

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Ганеев Т.И., Юнусов Р.Р., Камилов Ф.Х., 2017
УДК 612.441:611.018.4:611.018.23
DOI:10.23888/HMJ20172158-164

СОСТОЯНИЯ ФОСФОРНО-КАЛЬЦИЕВОГО ОБМЕНА И КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ

Т.И. ГАНЕЕВ, Р.Р. ЮНУСОВ, Ф.Х. КАМИЛОВ

Башкирский государственный медицинский университет,
ул. Ленина, 3, 450008, г. Уфа, Российская Федерация

При экспериментальном гипотиреозе, вызванном путём ежедневного внутрижелудочного введения мерказолила в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела в течение 21 дня, у самцов белых беспородных половозрелых крыс в сыворотке крови определены уровни тиреоидных гормонов, тиреотропина, общего кальция, фосфора, магния, костной щелочной фосфатазы, С-концевых телопептидов коллагена типа I. В бедренных костях животных контрольной и опытной групп изучена гистологическая структура диафиза окраской гематоксилином и эозином. Развитие гипотиреоза подтверждается снижением содержания тироксина и трийодтиронина на фоне увеличения секреции тиреотропного гормона.

При развитии мерказолилового гипотиреоза в сыворотке крови содержание маркера костной резорбции С-концевых телопептидов коллагена типа I снижается незначительно, в то время как маркер костеобразования – активность костного изофермента щелочной фосфатазы уменьшается статистически значимо. Полученные результаты отражают нарушения костного ремоделирования с замедлением фазы формирования новой кости.

Так, уровень С-концевых телопептидов костного коллагена у интактных животных составил $0,87 \pm 0,06$ нг/мл, у крыс опытной группы снизился до $0,78 \pm 0,04$ нг/мл ($p > 0,1$), активность костной щелочной фосфатазы при мерказолиловом гипотиреозе понизилась до $4,8 \pm 0,36$ Е/л, у интактных крыс была равной $6,1 \pm 0,46$ Е/л ($p < 0,05$). Это приводит к нарушениям гистологической структуры костной ткани. В диафизах трубчатых костей крыс с гипотиреозом при изучении микроструктуры выявлены участки истончения кортикальной кости, потеря массы ткани, деформации и деминерализации остеонов, сужение просвета остеонов и другие признаки, характерные для развивающегося диспластического остеопороза.

Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, кальций, фосфор, костная щелочная фосфатаза, С-концевые телопептиды коллагена типа I, трубчатые кости, микроструктура.

STATE CALCIUM-PHOSPHORUS METABOLISM AND BONE TISSUE IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM

T.I. GANEEV, R.R. YUNUSOV, F.H. KAMILOV

Bashkir State Medical University, Lenina str., 3, 450008, Ufa, Russian Federation

In experimental hypothyroidism caused by intragastric administration merkazolila daily dose of 2,5 mg/100 g body weight for 21 days in male albino adult rats determination of serum levels of thyroid hormone, thyrotropin, total calcium, phosphorus, magnesium, bone alkaline phosphatase, C-terminal telopeptide of collagen type I. The thighs animal control and experimental groups studied histological structure diaphysis H&E stain. The development of hypothyroidism is confirmed by a decrease in the content of thyroxine and triiodothyronine, with increased secretion of thyroid-stimulating hormone.

With the development of merkazolil hypothyroidism in serum levels of bone resorption marker C-terminal telopeptides of type I collagen is reduced slightly, while the bone formation marker – izoferment alkaline bone phosphatase activity decreases significantly. These results reflect the disturbances of bone remodeling with a slowing phase of formation of new bone.

Thus, the level C-terminal telopeptide bone collagen in intact animals was $0,87 \pm 0,06$ ng/ml, test group of rats decreased to $0,78 \pm 0,04$ ng/ml ($p > 0,1$), the activity of bone alkaline phosphatase at merkazolil hypothyroidism decreased to $4,8 \pm 0,36$ U/l, in intact rats was equal to $6,1 \pm 0,46$ U/l ($p < 0,05$). This leads to violations of the histological structure of bone tissue. The diaphysis of tubular bones of rats with hypothyroidism in the study of the microstructure revealed areas of thinning of cortical bone mass loss of tissue deformation and demineralization osteones, luminal narrowing osteones and other features characteristic of dysplastic developing osteoporosis.

***Keywords:* experimental hypothyroidism, calcium, phosphorus, bone alkaline phosphatase, C-terminal telopeptides of Type I collagen, tubular bone microstructure.**

Территория Республики Башкортостан относится к региону с дефицитом йода и связанной с ним зубной эндемии. Эндемия йоддефицитных состояний включает широкий круг патологий, характеризуемый снижением функциональной активности щитовидной железы. Гипотиреоз и гипертиреоз ассоциируются с риском развития остеопороза [1, 2]. Экспрессия рецепторов йодированных гормонов щитовидной железы выявлена как в остеобластах, так и остеокластах [3]. Гипотиреоз сопровождается уменьшением в костях количества базисных многоклеточных единиц, в которых происходят сопряжённые во времени процессы локальной резорбции и костеобразования. При этом увеличивается продолжительность фаз цикла ремодели-

рования и особенно удлиняется продолжительность времени минерализации вновь образованных остеонов [4]. Процесс костного ремоделирования представляет собой замечательный механизм, одновременно способствующий поддержанию гомеостаза кальция и целостности кости, её адаптивной перестройки согласно механическим стимулам и потребностям организма. Дисбаланс циклов ремоделирования при гипотиреозе в конечном итоге приводит к снижению костной массы, нарушению микроархитектуры с увеличением хрупкости костной ткани и повышением риска переломов [5]. В литературе имеются данные о том, что при гипотиреозе в основном страдает губчатая кость, а в кортикальной кости происходит даже избыточная минерализа-

ция [6], что, однако не приводит к снижению риска переломов. Механизмы этих явлений не до конца изучены [2], возможно тиреоидные гормоны влияют на биологическую доступность и действие эстрогенов и/или андрогенов [7]. Другие авторы [5] нарушения течения ремоделирования при действии тиреоидных гормонов связывают с изменением активности в костной ткани дейодиназ D2 (активатор образования T3) и D3 (инактиватор T3) в остеобластах.

Цель исследования

Охарактеризовать изменения фосфорно-кальциевого обмена и гистоструктуры костной ткани при экспериментальном гипотиреозе у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты были поставлены на 26 самцах белых беспородных половозрелых крыс массой 200-210 г. При проведении опытов были соблюдены требования и этические нормы по гуманному отношению к лабораторным животным (приказ Минздрава РФ от 19.06.2003 г. №267 «Об утверждении лабораторной практики»). Животные содержались в стандартных условиях вивария с естественной световым режимом, на стандартной диете лабораторных животных (ГОСТ 50258-92). У животных опытной группы моделировали гипотиреоз путем ежедневного внутривентрикулярного введения с помощью металлического зонда мерказолила из расчёта 2,5 мг на 100 г массы тела в течение трёх недель [8]. На 22-е сутки животных под эфирным наркозом забивали декапитацией. В сыворотке крови исследовали содержание общего кальция, фосфора, магния колориметрическим методом, набор реагентов фирмы «HUMAN» (определение Ca с использованием D-крезолфатеин-комплексона, P-молибденокислого аммония, Mg-1-(2-оксиазо)-2-нафтол-3-(2,4-диметил)-карбоксамид). Методом иммуноферментного анализа изучали содержание маркёров костного обмена – костную щелочную фосфатазу (реагенты «Metra BAFKit» фирмы Quidel Corporation), C-концевых телопептидов коллагена типа I (реагенты «Serum Cross Laps Elisa» фирмы Nordie Biosince

Diagnostic A/S), а также уровень тиреотропина, общих T3 и T4 (реагенты ЗАО «Вектор-Бест») на полуавтоматическом анализаторе «Униплан». Для характеристики гистологической структуры костной ткани кусочки бедренной кости фиксировали в 10% нейтральном формалине, декальцинировали в течение 3-х недель в 7% растворе азотной кислоты (со сменой раствора каждую неделю), промывали, делали общепринятую проводку, заливали парафином в блоки, изготавливали срезы толщиной 7-8 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Изучение микроскопических срезов осуществляли под микроскопом серии M3-300 (Австрия), микрофотографии производили с помощью фотоаппарата Nikon Coolpix 4500.

Статистическую обработку проводили, применяя пакет программ Statistica 6,0 (Stat Soft), с расчётом арифметической средней (M), стандартной ошибки средней арифметической (m) с оценкой значимости межгрупповых различий по t-критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Определение в сыворотке крови опытной группы животных содержания тиреотропного гормона (ТТГ), общего тироксина (oT4) и общего трийодтиронина (oT3) подтвердили развитие гипофункции щитовидной железы со снижением секреции гормонов на фоне повышения ТТГ по окончании 3-х-недельного введения мерказолила (табл. 1).

Результаты определения в сыворотке крови показателей минерального обмена и ремоделирования костной ткани (табл. 2) показали, что при развитии мерказолилового гипотиреоза статистически значимых изменений сыворотки крови кальция, фосфора и магния не наблюдается, но имеется тенденция к снижению уровня Ca и P.

При гипотиреозе установлено повышение секреции паратиреоидного гормона, как адаптационная реакция на замедление костного ремоделирования с развитием гипокальциемии, снижение уровня кальцитонина и повышение кальцитриола [9].

Таблица 1

Содержание тиреотропина и тиреоидных гормонов в сыворотке крови самцов белых крыс при интоксикации мерказолилом

Гормоны	Контрольная группа, n=10	Опытная группа, n=8	P
ТТГ, мМЕ/л	1,11 ± 0,105	1,98 ± 0,166	<0,01
оТ4, нмоль/л	76,6 ± 3,33	61,9 ± 3,30	< 0,05
оТ3, нмоль/л	3,11 ± 0,19	1,8 ± 0,156	< 0,01

Таблица 2

Уровень показателей минерального обмена и маркеров метаболизма костной ткани при экспериментальном мерказолиловом гипотиреозе у самцов крыс

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа n=8	P
Са общий, ммоль/л	2,24 ± 0,087	2,01 ± 0,166	> 0,2
P, ммоль/л	1,81 ± 0,054	1,74 ± 0,065	> 0,5
Mg, ммоль/л	0,86 ± 0,063	0,88 ± 0,053	> 0,5
КЩФ, Е/л	6,1 ± 0,46	4,8 ± 0,36	< 0,05
β- Cross Laps, нг/мл	0,87 ± 0,06	0,78 ± 0,04	> 0,1

Содержание маркера костной резорбции – С-концевых телопептидов коллагена типа I (β-Cross Laps) у крыс опытной группы снижается незначительно, а маркер костеобразования – костная щелочная фосфатаза уменьшается статистически значимо. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении костного ремоделирования со значительным замедлением фазы формирования костной ткани, что приводит к нарушениям структуры костной ткани, которые обнаружили при её гистологическом изучении. На рисунках 1-4 представлены микрофото гистоструктуры диафиза бедренной кости животных контрольной и опытной группы.

У крыс контрольной группы (рис. 1) кортикальная кость представлена с развитой сетью разнонаправленных гаверсовых каналов различного калибра. Под надкостницей и эндостом параллельно поверхности кости располагаются наружный и внутренний слой компактного вещества, образованные системой костных пластинок. Остеоциты, располагающиеся между наружными и внутренними общими пластинками, имеют отростчатую форму. Остеоны между собой соединены вставоч-

ными пластинками. В центре остеона располагаются кровеносные сосуды, встречаются прободающие каналы.

При экспериментальном гипотиреозе определяется значительное изменение гистоструктуры диафиза трубчатых костей. Толщина стенки бедренной кости неравномерная, отмечается чередование достаточно толстого участка с участком истончения кости. Особенно значительным изменениям подвергаются цементирующие (спайные) линии, расположенные между общими пластинками и остеонами и между пакетами костных пластинок (рис. 2). Определяется потеря массы костной ткани. Костные пластинки, объединенные в костные пакеты, местами имеют светлую зону, местами отслаиваются друг от друга, указывая на наличие дистрофических изменений с деминерализацией костной ткани. Встречаются деформированные участки общих (генеральных) пластинок (рис. 3). Выявляется нарушение процессов формирования костной ткани (костеобразования), которые проявляются очаговыми изменениями массы костных структур. При этом наблюдается сужение просветов остеонов (рис. 4).

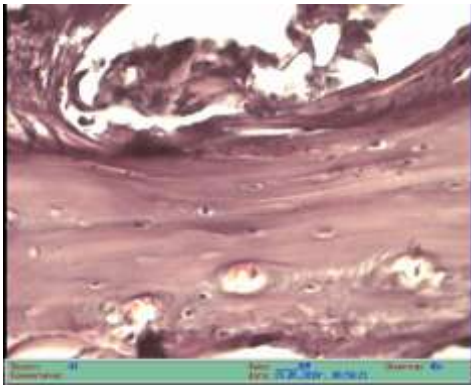


Рис. 1. Надкостница, компактная кость и эндост диафиза трубчатых костей контрольной группы животных. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, ОК10, об. 40

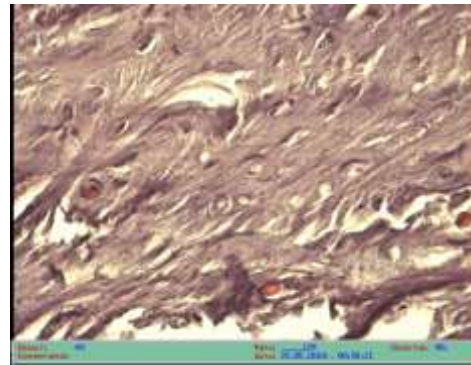


Рис. 2. Расширение цементирующих линий трубчатых костей при гипотиреозе подопытных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, ОК10, об. 40

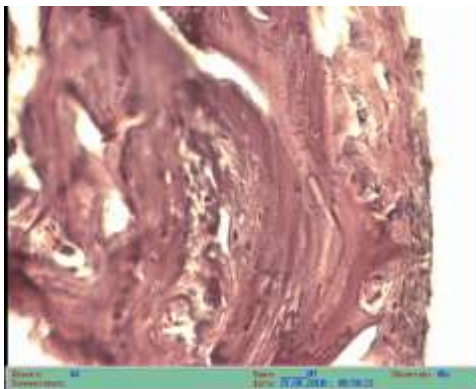


Рис. 3. Зона деформации структур трубчатых костей при гипотиреозе подопытных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, ОК10, об. 40

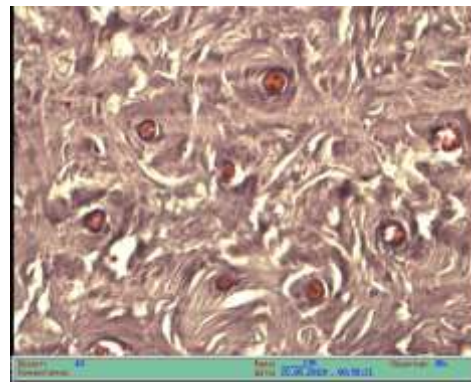


Рис. 4. Сужение просветов остеонов с нарушениями спаивающих линий трубчатой кости при гипотиреозе подопытных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Микрофото, ОК10, об. 40

Таким образом, у животных опытной группы с экспериментальным мерказолиловым гипотиреозом в костной ткани наблюдаются изменения, характерные для диспластического остеопороза.

Выводы

1. Трёхнедельное ежедневное внутрижелудочное введение мерказолила в дозе 2,5 мг на 100 г массы животных вызывает у белых беспородных крыс развитие изменений, характерных для гипотиреоза: снижение в сыворотке крови содержание тиреоидных гормонов при увеличении уровня тиреотропина.

2. Экспериментальный гипотиреоз сопровождается незначительными изменениями (снижением) содержания в сыворотке крови животных уровней фосфора и общего кальция, статистически значимого падения уровня костной щелочной фосфатазы на фоне сохранения концентрации С-концевых телопептидов коллагена типа I, отражая нарушения течения процессов ремоделирования.

3. Изучение гистоструктуры диафизов трубчатых костей, при экспериментальном гипотиреозе выявляет признаки, характерные для развивающегося диспластического остеопороза.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Марова Е.И. Остеопороз в клинике эндокринных заболеваний: руководство по остеопорозу / под ред. Л.И. Беневоленской. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. С. 363-369.
2. Cardoso L.F., Maciel L.M., de Paula Fj.A. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism // *Arg. Bras. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 58/5. P. 452-463.
3. Meunier P. The thyroid and tissues. In. *Thyroid Hormones and Bone*, 1994. P. 89-93.
4. Eriksen E.F. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and metabolic bone disease // *Endocr. Rev.* 1986. Vol. 7. P. 251-263.
5. Nicholls J.J., Brassili N.J., Williams G.R., Bassett J.H.D. The skeletal consequence of thyrotoxicosis // *J. Endocr.* 2012. Vol. 214. P. 209-221.
6. Gouveia C.H., Jorgetti V., Bianco A.C. Effect of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass off female rats // *J. Bone Miner. Res.* 1997; 12: 2098-2107.
7. Krassas G.E., Poppe K., Glioner D. Thyroid function and human reproductive health // *Endocrine Reviews.* 2010. Vol. 31(6). P. 702-736.
8. Козлов В.Н. Тиреоидная трансформация при моделировании эндемического эффекта у белых крыс в эксперименте // *Сибирский медицинский журнал.* 2006. №5. С. 27-30.
9. Казимирко В.К., Коваленко В.Н., Мальцев В.Н. Остеопороз: патогенез, клиника, профилактика и лечение. 2-е изд. Киев: Морион, 2006. 159 с.

References

1. Marova EI. *Osteoporoz v klinike ehndokrinnyh zabolevanij [Osteoporosis endocrine diseases in clinic]*. Osteoporosis Guide ed. LI Benevolensky. Moscow: Binom. Knowledge Lab; 2003. P. 363-69. (in Russian)
2. Cardoso LF, Maciel LM, de Paula FjA. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arg. Bras. Endocrinol. Metab.* 2014; 58 (5): 452-63.
3. Meunier P. The thyroid and tissues. In. *Thyroid Hormones and Bone*. 1994. P. 89-93.
4. Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of the remodeling sequence in normals and metabolic bone disease. *Endocr. Rev.* 1986; 7: 251-63.
5. Nicholls JJ, Brassili NJ, Williams GR, Bassett J.H.D. The skeletal consequence of thyrotoxicosis. *J. Endocr.* 2012; 214: 209-21.
6. Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effect of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass off female rats. *J. Bone Miner. Res.* 1997; 12: 2098-107.
7. Krassas GE, Poppe K, Glioner D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine Reviews.* 2010; 31 (6): 702-36.
8. Kozlov VN Tiroidnaya transformaciya pri modelirovanii ehndemicheskogo ehffekta u belyh kryс v ehksperimente [Thyroid transformation in modeling the effect of endemic white rats in the experiment]. *Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical j.]*. 2006; 5: 27-30. (in Russian)
9. Kazimirko VK, Kovalenko VN, Maltsev VN. *Osteoporoz: patogenez, klinika, profilaktika i lechenie [Osteoporosis: pathogenesis, clinical, prevention and lechenie]*. 2nd ed. Kiev: Morion; 2006. 159 p. (in Russian)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Камилов Ф.Х. – д.м.н., профессор кафедры биохимии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Российская Федерация.

E-mail: bro-raops@yandex.ru

Ганеев Т.И. – доцент кафедры ортопедической стоматологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Российская Федерация.

E-mail: ganey87@gmail.com

Юнусов Р.Р. – ассистент кафедры ортопедической стоматологии, Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Российская Федерация.

E-mail: zubnik88@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Kamilov F.H. – MD, professor, Department of biochemistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation.

E-mail: bro-raops@yandex.ru

Ganeev T.I. – associate professor, Department of prosthetic dentistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation.

E-mail: ganey87@gmail.com

Yunusov R.R. – assistant of the department of orthopedic dentistry, Bashkir State Medical University, Ufa, Russian Federation.

E-mail: zubnik88@mail.ru