

ВЛИЯНИЕ СТРОНЦИЯ РАНЕЛАТА НА МЕТАБОЛИЗМ КОСТИ САМОК КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО МОДЕЛИРОВАННОМ ДЕФИЦИТЕ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Меньшикова И.А.¹, Хабибуллина Г.Н.¹

¹*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», Уфа, e-mail: i-menshikova@bk.ru*

В эксперименте у опытной группы самок крыс гипоэстрогению вызывали методом билатеральной овариоэктоми. Для коррекции моделированного дефицита половых гормонов у опытной группы крыс использовали Бивалос, суспензию которого в дозе 17,1 мг/кг массы крыс, вводили 1 раз в день в течение 2 месяцев. В исследуемых группах определяли содержание свободно и пептидно-связанного гидроксипролина и гликозаминогликанов, включение радиоактивных ¹⁴C-пролина и ¹⁴C-тирозина в коллагеновые и неколлагеновые белки костного матрикса. В плазме крови определяли содержание эстрадиола, паратгормона, пролактина, кортизола, йодированных гормонов щитовидной железы общих Т₄ и Т₃, регуляторных цитокинов костной ткани: растворимого лиганда ядерного фактора каппа В, остеопротегерина и склеростина. При овариоэктоми усиливались катаболические процессы в костной ткани, наблюдалось подавление синтеза коллагеновых белков и протеогликанов, увеличивалась секреция системных гормонов прорезорбтивного действия (паратгормон, кортизол, пролактин), снижалась секреция эстрадиола и йодированных гормонов щитовидной железы, обладающих антирезорбтивным и остеогенным эффектами, возрастал уровень цитокинового баланса s RANKL/OPG и склеростина. У крыс, получавших стронция ранелат, наблюдалось подавление катаболизма коллагена I типа, активизировался синтез протеогликанов, коллагеновых и неколлагеновых белков органического матрикса костной ткани, усиливались процессы регенерации кости, повышался уровень антирезорбтивных гормонов.

Ключевые слова: овариоэктоми, бивалос, свободный и пептидно-связанный гидроксипролин, гликозаминогликаны, коллаген, остеопороз, ремоделирование кости.

THE EFFECT OF STRONTIUM RANELATE ON BONE METABOLISM OF FEMALE RATS WITH EXPERIMENTALLY SIMULATED THE DEFICIENCY OF SEX HORMONES

Menshikova I.A.¹, Habibullina G.N.¹

¹*Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: i-menshikova@bk.ru*

In the experimental group of female rats hypoestrogenia caused by the method of bilateral ovariectomy. For the correction of the simulated deficit of sex hormones in experimental group of rats used Bivalos, the suspension in the dose of 17,1 mg/kg rats were injected 1 time a day for 2 months. In the studied groups were measured the concentrations of free and peptide-bounded hydroxyproline and glycosaminoglycans, incorporation of radioactive ¹⁴C-proline and ¹⁴C-tyrosine in collagen and collagenase proteins of the bone matrix. In blood we determined the content of estradiol, parathyroid hormone, prolactin, cortisol, iodinated thyroid hormones total T₄ and T₃, regulatory cytokines of the bone: a soluble ligand of nuclear factor Kappa b, osteoprotegerin and sclerostin. When ovariectomy intensified catabolic processes in bone tissue, was observed inhibition of the synthesis of collagen proteins and proteoglycans, increased secretion of systemic hormones prerecording actions (parathyroid hormone, cortisol, prolactin), decreased secretion of estradiol and of iodinated thyroid hormones, with antiresorptive and osteogenic effects, increased level of cytokine balance s RANKL/OPG and sclerostin. Rats treated with strontium ranelate, there was a suppression of catabolism of type I collagen and increased synthesis of proteoglycans, collagen and not collagen protein of organic matrix of bone tissue, increased the regeneration of bone, increased levels antirezorbtivei hormones.

Keywords: ovariectomy, bivalos, free and peptide-bounded hydroxyproline, glycosaminoglycans, collagen, osteoporosis, remodeling of the bone.

Наиболее распространенной причиной развития постменопаузального остеопороза (ПМО), сопровождающегося болью, снижением активности и качества жизни больных, что чаще всего является результатом остеопоротических переломов позвонков, проксимального

отдела бедра, приводящих к инвалидизации и смерти больных, является дефицит эстрогенов. Кроме основного действия женских половых гормонов, связанного с развитием и функционированием женской репродуктивной системы, эстрогены, связываясь с рецепторами на клеточных элементах костной ткани, участвуют в регуляции костного метаболизма, формировании скелета и окостенении эпифизов трубчатых костей. В процессах ремоделирования половые стероиды регулируют совместную работу остеобластов и остеокластов, а дефицит эстрогенов приводит к активации остеокластов, нарушению минерального обмена костной ткани, снижению ее прочности [1; 2].

Основными целями лечения и профилактики ПМО являются нормализация костного ремоделирования, прекращение потери костной массы и снижение повышенного риска переломов костей. Все антиостеопоротические препараты по механизму действия подразделяются на антирезорбтивные (бисфосфонаты, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов, кальцитонин) и анаболические (терипаратид). Антирезорбтивные препараты, подавляя резорбцию, снижают активность синтеза костной ткани, анаболические препараты усиливают костный обмен, но при этом активизируют костную резорбцию [3]. Возникает вопрос о возможности оптимизации лечения остеопороза путем более физиологичного влияния на костную ткань с одновременным снижением повышенной резорбции и увеличением формирования костной ткани [4].

Препарат двойного действия стронция ранелат – единственный из препаратов для лечения остеопороза, который оказывает на костную ткань и антирезорбтивное, и костестимулирующее действие [5].

В Российской Федерации стронция ранелат зарегистрирован под торговым названием «Бивалос». Из результатов международных многоцентровых исследований эффективности стронция ранелата при остеопорозе, вызванном дефицитом половых гормонов, следует, что назначение препарата достоверно снижает риск как позвоночных, так и периферических переломов костей, существенно повышает минеральную плотность костной ткани и оказывает уникальное, разнонаправленное действие препарата на костный метаболизм. Этот препарат одновременно стимулирует образование костной ткани, усиливая репликацию преостеобластов, и подавляет резорбцию кости, снижая дифференцировку остеокластов [6-8]. Однако данные по влиянию Бивалоса на обмен органического матрикса костной ткани при дефиците продукции половых гормонов единичны.

С этой целью нами был изучен метаболизм костной ткани самок крыс при моделировании острого дефицита половых гормонов и влиянии Бивалоса.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на 80 половозрелых самках крыс массой 210-255 г в течение 3 месяцев. У подопытных групп крыс после

лапаротомии, выделения и перевязывания маточных труб, проводили двустороннюю овариоэктомию под легким эфирным наркозом [9]. Оперированные самки были разделены на 2 группы: контрольную и опытную. У животных опытной группы с целью коррекции метаболических изменений в костной ткани через 1 месяц после овариоэктомии использовали Бивалос. Суспензию препарата Бивалос в дозе 17,1 мг/кг массы вводили с помощью зонда в желудок 1 раз в день в течение 2 месяцев [10]. У 20 животных интактной группы проводили ложное оперативное вмешательство без удаления яичников.

При содержании животных в виварии соблюдали Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемые при экспериментальных исследованиях, а также правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP), поддерживали естественный световой режим, стандартная диета лабораторных животных содержала достаточное количество кальция и витамина Д.

Через 3 месяца после билатеральной овариоэктомии животных исследуемых групп декапитировали путем дислокации шейного отдела позвоночника под эфирным наркозом. В гомогенизатах костной ткани крыс определяли уровень гликозаминогликанов (ГАГ), образующих в присутствии серной кислоты с карбозолом 5-карбоксихидроксиурон, содержание которого оценивали фотометрически [11]. Концентрацию свободного (СГОП) и пептидно-связанного гидроксипролина (ПСГОП) оценивали по содержанию хромогена, продукта конденсации, окисленного хлорамином гидроксипролина с парадеметиламиноазобензальдегидом [11]. Для изучения интенсивности биосинтеза тканевых белков оценивали скорость инкорпорации радиоактивного ^{14}C -пролина в коллагеновые и ^{14}C -тирозина в неколлагеновые белки костной ткани. Радиоактивность измеряли на установке «Бета-2» с использованием раствора Брея через 24 часа после внутрибрюшинного введения меченых аминокислот. В плазме крови, с помощью стандартных наборов для радиоиммунологического метода, определяли содержание гормонов, активно участвующих в регуляции метаболизма костной ткани: эстрадиола [RIA ESTRADIOL, Франция], паратгормона [IRMA PTH (Франция)], пролактина [Prolaktin IRMA Kit, Чехия], кортизола [Immunotech Cortisol RIA Kit, Чехия], йодированных гормонов щитовидной железы общих Т₄ и Т₃ [Human TT₄, TT₃ RIA GmbH, Германия], а концентрацию регуляторных цитокинов костной ткани определили с помощью наборов для иммуноферментного анализа: растворимого лиганда ядерного фактора каппа В [s RANKL, «FRE Soluble RANKL» фирмы Biomedica, Medizinprodukte GmbH], остеопротегерина [OPG, «Osteoprotegerin» фирмы Biomedica, Medizinprodukte GmbH] и склеростина [«Sclerostin» фирмы Biomedica,

Medizinprodukte GmbH]. Для статистической обработки результатов исследования применили программу Statistica 6,0 фирмы StatSoft. В группах выборки определили значения медианы (Me), нижнего (Q₁) и верхнего квартилей (Q₃). Достоверность различий оценивали по критерию t Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Через 3 месяца после овариоэктомии в гомогенатах костной ткани крыс повышалось содержание свободного гидроксипролина – маркера деградации коллагена I типа на 62%, а содержание гидроксипролина, связанного с пептидами костного матрикса и гликозаминогликанов, снижалось, что свидетельствовало об усилении резорбтивных и катаболических процессов в кости (таблица 1). У крыс, получавших стронция ранелат в течение 2 месяцев, в костях усиливались регенеративные процессы, происходило подавление катаболизма коллагена. Об этом свидетельствовало повышение пептидно-связанного гидроксипролина и биосинтеза протеогликанов, снижение уровня СГОП.

Таблица 1

Влияние Бивалоса на содержание свободного и пептидно-связанного гидроксипролина и гликозаминогликанов в гомогенатах костной ткани крыс после овариоэктомии, Me [Q₁;Q₃]

Группа крыс	Показатели, мкмоль/г		
	СГОП	ПСГОП	ГАГ
Интактная, n=20	0,52 [0,48;0,54]	4,02 [3,95;4,10]	1615 [1601;1624]
Контрольная, n=25	0,83 [0,72;0,94] p=0,0032	3,32 [3,26;3,49] p=0,0024	960 [951;972] p=0,0002
Опытная, n=35	0,61 [0,54;0,73] p=0,022 p ₁ =0,0012	3,86 [2,14;4,03] p=0,0134 p ₁ =0,0091	1119 [1105;1129] p=0,0123 p ₁ =0,0261

Примечание: в этой и в следующих таблицах - p - различия по отношению к интактной группе, p₁ – между подопытными группами.

Направленность обменных процессов в костной ткани отражают и результаты исследования интенсивности включения радиоактивных аминокислот во фракции белков кости. Выбор этих аминокислот обусловлен тем, что в костном коллагене пролин и гидроксипролин составляют до 21% первичной структуры, а содержание тирозина в нем менее 1%, также уровень инкорпорации радиоактивного пролина отражает интенсивность синтеза коллагеновых белков, а тирозина – в основном неколлагеновых. Снижение включения этих аминокислот при гипозэстрогении в костную ткань подопытных животных отражает депрессию биосинтеза основных белков костной ткани. Так, после удаления яичников у крыс включение ¹⁴C-пролина в белки костной ткани составило лишь 61,2%, что явилось отражением выраженного снижения биосинтеза коллагена. Падение интенсивности

синтеза белка было выявлено и при введении ^{14}C -тирозина, включение радиоактивной аминокислоты в белки костной ткани крыс после овариоэктомии снизилось более чем в 2 раза (рисунок).

Лечение Бивалосом достоверно значимо корригировало биосинтетические процессы в костной ткани, значительно повышая включение радиоактивных пролина в коллагеновые и тирозина в неколлагеновые белки кости.



*Инкорпорация ^{14}C -пролина и ^{14}C -тирозина в белки костной ткани крыс после овариоэктомии и терапии Бивалосом, *) – статистически достоверные различия по отношению к интактной группе, **) - статистически достоверные различия между подопытными группами ($p < 0,05-0,001$)*

Половые гормоны имеют важное значение в обмене костной ткани. Основным эффектом воздействия эстрогенов на кость заключается в снижении скорости её резорбции. Это результат прямого влияния гормона на предшественники остеокластов (ОК) и подавления остеокластогенеза. Зрелые ОК, в отличие от предостеокластов, не имеют рецепторов к эстрогенам, поэтому их действие опосредовано остеобластами, которые в ответ на половые гормоны снижают секрецию проостеолитических факторов. В условиях дефицита половых стероидов, который имеет место в менопаузе, процессы костной резорбции начинают преобладать над процессами ремоделирования костной ткани, что и приводит к развитию остеопении и остеопороза.

Через 3 месяца после овариоэктомии в плазме крови самок крыс наблюдалось снижение эстрадиола и йодтиронинов, то есть системных гормонов, проявляющих остеогенный эффект, в то время как уровень системных гормонов, усиливающих процессы

катаболизма и резорбции в костной ткани - пролактина, паратгормона и кортизола, повышался (таблица 2).

Таблица 2

Содержание гормонов в плазме крови экспериментальных животных при гипозэстрогении и лечении Бивалосом, Ме [Q₁;Q₃]

Показатели	Интактная, n=20	Контрольная, n=25	Опытная, n=35
Эстрадиол, пг/мл	24,8 [21,7;29,6]	15,8 [12,7;17,9] p=0,0032	19,4 [16,1;21,4] p=0,0012, p ₁ =0,0142
Пролактин, мЛМЕ/л	12,8 [10,9;17,1]	15,7 [14,2;18,5] p=0,0261	13,3 [9,28;15,2] p=0,0251, p ₁ =0,0247
Общий Т ₃ , нмоль/л	2,24 [1,81;3,02]	2,03 [1,65;2,29] p=0,0425	2,19[2,03;2,23] p=0,0036, p ₁ =0,0002
Общий Т ₄ , нмоль/л	51,2 [46,8;53,4]	48,7 [43,6;51,9] p=0,0173	50,2[48,2;51,0] p=0,0481, p ₁ =0,0019
Паратгормон, пг/мл	18,6 [16,2;20,7]	31,3 [27,4;32,9] p=0,0271	24,2[19,6;25,2] p=0,0261, p ₁ =0,0381
Кортизол, нг/мл	17,5 [15,3;19,2]	22,8[18,7;27,1] p=0,0035	19,3[16,8;22,5] p=0,0281, p ₁ =0,0475

Примечательно с этих позиций изменение уровня цитокиновой системы RANKL-RANK-OPG и склеростина при ПМО, опосредующих эффекты гормональных и межклеточных регуляторных факторов на клетки, участвующие в ремоделировании костной ткани. Преостеобласты экспрессируют s RANKL (лиганд ядерного фактора каппа В) на своей поверхности, который взаимодействует с рецептором RANK на клеточной мембране пре-ОК, что приводит к формированию зрелых ОК, которые запускают костную резорбцию. Преостеобласты под влиянием факторов роста, выделяющихся при костной резорбции, превращаются в зрелые остеобласты, прекращают активную экспрессию RANKL и секретируют остеопротегерин (OPG), который связывается с RANKL и блокирует активацию остеокластов [12].

У крыс после оперативного удаления яичников увеличилось содержание sRANKL в плазме крови, а содержание OPG снижалось. Коэффициент sRANKL/OPG, характеризующий общее «конвергентное» соотношение про- и антирезорбтивных регуляторов дифференцировки и активации ОК, повышался, что отражало интенсификацию процессов остеокластогенеза и резорбции. Уровень циркулирующего склеростина, вырабатываемого остеоцитами и гипертрофированными хондроцитами, являющегося негативным регулятором остеобластогенеза, у животных контрольной группы повышался, характеризуя ингибирование формирования костной ткани в процессах ремоделирования (таблица 3).

Таблица 3

Содержание регуляторных цитокинов костной ткани в плазме крови экспериментальных

животных при гипоестрогении и лечении Бивалосом, Ме [Q₁;Q₃]

Показатели	Интактная, n=20	Контрольная, n=25	Опытная, n=35
sRANKL, пмоль/л	0,57 [0,24;1,04]	0,63 [0,44;0,84] p=0,0163	0,59 [0,36;0,71] p=0,0051, p ₁ =0,0242
OPG, пмоль/л	0,39 [0,32;0,51]	0,29 [0,23;0,37] p=0,0045	0,34 [0,24;0,48] p=0,0180, p ₁ =0,0265
s RANKL/OPG	1,46 [1,23;1,53]	2,17 [2,01;2,32] p=0,0141	1,73 [1,54;1,85] p=0,0013, p ₁ =0,0240
Склеростин, пмоль/л	11,8 [10,1;13,3]	14,3 [12,1;15,4] p=0,0029	12,6 [10,8;13,9] p=0,0162, p ₁ =0,0455

Применение Бивалоса способствовало коррекции ремоделирования костной ткани путем подавления выработки антирезорбтивных гормонов и цитокинов. Так, в плазме крови повышался уровень эстрадиола, йодированных гормонов щитовидной железы общих Т₄ и Т₃, а содержание паратгормона, кортизола, растворимого лиганда ядерного фактора каппа В, остеопротегерина и склеростина снижался, падало соотношение s RANKL/OPG.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования показали, что после овариэктомии у самок крыс развивается остеопороз с нарушением ремоделирования кости, снижением интенсивности биосинтеза белков костного матрикса, гормональной дезинтеграцией и активацией процессов остеокластогенеза.

Изучение действия Бивалоса при экспериментально моделированном дефиците половых гормонов убедительно доказывает, что комбинация костеобразующих и антирезорбтивных эффектов препарата приводит к восстановлению костного баланса в пользу формирования кости, способствует повышению уровня маркеров образования кости и уменьшает уровень маркеров костной резорбции, способствует коррекции гормонального дисбаланса, препятствует деградации коллагена и стимулирует биосинтез коллагеновых и неколлагеновых белков кости.

Список литературы

1. Меньшикова И.А. Влияние Бивалоса на метаболизм костной ткани крыс при дефиците половых гормонов // Илизаровские чтения: материалы междунар. науч-практич. конф. – Курган, 2012. – С. 184.
2. Меньшикова И.А. Особенности метаболизма костной ткани у самок крыс при дефиците половых гормонов и влияние терапии бивалосом // Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии: материалы Росс. конф. – Челябинск, 2009. – С. 134-136.

3. Воротникова С.Ю. Золендроновая кислота в лечении остеопороза и других заболеваний скелета / С.Ю. Воротникова, Е.А. Пигарова // Остеопороз и остеопатии. – 2016. - № 3. – С. 23-27.
4. Лесняк О.М. Остеопороз. Диагностика, профилактика и лечение: клинические рекомендации / О.М. Лесняк, Л.И. Беневоленская. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 27 с.
5. Collette J., Reginster J.V., Bruy O. Strontium ranelate decreases vertebral fractures risk whatever the level of pretreatment bone turnover markers // Osteoporosis International, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 127-128.
6. Исследование эффективности и безопасности лечения бивалосом (стронция ранелат) постменопаузального остеопороза / Л.Я. Рожинская [и др.] // Терапевтический архив. - 2008. - № 5. – С. 47-52.
7. Bonnellye E. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro // Bone, 2008, vol. 42, no. 3, pp. 129-138.
8. Marquis P. Strontium ranelate prevents quality of life impairment in postmenopausal women with established vertebral osteoporosis // Osteoporosis International, 2008, vol. 19, no.4, pp. 503-510.
9. Naderi V., Khaksari M., Abbasi R. Estrogen provides neuroprotection against brain edema and blood brain barrier disruption through both estrogen receptors α and β following traumatic brain injury // Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 2015, vol. 18, no 2, pp. 138-144.
10. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.И. Долгушин, О.А. Колесников, В.Э. Цейликман. - Челябинск: Изд-во Челябинского педагог. ун-та, 2000. – 167 с.
11. Определение свободного и пептидно-связанного гидроксипролина в сыворотке крови / П.Н. Шараев [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2009. - № 1. – С. 7-9.
12. Кушлинский Н.Е. Система RANK/RANKL/OPG при метастазах и первичных новообразованиях / Н.Е. Кушлинский, Ю.А. Тимофеев, Е.С. Герштейн // Молекулярная медицина. - 2013. - № 6. - С. 3-10.