

УДК 616.71–007.234–092.9 : 615.916'175

Сорокін Б.В., Костенко В.О.

РОЛЬ NO-СИНТАЗ У МЕХАНІЗМАХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ПОРУШЕНЬ КІСТОК ПРИ ВІДТВОРЕННІ ГЛЮКОКОРТИКОЇДНОГО ОСТЕОПОРОЗУ ЗА УМОВ ХРОНІЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ НІТРАТОМ НАТРІЮ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

В експерименті на 25 білих щурах лінії Вістар масою 180-230 г досліджена роль NO-синтази у механізмах структурно-функціональних порушень кісток при відтворенні глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію). Виявлено, що за умов досліду підвищується резорбція кісток, яка не компенсується процесом їх формування. При цьому знижується щільність великогомілкової кістки і поперекових хребців, їх міцність (збільшення індексу Simon), мінеральна насиченість поперекових хребців. Функціональна активність індукційної NO-синтази істотно впливає на зниження за цих умов маси великогомілкової кістки і поперекових хребців, їх щільності та міцності, що свідчить про розв'язок дизрегуляторних розладів (порушення механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника).

Ключові слова: експериментальний глюкокортикоїдний остеопороз, хронічна інтоксикація нітратом натрію, оксид азоту, NO-синтази, L-аргінін, кісткова тканина.

Стаття є фрагментом планової НДР ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» «Кисень- та NO-залежні механізми ушкодження внутрішніх органів та їх корекція фізіологічно активними речовинами» (№ держреєстрації 0108U010079).

Переважна більшість території України є екологічно несприятливою у забрудненні нітратами та нітритами ґрунту і ґрунтових вод. Виявлено стабільне забруднення ґрунтів і питної колодезяної води азотомісними сполуками, яке за показниками вмісту нітратів у 34% проб перевищує ГДК у ґрунті у 2-5 разів та у питній воді у 7-35 разів [3].

В експерименті на білих щурах показано, що хронічна інтоксикація нітратом натрію призводить до суттєвих функціонально-метаболічних змін у кістковій тканині, викликає деполімеризацію фуко-, сіалоглікопротеїнів та глікозаміногліканів, уповільнює процес репаративної регенерації нижньої щелепи [2].

Раніше нами показано, що за умов моделювання експериментального глюкокортикоїдного остеопорозу (ОП) на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію, яка супроводжується утворенням великої кількості продукту метаболізму нітрат- і нітрит-іонів – оксиду азоту (NO), значно посилюються у кістковій тканині процеси колагенлізу та деполімеризації протеогліканів. Ці зміни у значній мірі пов'язані з функціональним станом NO-синтази, зокрема, її індукційної ізоформи [6]. У той же час у літературі наводиться суперечлива інформація щодо ефектів NO на метаболізм, функціонування та структуру кісток [9,14]. Повідомляється, що високий рівень NO пригнічує обмін речовин у кістковій тканині та формування кісток. Проте встановлена ключова роль ендотеліальної NO-синтази у регуляції активності остеобластів та утворенні кісткової тканини [9,13].

Відомо, що надлишкове утворення NO з екзогенних попередників істотно змінює спрямованість фізіологічних ефектів оксиду азоту, призводить до наслідків, які є важко прогнозованими, що виявлялося дослідниками за умов відтворення хронічної нітратної інтоксикації [5]. Проте механізми дії надлишкової кількості NO на

кісткову тканину, у т.ч. залежні від функціональної активності NO-синтазних (NOS) систем, з'ясовані недостатньо.

Метою роботи було з'ясування ролі ізоформ NO-синтази у механізмах структурно-функціональних порушень кісткової тканини різних відділів скелету (великогомілкова кістка, хребці) білих щурів при відтворенні експериментального ОП за умов надлишкового утворення оксиду азоту із екзогенного попередника (модель хронічної інтоксикації нітратом натрію).

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 25 білих щурах лінії Вістар масою 180-230 г. У першій серії необхідні показники вивчали у інтактних тварин; у другій – відтворювали експериментальний глюкокортикоїдний ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію (200 мг/кг, 60 діб); у третій, четвертій і п'ятій – тваринам на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію та моделювання ОП вводили відповідно неселективний інгібітор NO-синтази – метиловий ефір нітро-L-аргініну (L-NAME), селективний інгібітор iNOS – аміногуанідин та субстрат NO-синтазної реакції – L-аргінін.

Для моделювання ОП щурам через добу (протягом 45 діб) внутрішньом'язово вводили 2,5% розчин гідрокортизону ацетату в дозі та 50 мг/кг маси тіла [1]. При моделюванні ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію гідрокортизон ацетат вводили, починаючи з 16 доби інтоксикації.

L-NAME призначали у дозі 5 мг/кг [10], аміногуанідин – 20 мг/кг [12], L-аргінін – 100 мг/кг [2]. Усі сполуки вводили внутрішньоочередово 2 рази на тиждень протягом часу відтворення стероїдного остеопорозу.

Після закінчення терміну експерименту тварин декапітували під ефірним наркозом. Виділяли і скелетували великогомілкові кістки (ВГК) та хребці.

Визначали біофізичні властивості сухих кісток, які кількісно відображають щільність структурної композиції кісткової речовини: щільність, мінеральну насиченість, індекс Симона (співвідношення максимальної довжини і кубічного кореня маси кісткового органу, цей показник інтегрує ростові параметри кісток, міцносні властивості мікроструктури та мінерального балансу) [7,11]. Остеометрію проводили штангенциркулем з точністю до 0,02 мм.

Отримані дані обробляли варіаційно-статистичним методом з використанням критерію Ст'юдента.

Вплив функціонального стану NO-синтаз на показники активності ферментів – маркерів функції остеобластів та остеокластів у сироватці крові щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію (M±m, n=25)

Характер досліджень	Показники активності ферментів		
	Лужна фосфатаза од. акт.	Кисла фосфатаза, од. акт.	Тартратрезистентна кисла фосфатаза, од. акт.
Інтактна група	297.6±8.9	10.9±0.6	6.1±0.5
Введення нітрату натрію (60 діб) + відтворення ОП	278.6±17.7	15.9±1.3 *	8.8±0.5 *
+ L-NAME	271.4±14.0	18.3±0.7 *	9.8±0.7 *
+ аміногуанідин	292.8±16.7	13.5±0.8 *	7.9±0.4 *
+ L-аргінін	292.8±11.9	14.4±1.0 *	8.3±0.5 *

Примітки (у табл. 1-3): * – p<0.05 у порівнянні з даними першої серії (інтактні тварини);

** – p<0.05 у порівнянні з даними другої серії

При дослідженні всіх експериментальних груп не виявлено достовірних змін активності маркера формування кістки - лужної фосфатази.

Отримані нами дані свідчать, що ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію слід вважати станом з високим кістковим обміном, при якому підвищена резорбція не компенсується нормальним або підвищеним процесом кісткоутворення. Цей процес, за нашими даними, суттєво не залежить від функціонального стану NOS та її окремих ізоформ.

При оцінці остеометричних показників кісток

Результати дослідження та їх обговорення

Порушення процесів ремоделювання кістки, як відомо, супроводжується відхиленнями у рівні біохімічних маркерів. Так, моделювання ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію призводить до зміни показників маркерів резорбції кістки (табл. 1): збільшення активності кислої фосфатази та її кісткової ізоформи - тартратрезистентної кислої фосфатази - відповідно на 45.9% (p<0.01) і 44.3% (p<0.01) у порівнянні з даними першої серії. Введення інгібіторів NOS та її субстрату L-аргінину достовірно не впливає на зміни активності цих ферментів.

Таблиця 1.

при відтворенні ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію (табл. 2) звертає на себе увагу зниження маси нативної ВГК і хребців - відповідно на 38.0% (p<0.015) та 26.7% (p<0.001) у порівнянні з даними інтактної групи.

Примітно, що зміни цього показника залежать від каталітичної активності iNOS. Введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину достовірно підвищує масу нативної ВГК і хребців - відповідно на 27.2% (p <0.05) та 20.8% (p <0.01) у порівнянні з даними другої групи.

Таблиця 2

Вплив функціонального стану NO-синтаз на остеометричні характеристики великогомілкової кістки при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію (M±m, n=25)

Характер досліджень	Показники					
	Максимальна довжина кістки або висота тіла хребця, мм		Маса нативної кістки, мг		Індекс Симона	
	ВГК	Хребці	ВГК	Хребці	ВГК	Хребці
Інтактна група	39.2±0.5	6.45±0.07	515.5±45.6	193.8±8.5	4.92±0.08	1.12±0.01
Введення нітрату натрію (60 діб) + відтворення ОП	37.3±0.2	6.28±0.06	319.7±15.4 *	142.1±2.0 *	5.47±0.06 *	1.20±0.01 *
+ L-NAME	36.6±0.7	6.08±0.11	315.3±29.2 *	136.3±10.9 *	5.42±0.13 *	1.19±0.02 *
+ аміногуанідин	38.2±0.2	6.40±0.08	406.7±26.1 **	168.3±5.7 **	5.18±0.09 **	1.16±0.01 **
+ L-аргінін	37.8±0.8	6.31±0.11	391.8±42.9	154.9±8.8 *	5.22±0.14	1.18±0.02 *

Відтворення ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується істотним підвищенням величини індексу Simon при розрахунку показників ВГК і хребців - відповідно на 11.2% (p<0.001) і 7.1% (p<0.001) у порівнянні з даними інтактної групи.

Введення аміногуанідину достовірно знижує індекс Simon при розрахунку показників ВГК і хребців - відповідно на 5.3% (p<0.05) та 3.3% (p<0.05) у порівнянні з даними другої групи. Це вказує на той факт, що у механізмі зниження міцності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на

тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію суттєву роль відіграє функціонування iNOS.

Звертає на себе увагу відсутність достовірних зрушень значень цього показника при введенні неселективного інгібітора NOS L-NAME та субстрату NO-синтазної реакції L-аргінину, що, вочевидь, свідчить про те, що з активністю конститутивних ферментів пов'язана дія, протилежна такій, що опосередковується iNOS [5].

При дослідженні показників структурної композиції кісток (табл. 3) ми виявили значне зниження щільності ВГК і хребців – відповідно на

23.8% ($p < 0.001$) та 10.7% ($p < 0.02$) у порівнянні з даними інтактної групи. При цьому мінеральна насиченість цих кісток відповідно на 19.6%

($p < 0.02$) та 22.1% ($p < 0.01$) поступається даним першої серії.

Таблиця 3
Вплив функціонального стану NO-синтази на кількісні показники структурної композиції великогомілкової кістки при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію ($M \pm m$, $n = 25$)

Характер досліджень	Показники					
	Щільність, г/см ³		Мінеральна насиченість, г/см ³		Зольність, %	
	ВГК	Хребці	ВГК	Хребці	ВГК	Хребці
Інтактна група	0.84±0.03	1.21±0.03	0.46±0.02	0.68±0.03	55.6±4.6	56.2±3.6
Введення нітрату натрію (60 діб) + відтворення 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
+ L-NAME	0.72±0.04 *	1.14±0.04	0.42±0.04	0.62±0.06	59.0±4.2	53.9±6.1
+ аміногуанідин	0.81±0.03 **	1.26±0.03 **	0.44±0.04	0.64±0.06	55.6±6.6	51.0±5.7
+ L-аргінін	0.76±0.05	1.09±0.05	0.42±0.03	0.62±0.05	55.7±3.9	59.3±7.9

Введення аміногуанідину достовірно підвищує щільність ВГК і хребців - відповідно на 26.6% ($p < 0.01$) та 16.7% ($p < 0.01$) у порівнянні з даними другої групи. Тобто, у механізмі зниження щільності кісток за умов глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію важливу роль також відіграє функціонування iNOS.

У той час в усіх серіях дослідів істотних змін відсотка зольності ми не виявили.

Таким чином, моделювання глюкокортикоїдного ОП на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію супроводжується збільшенням резорбції кісткової тканини з наступним зниженням її щільності, мінеральної насиченості і характеристик міцності.

Отримані нами результати суперечать даним літератури щодо збільшення мінеральної щільності кісткової тканини та зниження її резорбції при утворенні NO, що вивільняється з органічних нітратів (нітроглицерину та ін.) [8]. Це, вочевидь, свідчить про дозозалежних характер порушень ремоделювання кісток в організмі ссавців у відповідь на утворення NO.

З іншого боку, проведене нами дослідження підтверджує здатність NO, що утворюється при внесенні надлишкової кількості нітратів, порушувати механізм авторегуляції кількості цього біорегулятора в організмі, що виявляється у відсутності закономірного зменшення активності NOS (у нашому випадку, навіть, збільшення функціонального впливу iNOS) при інтенсивному функціонуванні нітрат- та нітритредуктазних шляхів [4].

Висновки

1. Моделювання глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі хронічною інтоксикації нітратом натрію супроводжується високим кістковим обміном, при якому підвищена резорбція не компенсується процесом формування кістки, що призводить до зниження щільності великогомілкової кістки і поперекових хребців, їх характеристик міцності (збільшенням індексу Simon), мінеральної насиченості поперекових хребців.

2. Функціональна активність iNOS істотно впливає на зниження за умов відтворення глюкокортикоїдного остеопорозу на тлі хронічною інтоксикації нітратом натрію маси великогоміл-

кової кістки і поперекових хребців, їх щільності та міцності, що свідчить про розвиток дизрегуляторних розладів (порушення механізму авторегуляції кількості NO при його утворенні з екзогенного попередника).

Література

1. Батура І.О. Морфологічні характеристики остеонних конструкцій в умовах високих концентрацій глюкокортикоїдів в організмі експериментальних тварин / І.О. Батура // Укр. морфол. альм. – 2005. – № 1. – С. 107.
2. Должкова К.П. Вплив пригнічення та індукції NO-синтази на біохімічний склад кісткової тканини нижньої щелепи при відтворенні її перелому на тлі хронічної інтоксикації нітратом натрію / К.П. Должкова, В.О. Костенко // Пробл. екол. та мед. – 2010. – Т. 14, № 1–2. – С. 35–38.
3. Кондратенко О.Є. Визначення ролі нітратного забруднення питної води і ґрунтів в синтезі N-нітрозамінів і формуванні канцерогенного ризику: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.02.01 "Гігієна" / О.Є. Кондратенко. – К., 2007. – 20 с.
4. Костенко В.О. Механізми ауторегуляції утворення оксиду азоту в організмі ссавців та їх порушення при розвитку патологічних процесів / В.О. Костенко, Н.В. Соловйова, О.В. Коваленко [та ін.] // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2011. – Т. 11, №3. – С. 150-154.
5. Костенко В.А. Не только концентрация, но и происхождение оксида азота определяет его патогенетическую или саногенетическую роль / [В.А. Костенко, И.В. Батухина, А.А. Левков и др.] // Сучасні проблеми патофізіології: від молекулярно-генетичних до інтегративних аспектів: V Національний конгрес патофізіологів України // Патологія. – 2008. – Т. 5, №2. – С. 58.
6. Сорокін Б.В. Зміни компонентів органічного матриксу кісткової тканини щурів при відтворенні експериментального остеопорозу за умов хронічної інтоксикації нітратом натрію / Б.В. Сорокін, В.О. Костенко // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісн. Української мед. стоматол. академії. – 2013. – Т. 13, №2. – С. 220-224.
7. Ступаков Г.П. Костная система и невесомость / Г.П. Ступаков, А.И. Воложин. – М.: Наука, 1989. – 184 с.
8. Jamal S.A. Effect of nitroglycerin ointment on bone density and strength in postmenopausal women: a randomized trial / S.A. Jamal, C.J. Hamilton, R. Eastell, S.R. Cummings // JAMA. – 2011. – V. 305, №8. – P. 800-807.
9. van't Hof R.J. Nitric oxide and bone / R.J. van't Hof, S.H. Ralston // Immunology. – 2001. – V. 103, №3. – P. 255-261.
10. Laude K. NO produced by endothelial NO synthase is a mediator of delayed preconditioning-induced endothelial protection / K. Laude, J. Favre, C. Thuillez [et al.] // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2003. – V. 284, №6. – P. H2053-H2060.
11. Simon M.R. 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, K.R. Holmes, A.M. Olsen // Anat. Rec. – 1984. – V. 210, № 2. – P. 333-341.
12. Takeuchi K. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats / K. Takeuchi, R. Hatazawa, M. Tanigami [et al.] // Life Sci. – 2007. – V. 80, №4. – P. 329-336.
13. Taylor B.C. Association of endothelial nitric oxide synthase genotypes with bone mineral density, bone loss, hip structure, and risk of fracture in older women: the SOF study / B.C. Taylor, P.J. Schreiner, J.M. Zmuda [et al.] // Bone. – 2006. – V. 39, №1. – P. 174-180.
14. Wimalawansa S.J. Nitric oxide and bone / S.J. Wimalawansa // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2010. – V. 1192. – P. 391-403.

Реферат

РОЛЬ NO-СИНТАЗ В МЕХАНИЗМАХ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ КОСТЕЙ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО ОСТЕОПОРОЗА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ НИТРАТА НАТРИЯ

Сорокин Б.В., Костенко В.А.

Ключевые слова: экспериментальный остеопороз, хроническая интоксикация нитратом натрия, оксид азота, NO-синтазы, L-аргинин, костная ткань.

В эксперименте на 25 белых крысах линии Вистар массой 180-230 г исследована роль NO - синтаз в механизмах структурно-функциональных нарушений костей при воспроизведении глюкокортикоидного остеопороза на фоне избыточного образования оксида азота из экзогенного предшественника (модель хронической интоксикации нитратом натрия). Обнаружено, что в условиях опыта повышается резорбция костей, которая не компенсируется процессом их формирования. При этом снижается плотность большеберцовой кости и поясничных позвонков, их прочностные характеристики (увеличение индекса Simon), минеральная насыщенность поясничных позвонков. Функциональная активность индуцибельной NO-синтазы существенно влияет на снижение в этих условиях массы большеберцовой кости и поясничных позвонков, их плотности и прочности, что свидетельствует о развитии дисрегуляторных расстройств (нарушения механизма ауторегуляции количества NO при его образовании из экзогенного предшественника).

Summary

ROLE OF NO-SYNTASES IN THE MECHANISM OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL OSTEOAL DISORDERS UNDER MODELED OSTEOPOROSIS AND CHRONIC SODIUM NITRATE INTOXICATION

Sorokin B.V., Kostenko V.O.

Key words: modeled osteoporosis, chronic sodium nitrate intoxication, nitric oxide, NO- synthases, L-arginine, bone tissue.

Introduction. It is known the excessive formation of NO from exogenous precursors significantly alters the orientation of the physiological effects produced by NO that leads to consequences difficult to be predicted. Mechanisms of action of NO excess on bone, including those which depend on the functional activity of NO-synthases (NOS) systems, are still little known. **Objective.** The aim was to study the effect of NOS on the functional and metabolic changes in bone tissue of different skeletal areas (tibia, vertebrae) in modeled glucocorticoid osteoporosis (OP) and excess production of sodium nitrate induced exogenously (model of chronic sodium nitrate intoxication). **Materials and Methods.** The experiment involved 20 Wistar white rats weighed 180-230 g at 5 series of experiments. In the first series we studied required parameters in intact animals; in the second series we reproduced modeled glucocorticoid OP and chronic sodium nitrate intoxication (200 mg/kg daily, 60 days); in the third, fourth and fifth series animals were administered nitro-L-arginine methylester (L-NAME) as nonselective NOS inhibitor in a dose of 5 mg/kg, aminoguanidine as iNOS selective inhibitor in a dose of 20 mg/kg and L-arginine as NOS substrate in a dose of 100 mg/kg in the course of sodium nitrate chronic intoxication and modeled OP. All compounds were administered intraperitoneally 2 times a week for OP modeling time. We determined the density, mineral saturation and Simon index (ratio of maximum length and cubic root of bone weight). **Results.** OP Simulation in the course of chronic toxicity of sodium nitrate leads to the changes in rates of bone resorption markers: increased activity of acid phosphatase and its bone isoform – tartrate resistant acid phosphatase - by 45.9% ($p < 0.01$) and 44.3% ($p < 0.01$) compared with the data of the first series. Introduction of NOS inhibitors and its substrate L-arginine did not significantly affect the changes in the activity of these enzymes. When assessing the osteometric indices of the bones in the course of modeled OP and sodium nitrate chronic intoxication we paid attention to the lowering of mass in native tibia and vertebrae - by 38.0% ($p < 0.015$) and 26.7% ($p < 0.001$) compared with the data intact group. These changes depended on the catalytic activity of iNOS. Introduction of selective iNOS inhibitor aminoguanidine significantly increased the mass of the native tibia and vertebrae - by 27.2% ($p < 0.05$) and 20.8% ($p < 0.01$) compared with the data of the second group. OP reproduction in the course of sodium nitrate chronic toxicity is accompanied by significant increase in the value of Simon index when calculating indices for tibia and vertebrae by 11.2% ($p < 0.001$) and 7.1% ($p < 0.001$) compared with the data obtained in the intact group. Administration of aminoguanidine significantly reduces the index for calculation of Simon index for tibia and vertebrae by 5.3% ($p < 0.05$) and 3.3% ($p < 0.05$) compared with the data of the second group. While studying the structural composition of bone parameters we found a significant decrease in the density of tibia and vertebrae by 23.8% ($p < 0.001$) and 10.7% ($p < 0.02$) compared with the data of the intact group. At that time the mineral saturation of bone was down respectively by 19.6% ($p < 0.02$) and 22.1% ($p < 0.01$) compared to this in the first series. Administration of aminoguanidine significantly increases the density of tibia and vertebrae - by 26.6% ($p < 0.01$) and 16.7% ($p < 0.01$) compared with the data of the second group. **Conclusions.** 1. Simulation of glucocorticoid osteoporosis in the course of sodium nitrate chronic toxicity is accompanied by high bone metabolism in which increased resorption is not compensated by bone formation process. This leads to the reduction in the density of the tibia and lumbar vertebrae, their strength characteristics (increasing Simon index), mineral saturation lumbar vertebrae. 2. Functional activity of iNOS significantly affects the decrease in mass of the tibia and lumbar vertebrae, their density and strength in the course of glucocorticoid osteoporosis and sodium nitrate chronic toxicity, which indicates the development of dysregulation disorders (disturbance in NO autoregulation during its formation from exogenous precursor).