимента были выделены группы сравнения. Это контрольные группы – интактные животные, содержащиеся в идентичных с опытными условиях и не подвергавшиеся описанным выше воздействиям.

Все животные содержались в одинаковых условиях вивария на сбалансированном по жирам, углеводам, белкам и минеральным веществам питании при комнатной температуре. Для проведения биохимических исследований животных умерщвляли путем декапитации.

Для оценки метаболизма костной ткани и активности остеоиндуктивных процессов использовали общеморфологические и биохимические методы.

Объектом исследований являлись кровь, надпочечники и костная ткань животных. В экспериментах изучали содержание 11-оксикортикостероидов (11-ОКС) в надпочечниках и плазме крови по методу Панкова Ю.А., Усватовой И.Я. в модификации Подковкина В.Г. [7], связанного и свободного оксипролина в плазме крови – по методу Крель

---

*Писарева Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии. E-mail: biochemistry.ssu@rambler.ru. Власов Михаил Юрьевич, кандидат биологических наук.*

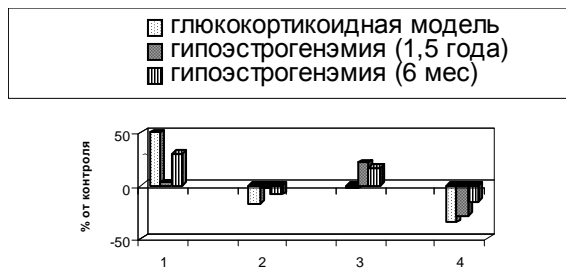
А.А., Фурцевой Л.Н. [8]. В сыворотке крови определяли активность щелочной фосфатазы и концентрацию неорганического фосфата по методу Боданского А. [9] и  $\text{Ca}^{2+}$  по методу Вишневской Т.М., Ляшевской Т.Н. [10]. Рассчитывали величину относительной массы надпочечников. Проводили биометрическое измерение бедренных костей крыс.

Препараты бедренных костей для морфологических исследований готовили общегистологическими методами, окрашивали гематоксилин-эозином по Ван-Гизону [11]. Исследование препаратов проводили на микроскопе МБИ-11.

Полученные в экспериментах результаты подвергали статистической обработке стандартным способом, используя t критерий Стьюдента [12], с применением компьютерных приложений Excel. Изменения исследуемых показателей считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты комплексных исследований показали, что у животных после инъекций глюкокортикоидов и овариоэктомии развиваются процессы резорбции костной ткани.



**Рис.** Показатели обмена коллагена у крыс при овариоэктомии и инъекциях глюкокортикоидов. 1 – свободный оксипролин, 2 – белковсвязанный оксипролин, 3 – 11-оксикортикостероиды, 4 – активность щелочной фосфатазы. \* - отличие от контроля статистически значимы с доверительной вероятностью  $p < 0,05$

Отмечено уменьшение интенсивности биосинтеза коллагена, выраженное в достоверном снижении уровня одного из маркеров костного ремоделирования – белковсвязанного оксипролина – в плазме крови животных во всех моделях. Резорбция костной ткани сопровождалась повышением уровня свободного оксипролина на 50% при введении глюкокортикоидов, тогда как удаление яичников не вызывало изменений данного показателя в группе полугодовалых крыс. Появляющийся в крови оксипролин суммарно отражает функцию остеокластов и указывает на усиление резорбции костной ткани. Такие изменения связаны с преобладанием распада коллагена над его синтезом.

Помимо маркеров коллагенового обмена о перестройках костной ткани позволяют судить изменения активности щелочной фосфатазы. Активность

общей щелочной фосфатазы – показатель процесса формирования кости. В его основе после овариоэктомии лежит дефицит эстрогенов, который первично влечет за собой активизацию процесса резорбции кости, с вторичным усилением процесса формирования кости вследствие спаренности обоих процессов.

Активность щелочной фосфатазы достоверно снижалась на 35 и 28 % при гиперглюкокортикоидном состоянии и при гипоэстрогенемии соответственно.

Процессы разрежения костной ткани сопровождались активизацией функции коры надпочечников у животных при гипоэстрогенемии (компенсаторное включение коры надпочечников при дефиците эстрогенов), что имеет важное значение, поскольку стероидный остеопороз развивается в результате воздействия избыточного количества глюкокортикоидов на костную ткань, вызывая активацию остеокластов. Это особенно важно в условиях дефицита эстрогенов, активирующих работу остеобластов. Зафиксировано значительное увеличение концентрации 11-ОКС в тканях этих желез.

При введении экзогенных стероидов в надпочечниках уровень гормонов не отличался от показателя контрольной группы, что можно объяснить действием аденокортикотропного гормона по принципу отрицательной обратной связи и снижением синтеза эндогенных стероидов в надпочечниках в ответ на введение экзогенных гормонов (отмечено значительное увеличение концентрации 11-ОКС в плазме).

Уровни кальция и неорганического фосфата находились в основном в пределах физиологической нормы, что можно объяснить действием механизмов фосфорно-кальциевого гомеостаза. Однако в пределах физиологической нормы наблюдалось увеличение содержания кальция в сыворотке крови в группе полугодовалых крыс с удаленными яичниками. В группе шестимесячных крыс опытное значение не отличается от контроля.

При развитии первичного остеопороза уровень кальция должен быть в пределах нормы [2,13], что наблюдается в группе молодых крыс. Но в соответствии с литературными данными о гиперкальциемии при постменопаузальном остеопорозе [14] можно заключить, что у полугодовалых крыс после удаления яичников происходит увеличение костного обмена, а вследствие этого и резорбции костной ткани.

При изучении биометрического показателя отношения массы бедренной кости к диаметру диафиза установлено, что воздействие гиперглюкокортикоидного и эстрогендефицитного состояний приводило к снижению костной массы в единице объема, что согласуется с данными, полученными ранее при изучении гипертермических состояний у экспериментальных животных [15].

При анализе морфологических данных выявлено, что в метэпифизарных зонах бедренных костей выявлены характерные для остеопороза признаки: мало перегородок, истончение, разволокнение и разрушение костных балок спонгиозы, их фрагментация, неровные с нишами резорбции поверхности костных трабекул, в которых обнаруживаются многоядерные остеокласты. Таким образом, результаты морфологических исследований подтверждают биохимические данные о развитии процессов остеорезорбции, выраженной в обеих экспериментальных моделях.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Исследованные способы получения остеорезорбции (эстрогенодефицитное и гиперглюкокортикоидное состояния) отвечают поставленным требованиям. Тем не менее, к недостаткам моделей следует отнести трудоемкость методов (выполнение операций, ежедневное взятие мазков, инъекции гормонов на протяжении 28 суток) и длительность исследований (животных выводят из эксперимента через 3 и более месяцев). Однако патогенез и степень выраженности процессов резорбции, подтверждающиеся биохимическими и морфологическими данными, дают несомненное преимущество гипострогенной и гиперглюкокортикоидной моделей перед другими, и их следует рекомендовать для доклинических этапов исследований при изучении новых способов лечения остеопороза.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Лоренс Риггз Б.* Остеопороз: этиология, диагностика, лечение. М.: Бином, 2000. 558 с.
2. *Мазурова В.И., Зоткина Е.Г.* Актуальные вопросы диагностики и лечения остеопороза. СПб: Фолиант, 1998. 95 с.
3. *Рожинская Л.Я.* Системный остеопороз. М.: Мокеев, 2000. 195 с.
4. *Франке Ю., Рунге Г.* Остеопороз. М.: Медицина, 1995. 299 с.
5. *Шварц Г.Я.* Фармакотерапия остеопороза– М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 368 с.
6. *Сергеева Л.И., Кузьмина В.Е.* Физиология систем крови, кровообращения и внутренней секреции. Лабораторный практикум по курсу «Физиология человека и животных». Самара: Самарский гос. университет, 1991. 70 с.
7. *Подковкин В.Г.* Микромодификация метода определения 11-оксикортикостероидов / Деп. в ВИНТИ 04.07.1988, №5348-В 88.
8. *Крель А.А., Фурцева Л.Н.* Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике // *Вопр. мед. химии.* 1968. № 6. С. 635-643.
9. *Колб В.Г., Камышников В.С.* Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь, 1982. 121 с.
10. *Вишневская Т.М., Ляшевская Т.Н.* Определение содержания кальция в сыворотке крови с помощью мурексид-глицеринового реактива // *Лаб. дело.* 1976. № 7. С. 444.
11. *Меркулов Г.А.* Курс патогистологической техники М.: Медицина, 1969. 257 с.
12. *Фролов Ю.П.* Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. Изд-во «Самарский университет», 1997. 265 с.
13. *Ермакова И.П.* Биохимические маркеры обмена костной ткани и их клиническое использование // *Лаборатория.* 2001. № 1. С. 3-9.
14. *Wronski T.J.* Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats // *Calcif. Tissue Int.* Vol. 43. 1998. P. 179-192.
15. *Писарева Е.В.* и др. Влияние аллогенного гидроксипатита на метаболизм костной ткани // *Вестник Самарского государственного университета.* – Естественнонаучная серия. – 2007. Т. 58. С. 191-197.

## **THE EFFECT OF LOW ESTROGEN LEVEL AND INJECTION OF GLUCOCORTICOIDS ON BONE TURNOVER IN RATS**

© 2009 E.V. Pisareva, M.Y. Vlasov

Samara State University, Samara

In the paper the bone resorption while low estrogen and high glucocorticoid level in rats is studied. Osteoresorption activity is performed by complex biochemical and morphological methods. Changes the main markers of collagen metabolism have been determined in two experimental models. Data obtained have been confirmed by morphological results.

Key words: osteoporosis, osteoresorption, glucocorticoids, hypostrogenemya.