

Оригінальні дослідження

УДК 612.398.192:611.137.83:616.71-001.52-003.93

Ю.О. Безсмертний

ЕНДОТЕЛІАЛЬНА СЕКРЕЦІЯ ВАЗОАКТИВНИХ МОЛЕКУЛ У РІЗНІ ПЕРІОДИ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗУ ПРИ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ

НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, м. Вінниця

Резюме. Досліджено вплив гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ) на ендотеліальну секрецію вазоактивних молекул та стан стегнових артерій із переломом стегнової кістки в щурів у різні періоди репаративного остеогенезу. Показано, що ГГЦ викликає прогресуюче порушення синтезу вазоактивних молекул (H_2S , NO) у стегнових

артеріях щурів із переломом. Індуковані ГГЦ біохімічні зміни в судинах асоціювалися з посиленням резорбції кісткової тканини та зниженням колагенотворення.

Ключові слова: остеогенез, перелом, гіпергомоцистеїнемія, оксид азоту, гідроген сульфід.

Вступ. Репаративний остеогенез є складним генетично запрограмованим процесом, перебіг якого залежить від дії чисельних зовнішніх та внутрішніх чинників [4]. Важливе місце серед них займає група чинників, що детермінують остеоіндуктивний потенціал організму та активність процесів резорбції або біосинтезу кісткової тканини на момент травми, а саме вік, стать, наявність метаболічних розладів (цукровий діабет, атеросклероз), імунологічний статус, облітеруючі захворювання судин тощо [3, 4]. В останні роки опубліковані дані [9], які свідчать, що порушення обміну сірковмісних амінокислот – гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є незалежним чинником серцево-судинних уражень та тромбозів і асоціюється з високим ризиком остеопорозу та остеопоротичних переломів. Механізми токсичної дії високих рівнів ГЦ на кісткову тканину здебільшого пов'язують з активацією процесів демінералізації кісток, деградації колагену, хімічною модифікацією білків кісткової тканини тощо [5, 9]. Цілоком імовірно, що небажаний вплив ГГЦ на кісткову тканину може реалізовуватися через судинні механізми, в основі яких мають місце порушення обміну оксиду азоту (NO), гідроген сульфід (H₂S) та інших вазоактивних речовин [6, 10]. Натомість, роль судинних механізмів у реалізації негативного впливу ГГЦ на перебіг репаративного остеогенезу остаточно не з'ясована. Не виключено, що зміни судинної продукції H₂S та інших вазоактивних речовин, інтегровані в патогенез ГГЦ-індукованих порушень репаративного остеогенезу, ще потребують вивчення.

Мета дослідження. Вивчити ендотеліальну секрецію вазоактивних речовин (NO, H₂S) та біохімічні зміни у стегнових артеріях щурів із модельним переломом стегнової кістки за умов ГГЦ у різні періоди репаративного остеогенезу.

Матеріал і методи. Досліди проведені на 67 білих нелінійних щурах-самцях. Під час експериментів всі тварини перебували в стандартних умовах, з 12-годинним світлотіньовим режимом,

вільним доступом до води та їжі й отримували напівсинтетичну крохмально-казеїнову дієту з контрольованим вмістом усіх макро- та мікронутрієнтів. Згідно з умовами експерименту дослідні тварини розподілені на три групи. Тваринам 2-ї та 3-ї груп у стерильних умовах формували поперечний перелом стегнової кістки. Перелом проводили ортопедичним сепараційним диском у середній третині діафіза стегнової кістки, розпилюючи його на 2/3 товщини та подальшим надломом кістки. У кістковомозковий канал проксимального та дистального відламків вводилася спиця Кіршнера діаметром 1 мм. Після зіставлення уламків, проводили гемостаз та ушивання рани. Додаткова іммобілізація перелому не застосовувалася. ГГЦ створювали у тварин три групи (23 тварини) шляхом уведення D,L-гомоцистеїну (Fluka, Німеччина) у дозі 100 мг/кг маси тіла інтрагастрально на 1 % розчині крохмалю 1 раз на добу протягом 14 діб до та 45 діб після проведеної операції. Контрольну групу складала 21 інтактна тварина. На 15-у, 30-у та 45-у добу по 7-8 щурів із кожної групи піддавали евтаназії шляхом декапітації під легким ефірним наркозом. Досліди виконували згідно з міжнародними вимогами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Strasbourg, 1986), правил гуманного відношення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики ВМУ ім. М.І. Пирогова.

Після виділення, стегові артерії ретельно промивали холодним 1,15 % розчином калію хлориду, видаляли адвентицію, а ендотеліальний та м'язовий шари гомогенізували в середовищі 1,15 % калію хлориду (співвідношення 1:4), гомогенат центрифугували при 600 g та 4°C упродовж 30 хвилин, отриманий пост'ядерний супернатанат використовували для досліджень. Активність НАДФН-оксидази (КФ 1.6.3.1) вимірювали за падінням поглинання НАДФН при 340 нм. Сумарну активність NO-синтаз (eNOS та iNOS,

КФ 1.14.13.39) встановлювали за кількістю утвореного нітрит-аніона (NO_2^-) після інкубації (60 хв) гомогенату артерій у середовищі, 1 мл якого містив 50 мМ KH_2PO_4 -NaOH-буфер (рН 7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ НАДФН, 2,2 мМ L-аргініну [2]. Активність цистатіонін- γ -ліази (КФ 4.4.1.1) визначали за кількістю утвореного з цистеїну H_2S за реакцією з N,N-диметилпарафеніл-ендіаміном [1]. Активність тіоредоксин-дисульфід-редуктази (тіоредоксинредуктази, КФ 1.8.1.9) визначали за швидкістю НАДФН-залежного відновлення 5,5'-дитіобіс(2-нітробензоату). Рівень ГЦ у сироватці крові визначали імуноферментним методом набором «Homocysteine EIA» (Axis-Shield, Англія). Вміст H_2S у сироватці крові визначали спектрофотометричним методом за реакцією з парафенілдіаміном [1]. Суму нітритів та нітратів у сироватці крові визначали за реакцією з реактивом Грісса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині аміаку.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм «MS Excel XP». Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що в щурів із модельним переломом стегнової кістки (2-а група) рівень ГЦ у сироватці крові практично не відрізнявся від такого у здорових щурів ($7,68 \pm 0,39$ проти $7,10 \pm 0,27$ мкмоль/л у контролі). Тривале уведення тіолактону ГЦ супроводжувалося формуванням ГГЦ у щурів 3-ї групи (перелом + ГГЦ). При цьому вміст ГЦ збільшився у 2,5 раза на 15-у добу та в 2,9-3,2 раза на 30-у та 45-у добу досліджу (p<0,05).

В умовах нормогомоцистеїнемії на 15-у добу після перелому (стадія реорганізації тканинних структур) суттєвих змін вмісту вазодилаторів H_2S та стабільних метаболітів NO (нітратів та нітритів) у сироватці крові не реєструвалось (табл. 1). Дефіцит вазодилаторів розвивався у тварин із переломом на тлі ГГЦ. Так, на 15-у добу після травми зниження вмісту H_2S та нітратів і нітритів становило 28,7 та 24,8 %, на 30-у добу – 36,7 та 34,7 %, на 45-у добу – 39,3 та 39,0 % відносно тварин 2-ї групи.

Негативна динаміка вмісту вазоактивних медіаторів у сироватці крові у тварин із переломом за ГГЦ асоціювалася зі зниженням активності ферментів, що забезпечують їх утворення в судинах і, зокрема, у стegovих артеріях (табл. 2). Так, у щурів 3-ї групи (перелом + ГГЦ) за станом на 15-у добу реєструвалося зниження (на 30,2 та 17,9 %) активності цистатіонін- γ -ліази та сумарної активності NO-синтази. Зі збільшенням терміну ГГЦ виявлені порушення поглиблювались і на 30-у добу їх активність становила 36,7 та 27,8 %, на 45-у добу – 40,7 та 32,3 % відповідно відносно тварин 2-ї групи.

На 15-у добу після перелому спостерігалось помірне підвищення (на 33,3 та 15,6 %) активності прооксидантного та прозапального ферменту

НАДФН-оксидази та антиоксидантного ензиму тіоредоксинредуктази в стegovих артеріях, але на 30-у добу активність цих ферментів повністю нормалізувалась (табл. 3). Зазначені зміни в активності вказаних ферментів, очевидно, пов'язані з посттравматичною запальною реакцією в травмованих тканинах. За ГГЦ приріст активності НАДФН-оксидази на 15-у добу був істотно більшим (на 72,3 % відносно 2-ї групи) і зберігався на 30-у та 45-у добу після травми. За станом на 15-у добу активність тіоредоксинредуктази стegovих артерій у щурів 3-ї групи (перелом + ГГЦ) була на 39,8 % меншою, ніж у щурів 2-ї групи і в подальшому ці відмінності посилювались.

Індуковані ГГЦ зміни у стegovих артеріях та дефіцит вазодилаторів у сироватці крові можуть негативно відобразитися на об'ємі та структурі регенерату, оскільки виразність репаративних процесів у травмованих тканинах значною мірою визначається ступенем дезінтеграції кровопостачання, порушенням трансапілярного обміну та гіпоксією, що призводить до порушення трофіки в зоні ураження [3]. Доведено [7], що NO, який синтезується за участі ендотеліальної NO-синтази, відіграє важливу роль у регуляції кісткового кровообігу, остеогенної диференціації клітин-попередників та мінералізації регенерату. Пригнічення ендотеліальної секреції NO погіршує зрощення переломів та зменшує остеогенний потенціал мезенхімальних клітин кісткового мозку [11]. Як свідчать дані [8], біологічно активний метаболіт сірковмісних амінокислот H_2S не лише залучений до регуляції тону судин, а й стимулює експресію остеокальцину та проліферацію остеобластів. Цілком очевидно, що токсичний ефект ГГЦ на кісткову тканину реалізується і через порушення судинної продукції H_2S та NO.

Проведені дослідження підтвердили, що прогресуюче погіршення стану стegovих артерій супроводжувалося поглибленням метаболічного дисбалансу в кістковій тканині при переломі. Так, при ГГЦ активність процесів резорбції кісткової тканини була значно вищою, а колагеноутворення нижчим, ніж за умов нормогомоцистеїнемії. Зокрема, за станом на 45-у добу вміст вільного оксипроліну в сироватці крові у щурів 3-ї групи (ГГЦ + перелом) перевищував такий у щурів 2-ї групи (перелом) у 2 рази ($55,7 \pm 0,70$ проти $27,3 \pm 0,42$ мкмоль/л, p<0,05), пептидозв'язаний оксипролін, навпаки, був меншим в 1,4 раза ($35,6 \pm 0,88$ проти $48,3 \pm 2,25$ мкмоль/л, p<0,05), а вміст глікозаміногліканів підвищився в 1,4 раза ($77,8 \pm 1,77$ проти $55,7 \pm 1,67$ мкмоль/л, p<0,05).

Таким чином, порушення судинної продукції вазодилаторів (H_2S , NO) у стegovих артеріях інтегровані в патогенез дизрегенерації довгих кісток при синдромі ГГЦ.

Перспективним напрямком подальших досліджень є вивчення поширеності порушень обміну ГЦ та H_2S у пацієнтів з хронічними суглобами з метою розробки нових діагностичних та прогностичних критеріїв вказаної патології.

Висновки

1. За умов нормогомоцистеїнемії на 15-у добу після перелому стегнової кістки спостерігалось помірне зростання активності прооксидантного НАДФН-оксидази (на 35,5 %) та антиоксидантного тиредоксинредуктази (на 48,9 %) ензимів у стегнових артеріях із подальшою їх нормалізацією на 30-у та 45-у добу експерименту. Продукція вазоактивних молекул (H_2S , NO) протягом всього терміну досліджу суттєво не змінювалась.

2. Гіпергомоцистеїнемія зумовлювала прогресуюче зниження вмісту вазоактивних речовин H_2S та NO (на 24-39 %) у сироватці крові та пригнічення цистатитон- γ -ліази та NO-синтази (на 27-41 %) у стегнових артеріях щурів із переломом стегнової кістки. При гіпергомоцистеїнемії на 15-у добу після перелому спостерігався різкий приріст активності НАДФН-оксидази (на 72,3 %) та зниження активності тиредоксинредуктази (на 39,8 %). Зазначені відхилення зростали на 30-у та 45-у добу після травми і асоціювалися з посиленням резорбції кісткової тканини (збільшенням вмісту вільного оксипроліну та глікозаміногліканів у сироватці крові) та пригніченням колагенотворення (зниженням вмісту пептидозв'язаного оксипроліну).

Перспективи подальших досліджень направленні на з'ясування ролі гіпергомоцистеїнемії в розвитку порушень репаративної регенерації кісткової тканини та розробку патогенетично обґрунтованих підходів до профілактики та лікування кісткової дизрегенерації, асоційованої із синдромом гіпергомоцистеїнемії.

Література

1. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, Л.О. Пентюк [та ін.] // Вісн. наук. досліджень. – 2009. – № 1. – С. 29-32.
2. Гула Н.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом / Н.М. Гула, Г.В. Косякова, А.Г. Бердишев // Укр. біохім. ж. – 2007. – Т. 79, № 5. – С. 153-158.
3. Климовицкий В.Г. Возможные пути оптимизации репаративных процессов у пострадавших с пере-

ломами длинных костей конечностей (Взгляд на проблему) / В.Г. Климовицкий, В.Н. Пастернак, В.М. Оксимец // Ортопедия, травматол. и протезир. – 2006. – № 1. – С. 90-100.

4. Корж Н.А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Нарушение регенерации кости (Сообщение 2) / Н.А. Корж, К.К. Романенко, Л.Д. Горидова // Ортопедия, травматол. и протезир. – 2006. – № 1. – С. 84-90.
5. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології / О.О. Пентюк, М.Б. Луцюк, І.І. Андрушко [та ін.] // Укр. біохім. ж. – 2003. – Т. 75, № 1. – С. 5-17.
6. Утворення гідроген сульфід у органах щурів / Н.В. Заїчко, Н.О. Пентюк, А.В. Мельник [та ін.] // Мед. хімія. – 2009. – Т. 11, № 4. – С. 7-13.
7. Osteogenic differentiation of human mesenchymal bone marrow cells in silk scaffolds is regulated by nitric oxide / P.D. Damoulis, D.E. Drakos, E. Gagari [et al.] // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2007. – Vol. 1117. – P. 367-376.
8. Hydrogen sulfide protects MC3T3-E1 osteoblastic cells against H₂O₂-induced oxidative damage-implications for the treatment of osteoporosis / Z.S. Xu, X.Y. Wang, D.M. Xiao [et al.] // Free Radic Biol Med. – 2011. – Vol. 50, № 10. – P. 1314-1323.
9. Hyperhomocysteinemia induces a tissue specific accumulation of homocysteine in bone by collagen binding and adversely affects bone / M. Herrmann, A. Tami, B. Wildemann [et al.] // Bone. – 2009. – Vol. 44, № 3. – P. 467-475.
10. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Beltowski // Pharmacol. Rep. – 2007. – Vol. 59, № 1. – P. 4-24.
11. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition / N.M. Ocarino, J.N. Boeloni, A.M. Goes [et al.] // Nitric Oxide. – 2008. – Vol. 19, № 4. – P. 320-325.

ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ СЕКРЕЦИЯ ВАЗОАКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ РЕПАРАТИВНОГО ОСТЕОГЕНЕЗА НА ФОНЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ*Ю.А. Бессмертный*

Резюме. Исследовано влияние гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на эндотелиальную секрецию вазоактивных молекул и состояние бедренных артерий крыс с переломом бедренной кости в разные сроки репаративного остеогенеза. Показано, что ГГЦ вызывает прогрессирующее нарушение синтеза вазоактивных молекул (H_2S та NO) в бедренных артериях крыс с переломом. Индуцированные ГГЦ биохимические изменения в сосудах ассоциировались с усилением резорбции костной ткани и снижением колагенообразования у крыс с переломом.

Ключевые слова: остеогенез, перелом, гипергомоцистеинемия, оксид азота, гидроген сульфид.

**ENDOTHELIAL SECRETION OF VASOACTIVE MOLECULES IN DIFFERENT PERIODS
OF REPARATIVE OSTEOGENESIS IN HYPERHOMOCYSTEINEMIA**

Y.O. Bezsmertnyi

Abstract. The effect of hyperhomocysteinemia (HHC) on the endothelial secretion of vasoactive molecules and the condition of the femoral arteries with a fracture of the femoral bone has been studied in rats at different periods of reparative osteogenesis. HHC has been shown to bring about a progressive disturbance of the synthesis of vasoactive molecules (H₂S, NO) in the femoral arteries of rats with a fracture. Biochemical changes in the vessels were associated with enhanced resorption of the osseous tissue a decrease of the collagen formation.

Key words: bone formation, fracture, hyperhomocysteinemia, nitric oxide, hydrogen sulfide.

Research Institute of Invalid Rehabilitation of Vinnitsa National
M.I. Pyrohov Memorial Medical University (Vinnitsia)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 2 (62). – P. 3-6

Надійшла до редакції 17.02.2012 року

© Ю.О. Безсмертний, 2012

V гастроентерологічний тиждень

**19-21 вересня 2012 року
м. Дніпропетровськ**

Адреса оргкомітету:
ДУ «Інститут гастроентерології АМНУ»,
Українська гастроентерологічна Асоціація
пр. ім. газети «Правда», 96
м. Дніпропетровськ, 49074
тел./факс (0562)-27-79-47
e-mail: gastrodnepr@ukrpost.ua