

МАРКЕРЫ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕЗОРБЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ НА МОДЕЛИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ОСТЕОПОРОЗА

Раджкумар Д.С.Р., Файтельсон А.В., Артюшкова Е.Б., Фурман Ю.В., Чеботарев С.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Курск, e-mail: densingh7@gmail.com

Исходя из современных сведений о патогенезе генерализованного остеопороза становится актуальным применение разнообразных методов исследования, включая биохимические, для ранней диагностики потери костной массы. Ни для кого не секрет, что при окислительном (оксидативном) стрессе усиливаются процессы резорбции костной ткани, маркерами которой служат показатели содержания окислительно-модифицированных белков, а некоторые из них являются биохимически обоснованными достоверными признаками развития остеопоротических нарушений. Цель исследования – оценить количественное содержание кетон-динитрофинилгидрозола в сыворотке крови при моделированном остеопорозе в качестве маркера резорбции костной ткани. Все экспериментальные исследования выполнялись на самках белых крыс линии Wistar. Генерализованный остеопороз моделировался путем двусторонней овариэктомии. Для подтверждения выдвинутой гипотезы были использованы следующие исследования: цифровая рентгеновская денситометрия, гистоморфометрия костного биоматериала, а для определения степени тяжести оксидативного стресса измеряли значения общих и нейтральных кетон-динитрофинилгидрозонов в сыворотке крови. Результаты, полученные в ходе эксперимента, доказывают, что после овариэктомии у подопытных животных развиваются остеопоротические нарушения, заключающиеся в снижении минеральной плотности костной ткани в проксимальных метафизах плеч и бедер и в истончении ширины костных балок в этих локализациях, которые сопровождаются развитием оксидативного стресса. Анализ полученных результатов выявил корреляционную связь вышеуказанных показателей в норме и на модели патологии.

Ключевые слова: кетон-динитрофинилгидрозоны, овариэктомия, оксидативный стресс, остеопороз, резорбция.

MARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN PREDICTING BONE RESORPTION IN A MODEL OF GENERALIZED OSTEOPOROSIS

Rajkumar D.S.R., Faitelson A.V., Artyushkova E.B., Furman Yu.V., Chebotarev S.N.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kursk State Medical University" Ministry of Health Russian Federation, Kursk, e-mail: densingh7@gmail.com

Based on current information on the pathogenesis of generalized osteoporosis, it becomes relevant to use a variety of research methods, including biochemical ones, for the early diagnosis of bone loss. It is known that under oxidative stress, the processes of bone tissue resorption are enhanced, the markers of the latter are indicators of oxidatively modified proteins. It can be assumed that some of them are biochemically substantiated as reliable signs of the development of osteoporotic disorders. Aim – evaluation of the possibility of using ketone-dinitrophenylhydrozone as a marker of bone resorption in experimental hypostrogen-induced osteoporosis. All experiments in this research work were carried out on female Wistar white rats. Osteoporosis was modeled by bilateral oophorectomy. To confirm the hypothesis put forward, the following studies were used: digital radiological densitometry, histomorphometry of bone biomaterial, and to determine the severity of oxidative stress, the values of total and neutral ketone-dinitrophenylhydrozone were biochemically measured. Evidence has been obtained that, after oophorectomy, osteoporotic disorders develop in experimental animals, consisting of decrease in bone mineral density in the proximal metaphyses of the humerus and femur and thinning of the width of the bone trabeculae in these localizations, which are accompanied by the development of the oxidative stress phenomenon. The analysis of the results obtained revealed a correlation between the above indicators in the norm and on the pathology model.

Keywords: ketone-dinitrophenylhydrozone, oophorectomy, oxidative stress, osteoporosis, resorption.

Остеопороз чаще всего является возрастным расстройством костного ремоделирования, при котором процессы резорбции костной ткани превалируют над процессами костеобразования. Данное явление происходит вследствие уменьшения

количества остеобластов и торможения их активности одновременно с экспрессией остеокластной деятельности, что ведет к увеличению хрупкости костей и повышенному риску возникновения низкоэнергетических переломов [1, 2].

С ростом продолжительности существования биологического субъекта (в том числе человека) наблюдаются повышение прооксидантных и ингибирование активности антиоксидантных агентов. Избыточное накопление прооксидантных веществ и снижение эндогенных антиоксидантов приводит к развитию оксидативного (окислительного) стресса, следствием которого является чрезмерная продукция свободных радикалов (СР) и активных форм кислорода (АФК), вызывающая окислительное повреждение биомолекул [3, 4]. Наряду с этим активные формы кислорода являются стимуляторами клеточного апоптоза, а большая их концентрация способствует угнетению активности и дифференцировки остеобластов, что ведет к экспрессии остеокластогенеза, то есть к усилению резорбции костной ткани [5].

Под воздействием АФК в тканях протекают два события: фрагментация белка, а на более поздних сроках – его агрегация. Маркером фрагментации белковых структур в биологических жидкостях является альдегид-динитрофенилгидрозон (АДНФГ), а признаком агрегации белка служит кетон-динитрофинилгидрозон (КДНФГ). Следовательно, количественные показатели окислительно-модифицированных белков представляют собой наиболее ранние признаки поражения различных органов при заболеваниях, индуцированных свободными радикалами кислорода. По их количественному соотношению можно судить о степени онтогенеза окислительного стресса в организме и прогнозировать формирование различных патологических состояний, в том числе организацию резорбтивных процессов в костной ткани [3].

С учетом накопленных сведений о течении генерализованного остеопороза становится актуальным применение разнообразных методов исследования, включая биохимические, для ранней диагностики потери костной массы, позволяющих осуществить своевременную профилактику. Можно предположить, что дефиниции окислительно-модифицированных белков в биологических жидкостях, особенно методом определения кетон-динитрофинилгидрозонов, наиболее информативны.

Цель исследования – оценить количественное содержание кетон-динитрофинилгидрозона в сыворотке крови при моделированном остеопорозе в качестве маркера резорбции костной ткани.

Материалы и методы исследования. Исследования производились на 60 самках белых крыс линии Wistar массой 250 ± 30 г. Все хирургические вмешательства выполнялись под наркозом путем внутрибрюшинного введения раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. У 30 крыс формирование системных остеопоротических нарушений осуществлялось путем

двусторонней овариэктомии. Животным (n=30) контрольной группы была проведена операция – лапаротомия без удаления яичников (ложная овариэктомия) [1].

После выполнения этих хирургических манипуляций с целью подтверждения развития остеопоротических нарушений через 8 недель прижизненно проводилась денситометрия проксимальных метафизов бедер и плеч для расчета минеральной плотности костной ткани (МПКТ), а после выведения животных из эксперимента – гистоморфометрия.

При цифровой рентгеновской денситометрии плечевых и бедренных костей определялась МПКТ с помощью мультифункциональной лабораторной рентгеновской установки In-Vivo FX Pro производства компании Bruker (США) с системой молекулярной визуализации при помощи лицензированного программного обеспечения – BoneDensitySoftware (рис 1).

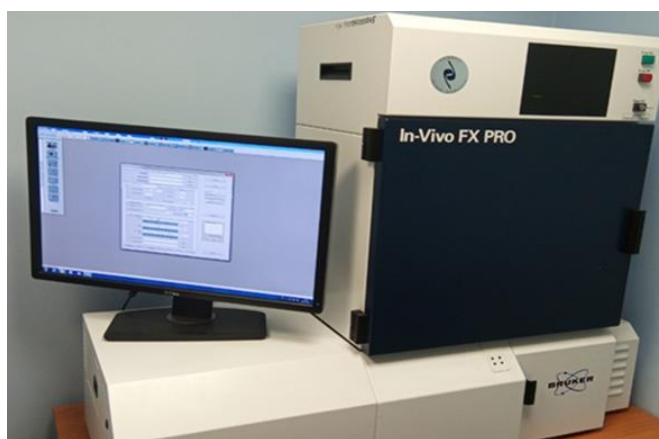


Рис. 1. Мультифункциональная лабораторная рентгеновская установка In-Vivo FX Pro

При этом значения МПКТ выражались в граммах на кубические сантиметры (г/см^3). Полученные результаты подвергались математическому анализу, при этом устанавливались отдельные средние показатели плотности костной ткани для плечевых и бедренных костей.

Для гистологической оценки формирования системных остеопоротических нарушений в изучаемых локализациях выполнялась световая микроскопия. Забор костного биоматериала проводился после эвтаназии животных. Материал закрепляли в 10%-ном растворе формалина с последующей проводкой, заливкой в парафине и окраской гематоксилин-эозином. Все предметные стекла с гистологическими препаратами осматривались под микроскопом Leica СМЕ, делались фотографии костных балок цифровым фотоаппаратом Olympus SP-350. Для осуществления гистоморфометрии костной ткани применяли программу ImageJ версии 1.39-1.43, а полученные значения выражали в микрометрах (мкм) [1, 6] (рис. 2).

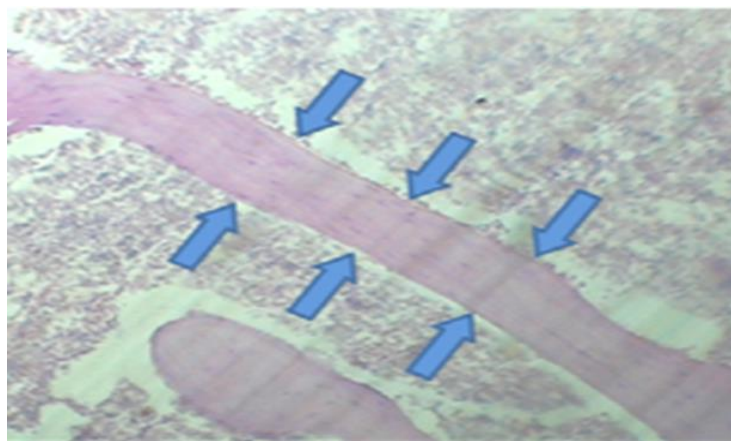


Рис. 2. Измерение ширины костной трабекулы при гистоморфометрии в проксимальном метафизе бедра у крысы (окр. Г-Э, х200)

Для определения степени тяжести оксидативного стресса, индуцированного свободными радикалами кислорода, в настоящее время в биохимии применяются методы измерения показателей количества окислительно-модифицированных белков (ОМБ). Однако существующие способы [7] имеют некоторые недостатки: длительное по времени проведение исследования, что связано со значительным количеством этапов, а применяемый для растворения реактив – 8 М раствор мочевины – быстро кристаллизуется в воздушной среде, что приводит к существенным ошибкам при реализации анализа спектрофотометрическим методом.

Для ускорения данного биохимического исследования и улучшения качества выполнения анализа спектрофотометрическим методом в лаборатории НИИ экспериментальной медицины Курского государственного медицинского университета разработан и внедрен способ определения окислительно-модифицированных белков в биологических жидкостях [8]. Способ заключается в том, что биологическую жидкость (кровь) помещают в центрифужную пробирку, при этом находящиеся в ней окислительно-модифицированные белки окрашивают 2,4-динитрофенил-гидрозином. Образцы выдерживают при температуре 18–20°C в течение 60 минут, а затем белки осаждают 20%-ной трихлоруксусной кислотой, а извлеченный осадок растворяют в 2,0 мл 2%-ного раствора едкого натрия. Цифровые значения окислительно-модифицированных белков определяют спектрофотометрическим способом в диапазоне длин волн 230–530 нм. При этом полученные показатели общих (КДНФГо) и нейтральных кетон-динитрофинилгидрозонов (КДНФГн) устанавливают по величине площади графика поглощения в соответствующих диапазонах длин волн и рассчитывают в оптических единицах (ОЕ).

В ходе эксперимента подопытные животные содержались в стандартных условиях: в биологически чистом помещении с приточно-вытяжной вентиляцией с фильтрами тонкой

очистки воздуха, с температурой в комнате 20–24°C и относительной влажностью в диапазоне от 45% до 65%, а цикл освещения был равен продолжительности светлых и темных периодов.

Все грызуны получали сухой гранулированный полнорационный корм и фильтрованную водопроводную воду. Физико-химические показатели корма полностью соответствовали ГОСТ Р 55453-2013.

Смена подстилки в клетках производилась ежедневно, в качестве наполнителя использовались очищенные от пыли древесные опилки, распределяемые равномерным слоем толщиной в 2 см.

Все подопытные животные, на которых проводились исследования, были рассортированы по отдельным группам методом стратифицированной рандомизации с учетом массы тела, условий содержания и питания, а также в соответствии с выполняемыми хирургическими манипуляциями.

Статистический анализ полученных данных осуществлялся в программе Microsoft Excel версии 10.0 при помощи средств пакета анализа. Оценка статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях производилась по «двухвыборочному t-тесту с различными дисперсиями» Стьюдента для независимых групп. Данный тест позволяет выявить достоверные различия между средними значениями из двух выборок с неравными дисперсиями и до сих пор чаще всего применяется в биомедицинских исследованиях в тех случаях, когда сравниваются выборки с нормальным распределением признаков. Проверку нормальности распределения признаков проводили путем расчета асимметрии и эксцесса.

Исследование проводилось по всем правилам и стандартам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в Российской Федерации (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708 н), а также по международным рекомендациям и правилам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1986 г.).

Результаты исследования. При рентгеновской денситометрии было обнаружено, что средний показатель минеральной плотности костной ткани в проксимальных метафизах бедер у крыс после билатеральной овариэктомии составил 2,332 г/см³, то есть на 10% меньше аналогичного значения у ложнопериовариотомизированных животных (2,584 г/см³). В проксимальных метафизарных зонах плечевых костей крыс МПКТ после овариэктомии была равна 2,007 г/см³, что на 9,9% меньше, чем у ложнопериовариотомизированных животных (2,208 г/см³). Данные значения в обеих группах крыс имеют достоверные различия ($p < 0,05$).

При гистоморфометрии было установлено, что у животных контрольной группы средняя ширина трабекул спонгиозной кости в вертельных отделах бедер составила $69,01 \pm 0,68$ мкм, в то же время у крыс с моделированным остеопорозом это значение снижается на 25%

(51,69±0,7 мкм). Оценка достоверности различия средних значений по группам (t-критерий Стьюдента) больше 2,77 (p=0,01). В проксимальных метафизах плечевых костей этот параметр составил у ложнооперированных животных 69,31±0,42 мкм, а у животных с экспериментальным остеопорозом – 51,38±0,73 мкм, то есть на 26% меньше по сравнению с крысами без остеопороза (рассмотрены средние значения по группам, t-критерий Стьюдента больше 2,771 (p=0,01)).

Таким образом, в ходе этого экспериментального исследования получены убедительные доказательства того, что после двусторонней овариэктомии у экспериментальных животных развиваются значительные гипоэстроген-индуцированные остеопоротические нарушения, которые проявляются истончением костных балок спонгиозной костной ткани и снижением минеральной плотности в метафизарных отделах длинных трубчатых костей.

Биохимическое исследование показателей количества окислительно-модифицированных белков выполнялось по авторской методике. Определялись уровни общих и нейтральных кетон-динитрофинилгидрозонов, для этого выполнялся забор крови у животных с последующим биохимическим анализом. В группе ложнооперированных животных: среднее значение КДФГ_о составило 21,24±1,27 оптических единиц (ОЕ), а КДФГ_н – 12,23±1,83 ОЕ, а у крыс с моделированным системным остеопорозом аналогичные показатели были равны 29,4 ОЕ и 30,64 ОЕ соответственно. Следовательно, значения общей кетон-динитрофинилгидрозоны у животных с моделью патологии без малого на 28% выше, чем у животных без остеопороза, а нейтральной кетон-динитрофинилгидрозоны – на 60%. Различие средних значений по группам достоверно, коэффициент Стьюдента составил 4,10, что больше стандартного значения p=0,01.

Заключение

Старение биологического объекта сопровождается развитием оксидативного стресса. Снижается антиоксидантный и восстановительный потенциал клеток, что вызывает разнообразные модификации макромолекул [9]. Под влиянием окислительных реакций в тканях происходит повреждение клеток из-за окисления липидов, структурных изменений мембран, окисления белков и нуклеиновых кислот. Эти морфологические изменения, постепенно распространяясь на органы, могут стать системными. Ряд патологических состояний связаны с окислительным стрессом, включая заболевания костей, в том числе и остеопороз. В ходе данной экспериментальной работы выявлена корреляция между гистологическими изменениями в структуре костной ткани, минеральной плотностью кости и окислительным стрессом, что подтверждается публикациями других исследователей [3, 6, 10]. Согласно критерию Спирмена, коэффициент корреляции между показателями окислительного

стресса и средней ширины костных трабекул составил 0,429, что выше критического значения 0,36 ($p=0,05$), а между значениями окислительного стресса и данными денситометрии этот коэффициент равен 0,37, что также выше критического значения. Это подтверждает достоверную корреляцию.

Из всего вышеизложенного на основании выполненных исследований можно сформулировать ряд выводов.

1. У самок крыс линии Wistar через 8 недель после билатеральной овариэктомии формируются генерализованные остеопоротические изменения в костной ткани, которые обосновываются истончением трабекул в спонгиозной костной ткани при гистоморфометрии и уменьшением минеральной плотности в метафизарных зонах костей исследуемых локализациях при денситометрии.

2. Оксидативный стресс сопровождает формирование гипоестроген-индуцированных остеопоротических нарушений, маркерами, которых являются общая и нейтральная кетон-динитрофинилгидрозоны.

3. Исследование маркеров окислительного стресса в комплексном прогнозировании резорбции костной ткани как в экспериментальной, так и в клинической практике является перспективным направлением в ранней дифференциальной диагностике патологических состояний костной системы.

Список литературы

1. Гудырев О.С. Остеопротективное действие эналаприла и лозартана. Результаты экспериментального исследования. Lap Lambert Academic Publishing GmbH & Go KG, 2012. 124 с.
2. Koike T., Mikami T., Shida M., Nabuchi O., Kitagawa H. Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. Sci Rep. 2015. no. 5. DOI: 10.1038/srep08994.
3. Захаров И.С., Колпински Г.И., Ушакова Г.А., Вавин Г.В. Роль оксидативного стресса в формировании постменопаузального остеопороза // Гинекология. 2014. Т. 16. № 1. С. 41-43.
4. Захаров И.С., Ушакова Г.А., Колпинский Г.И., Вавин Г.В. Использование маркёров оксидативного стресса в комплексном прогнозировании резорбтивных процессов костной ткани, ассоциированных с постменопаузальным остеопорозом // Забайкальский медицинский вестник. 2015. № 3. С. 25-29.
5. Domazetovic V., Marcucci G., Iantomasi T., Brandi M.L., Vincenzini M.T. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. Clin Cases Miner Bone Metab. 2017. Vol. 14 (2). P. 209-216. DOI: 10.11138/ccmbm/2017.14.1.209.

6. Коклина Н.Ю. Исследование остеопротективных эффектов рез-вератрола и его комбинации с эналаприлом и лозартаном: автореф: дис. ... канд. мед. наук. Белгород, 2016. 22 с.
7. Рубцов Г.К., Безручко Н.В., Генгин М.Т., Васильков В.Г., Борисова Е.Ю., Анопин К.Д., Васильева А.Д., Садовникова Д.Г., Козлова Г.А., Кручинина А.Д., Гамзин С.С. Способ определения окислительной модификации белков в пуле веществ средней молекулярной массы в сыворотке крови, плазме, эритроцитах и в моче // Патент РФ № 2525437. Патентообладатель ФГБОУ ВПО «Пензенский государственный университет». МПК51 G01N 33/86, G01N 21/27. 2012153044/15 заявлено 07.12.2012. опубл. 10.08.2014; Бюл. № 22. С. 6.
8. Артюшкова Е.Б., Фурман Ю.В., Жербилов Н.И., Недзведский В.С., Крюков А.А., Файтельсон А.В., Раджжумар Д.С., Смахтина А.М. Способ определения окислительно-модифицированных белков в биологических жидкостях: Патент РФ № 2754434. Патентообладатель ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России». МПК51 G01N 33/68, G01N 33/52. 2021104153/21; заявлено 18.02.2021; опубл. 10.09.2021; Бюл. № 25. С. 6.
9. Pietschmann P., Mechtcheriakova D., Meshcheryakova A., Föger-Samwald U., Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2016. Vol. 62 (2). P. 128-37. DOI: 10.1159/000431091.
10. Hacı Ahmet Deveci, Gokhan Nur, Hulya Cicek, Mahmut Karapehlivan. Evaluation of oxidative stress factors in patients with osteoporosis. *International Medical Journal*. 2017. Vol. 6 (3). P. 479-482. DOI: 10.5455/medscience.2017.06.8597.