

**А.О. Понирко
В.І Бумейстер**

Сумський державний університет,
Навчально-науковий медичний інститут
Суми, Україна

Надійшла: 04.05.2024

Прийнята: 15.06.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.73-77>

УДК 611.716.018.4.-001-019:616-073.75

МАРКЕРИ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПІД ЧАС ПОРУШЕННЯ КІСТКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ

Ponyrko A.O. , Bumeister V.I.  Markers of bone tissue remodeling in case of bone metabolism disorders. Sumy State University, Medical Institute, Sumy, Ukraine.

ABSTRACT. Introduction. Diabetes mellitus belongs to the group of debilitating metabolic diseases, as evidenced by the changes that occur in the organs and systems of the body. Today, experimental diabetology is of great importance for studying the pathogenesis of this disease. Functional and physiological restructuring of bone tissue occurs due to balanced processes of modeling and remodeling that run in parallel to each other. The article presents the results of the study of changes in biochemical markers of bone metabolism in rats with persistent hyperglycemia. **The aim** of the study was to determine the relationship between the level of metabolic changes in osteogenic cells and the secretion of bone remodeling markers in rat bones under conditions of experimental hyperglycemia. **Methods.** The study was conducted on 36 white laboratory rats. The rats were induced into a state of chronic hyperglycemia by a single intraperitoneal injection of alloxan dihydrate solution at a dose of 150 mg/kg body weight in 0.9% sodium chloride solution. The blood glucose level was determined by the glucose oxidase method. The level of glucose in urine was determined by the rapid method using test strips. The rats were withdrawn from the experiment every 30 days by decapitation under light thiopental-sodium anesthesia. The duration of the experiment was 60 days. Femurs were removed for the study. The study of osteogenic cells was performed by immunohistochemical analysis (IHC). The expression of osteopontin and RANKL in bone tissue was analyzed using a light microscope and the Allred scale. Statistical processing of the study results was performed using the Statistica v.10 program. **Results.** Persistent hyperglycemia leads to the development of destructive changes in osteogenic cells of the experimental group. These changes were manifested in a slowdown in bone remodeling, inhibition of osteogenic cells and their differentiation, which in turn leads to impaired growth and bone mineral density. In this case, in the rats of the experimental group, significant changes occurred already on day 30 of observation. **Conclusion.** It has been proved that in rats with a constantly high level of hyperglycemia there is a marked decrease in bone remodeling processes.

Key words: bone tissue, osteoblasts, osteoclasts, hyperglycemia, RANKL, osteopontin, metabolism.

Citation:

Ponyrko AO, Bumeister VI. [Markers of bone tissue remodeling in case of bone metabolism disorders]. Morphologia. 2024;18(2):73-7. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.2.73-77>

 Ponyrko A.O. 0000-0002-1799-7789

 Bumeister V.I. 0000-0001-8604-4458

✉ a.ponyrko@med.sumdu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Відомо, що гіперглікемія має значний негативний вплив на метаболізм кісткової тканини (КТ), що підвищує ризик перелому. Високі концентрації глюкози в організмі сповільнюють ріст клітин та мінералізацію кісток, сприяють накопиченню адипоцитів у червоному кістковому мозку, що в свою чергу впливає на зменшення кількості остеобластів [1, 2].

До маркерів ремоделювання КТ належать як клітинні, так і позаклітинні компоненти кісткової

тканини, які виділяються в кров під час резорбції та формування нової КТ [3]. Рівень кісткових маркерів безпосередньо пов'язаний із рівнем активності остеогенних клітин, таких як остеобласти та остеокласти. порушення кісткового метаболізму може виникати при різних станах, таких як остеопороз, хронічні хвороби нирок, цукровий діабет I та II типів та ін [4, 5].

Порушення секреції інсуліну лежить в основі цукрового діабету, це призводить до ряду патологічних порушень, структурних та функціональних

особливостей майже всіх тканин організму за рахунок підвищення глюкозотоксичності з розвитком ускладнень в подальшому [6-8]. Унаслідок зменшення рівня інсуліну в організмі відбувається підвищення рівня глюкози (гіперглікемія), це сприяє розвитку патологічних змін у кістках [9]. Патологічна дія гіперглікемії порушує метаболічну функцію остеобластів, що впливає на зменшення синтезу остеокальцину, остеонектину, остеопонтину [10, 11].

Остеобласти експресуючи рецептор–активатор ядерного фактору RANKL – активізують остеокласти, який зв’язуючись з рецепторами на мембрані остеокластів запускає процес їх активації та диференціації [12-14]. Як наслідок, активовані остеокласти розпочинають процес резорбції КТ, спочатку розчиняючи неорганічні та органічні компоненти соляною кислотою і катепсином К [15, 16].

Кальцинація та декальцинація кісткової тканини відбувається протягом усього життя. Одночасно з руйнацією відбувається інтенсивний синтез та накопичення міжклітинної речовини [17]. Остеобласти синтезують остеопонтин, що приймає активну участь у процесах мінералізації клітинного матриксу. Остеопонтин також стимулює диференціювання остеокластів до зрілих клітин. Відтак, регуляція ремоделювання КТ є наслідком синхронної взаємодії між остеобластами та остеокластами [18].

Дослідження останніх років говорять, що регуляція ремоделювання кісткової тканини здійснюється гормонами, серед них: паратгормон, соматотропін, кальцитонін, тироксин, кортизол. Вони мають безпосередній вплив на процеси

остеогенезу та резорбції кісткової тканини [18, 19].

Сучасні дослідження визначають КТ як таку, що має активний метаболізм та значний ступінь реактивності, для неї характерні явища безперервної перебудови за рахунок процесів резорбції та постійної проліферації кісткових клітин [20]. Знання в цьому напрямку вкрай важливі дивлячись на розвиток сучасного світу відносно впливу екзогенних та ендогенних чинників на кісткову тканину, серед яких особливе місце займає гіперглікемія.

Метою дослідження було визначення зв’язку між рівнем секреції остеопонтину і RANKL та рівнем метаболічних змін у кістках щурів за умов експериментальної гіперглікемії.

Матеріали та методи

Дослідження було проведено на 36 білих лабораторних щурах масою 90-140 г. (віварій ННМІ СумДУ). Щури методом випадкової вибірки були розділені на дві групи: експериментальну (n = 18) та контрольну (n = 18). Щурів групи експерименту вводили у стан гіперглікемії за допомогою одноразової інтраперитонеальної ін’єкції розчину дигідрату алоксану в дозі 150 мг/кг маси тіла на 0,9% розчині хлориду натрію (за методикою Н.А. Пальчикової).

Щурів виводили з експерименту на кожну 30 добу (загальна тривалість - 90 діб) шляхом декапітації під легким тіопентал-натрієвим наркозом.

Для дослідження вилучали стегнові кістки щурів. Дослідження остеогенних клітин проводили за допомогою імуно-гістохімічного аналізу (ІГХ). Аналіз експресії остеопонтину та RANKL у кістковій тканині проводили із застосуванням світлового мікроскопа і шкали Allred (табл.1).

Таблиця 1

Панель антитіл для ІГХ-дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині
Остеопонтин	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма
RANKL	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма+мембрана

Рівень глюкози в крові визначали глюкозооксидазним методом з використанням діагностичних наборів, рівень глюкози в сечі визначали на 2, 30, 60, 90-ту добу експерименту експрес-методом за допомогою тест-смужок.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Statistica v.10. Достовірно вважали різницю при значенні $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Починаючи з 2-ї доби експерименту, у щурів групи експерименту спостерігалася значна полідипсія та поліурія, середній показник рівня глюкози в крові перевищував норму у декілька раз, та становив $18,9 \pm 2,10$ ммоль/л.

Вже на 30 добу експерименту вага тварин на

$9,8 \%$ була меншою порівняно з контролем, і становила $(93,34 \pm 1,08)$ г ($p < 0,001$).

Рівень глюкози в крові щурів експериментальної групи був $(19,30 \pm 1,69)$ ммоль/л ($p < 0,001$), що у 3 рази більше за показники щурів групи контролю.

Для визначення рівня експресії остеопонтину та RANKL у кістках щурів було проведено ІГХ дослідження, під час якого ми спостерігали високий рівень експресії остеопонтину, який на $8,9 \%$ був меншим порівняно з контролем. Проте рівень експресії RANKL у щурів із гіперглікемією був більшим за показники щурів групи контролю на $15,9 \%$. Частка позитивно забарвлених клітин була на $9,0 \%$ менше порівняно з контролем. Інтенсивність забарвлення цитоплазми в клітинах – сильна (+++).

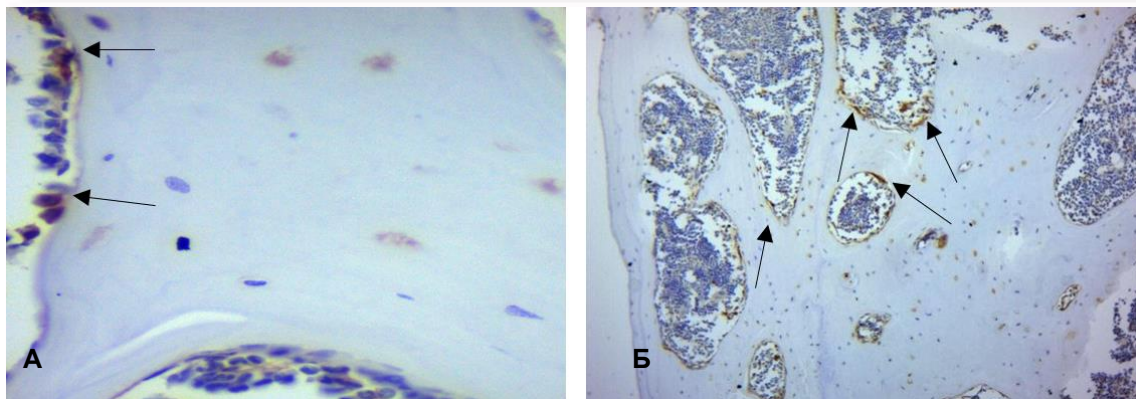


Рис. 1. Позитивна експресія остеопонтину (а) та RANKL (б) на 30-ту добу експерименту, ІГХ з гематоксином Майєра. а) $\times 400$; б) $\times 200$.

На 60 добу експерименту маса щурів дещо збільшилася та становила $(118,31 \pm 0,92)$ г ($p < 0,001$), але дефіцит маси тіла експериментальних щурів порівняно з контролем становив 10,7 %.

Рівень глюкози в крові все ще тримався високий $(13,9 \pm 1,43)$ ммоль/л, ($p < 0,001$), що у 3 рази більше за показники щурів групи контролю.

ІГХ – дослідження зразків кісток щурів показало, що відбувається зниження частки позитивно забарвлених клітин, що експресують остеопонтин та зростання показника RANKL на 15,4 %, який був більшим за показники щурів групи контролю, що може свідчити про активізацію резорбційних процесів у кістках.

Відповідно до шкали Allred було відмічено, що частка імунопозитивних клітин за показником остеопонтину відзначалась як висока, однак, вона

на 8,8 % була нижчою за показники щурів контрольної групи. Інтенсивність забарвлення цитоплазми була підвищена в трабекулярній кістковій тканині, можливо це зумовлено різною інтенсивністю метаболічних процесів кортикальної та трабекулярної кістки. Щільність кісткової тканини в деяких місцях була порушеною, про що свідчить наявність тріщин і щілин у кістковій тканині та зон кісткової резорбції.

У процесі імуногістохімічного аналізу ми спостерігали високий рівень експресії остеопонтину та RANKL в досліджуваних кістках. Проте показник експресії RANKL збільшується зі збільшенням терміну експерименту, а показники експресії остеопонтину поступово зменшувались порівняно з контролем. За дефіциту остеопонтину спостерігається сповільнення утворення КТ та прискорення втрати кісткової маси.

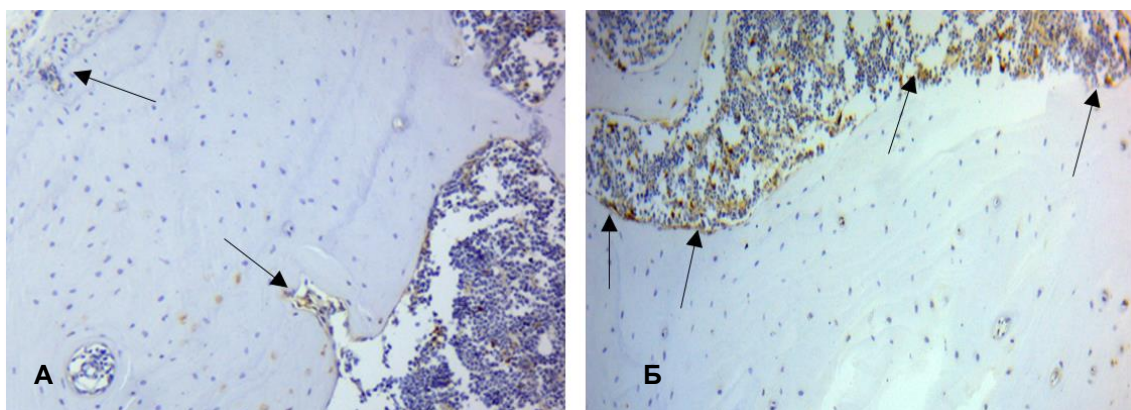


Рис. 2. Позитивна експресія остеопонтину (а) та RANKL (б) у щурів на 60-ту добу експерименту, ІГХ з гематоксином Майєра. $\times 200$.

Отримані результати показників маси тіла тварин на 90 добу експерименту вказують на достовірне зменшення показників та становили $(135,3 \pm 2,65)$ г ($p < 0,001$), що на 11,2 % менше порівняно з контролем.

Рівень глюкози в крові стабільно високий

$(13,8 \pm 1,48)$ ммоль/л, ($p < 0,001$), що також у 3 рази перевищує показники норми та підтверджує наявність стійкої гіперглікемії.

Експресія остеопонтину в різних локусах досліджуваних кісток встановила, що частка пози-

тивно забарвлених клітин була різною, що свідчить про помірну проліферативну активність клітин. Інтенсивність забарвлення клітин сильна (+++). У кістковій тканині стегнових кісток спос-

терігалася наявність тріщин та зон кісткової резорбції.

Експресія RANKL сильна та була на 15,4 % вища за показники норми. Інтенсивність забарвлення цитоплазми помірна (++).

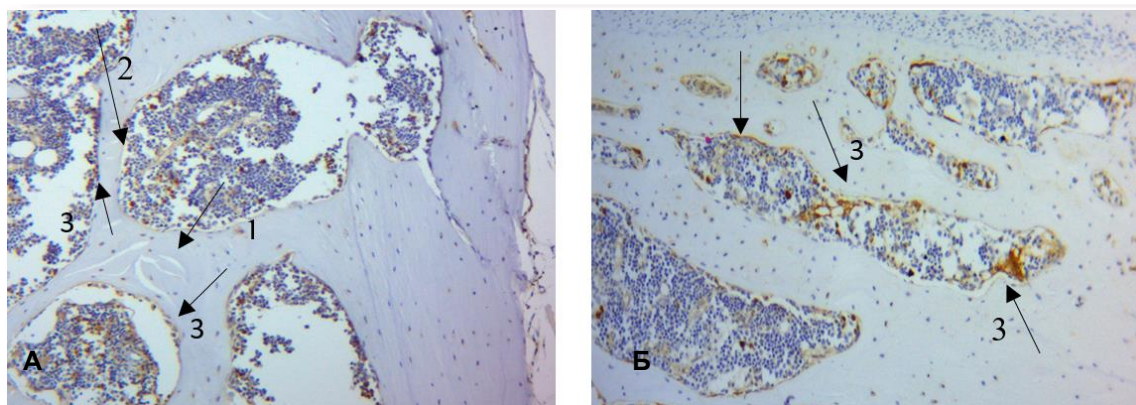


Рис. 3. Позитивна експресія остеопонтину (а) та RANKL (б) на 90-ту добу експерименту, ІГХ з гематоксиліном Майєра. 1 – тріщини КТ; 2 – наявність кісткової резорбції; 3 – експресовані клітини. $\times 400$.

Підсумок

У проведеному дослідженні було виявлено високий рівень експресії остеопонтину в кістках, проте він був нижчий порівняно з контролем. Зниження позитивно імунореактивних клітин негативно впливає на процес ремоделювання кісткової тканини та її метаболізм.

Показники експресії RANKL навпаки – найменший показник прояву спостерігався на початку з подальшим посиленням зі збільшенням терміну спостереження. Що говорить про посилення резорбційних процесів за умов стійкої гіперглікемії.

Перспективи подальших досліджень

У подальшому планується порівняти ступінь

структурних змін довгих трубчастих кісток щурів у віковому аспекті за умов хронічної гіперглікемії.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Виконання даного дослідження та написання рукопису було виконано без зовнішнього фінансування. Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Морфологічні аспекти експериментальної патології внутрішніх органів та опорно-рухового апарату» (номер державної реєстрації 0123U101135).

Літературні джерела References

1. Zhang X, Krishnamoorthy S, Tang CT, Hsu WW, Li GH, Sing CW, Tan KC, Cheung BM, Wong IC, Kung AW, Cheung CL. Association of Bone Mineral Density and Bone Turnover Markers with the Risk of Diabetes: Hong Kong Osteoporosis Study and Mendelian Randomization. *J Bone Miner Res.* 2023;38(12):1782-1790. doi: 10.1002/jbmr.4924.
2. Hofbauer LC, Busse B, Eastell R, et al. Bone fragility in diabetes: novel concepts and clinical implications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2022;10(3):207–220.
3. Capulli M, Ponzetti M, Maurizi A, et al. A complex role for lipocalin 2 in bone metabolism: global ablation in mice induces osteopenia caused by an altered energy metabolism. *J Bone Miner Res.* 2018;33(6):1141–1153.
4. Cheung CL, Tan KCB, Kung AWC. Cohort profile: the Hong Kong osteoporosis study and the follow-up study. *Int J Epidemiol.* 2018;47(2):397–398f.
5. Chau YP, Au PCM, Li GHY, et al. Serum metabolome of coffee consumption and its association with bone mineral density: the Hong Kong osteoporosis study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):dgz210.
6. Li GH, Cheung CL, Au PC, Tan KC, Wong IC, Sham PC. Positive effects of low LDL-C and statins on bone mineral density: an integrated epidemiological observation analysis and Mendelian randomization study. *Int J Epidemiol.* 2020;49(4):1221–1235.
7. Cheung CL, Sing CW, Lau WCY, et al. Treatment with direct oral anticoagulants or warfarin and the risk for incident diabetes among patients with atrial fibrillation: a population-based cohort study. *Cardiovasc Diabetol.* 2021;20(1):71.

8. Luk AOY, Ke C, Lau ESH, et al. Secular trends in incidence of type 1 and type 2 diabetes in Hong Kong: a retrospective cohort study. *PLoS Med.* 2020;17(2):e1003052.
9. Morris JA, Kemp JP, Youlten SE, et al. An atlas of genetic influences on osteoporosis in humans and mice. *Nat Genet.* 2019;51(2):258–266.
10. Mahajan A, Spracklen CN, Zhang W, et al. Multi-ancestry genetic study of type 2 diabetes highlights the power of diverse populations for discovery and translation. *Nat Genet.* 2022;54(5):560–572.
11. Liu Z, Asuzu P, Patel A, Wan J, Dagogo-Jack S. Association of bone mineral density with pre-diabetes risk among African-American and European-American adult offspring of parents with type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1065527.
12. Matsumoto T, Endo I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2021 Jan;39(1):91–105.
13. Ming J, Cronin SJF, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2020 Aug 7;10:1283.
14. Györi DS, Mócsai A. Osteoclast Signal Transduction During Bone Metastasis Formation. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 19;8:507.
15. Wu M, Ai W, Chen L, Zhao S, Liu E. Bradykinin receptors and EphB2/EphrinB2 pathway in response to high glucose-induced osteoblast dysfunction and hyperglycemia-induced bone deterioration in mice. *Int J Mol Med.* 2019 Apr;43(4):1920.
16. Guo H, Wang C, Jiang B, et al. Association of insulin resistance and beta-cell function with bone turnover biomarkers in dysglycemia patients. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:554604.
17. Starup-Linde J, Lykkeboe S, Handberg A, et al. Glucose variability and low bone turnover in people with type 2 diabetes. *Bone.* 2021;153:116159.
18. Frost M, Balkau B, Hatunic M, Konrad T, Mingrone G, Hojlund K. The relationship between bone turnover and insulin sensitivity and secretion: cross-sectional and prospective data from the RISC cohort study. *Bone.* 2018;108:98–105.
19. Picke AK, Campbell G, Napoli N, Hofbauer LC, Rauner M. Update on the impact of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and material properties. *Endocr Connect.* 2019 Mar 1;8(3):R55–R70.
20. Wang L, Li T, Liu J, Wu X, Wang H, Li X, et al. Association between glycosylated hemoglobin A1c and bone biochemical markers in type 2 diabetic postmenopausal women: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord.* 2019 Mar 12;19(1):31.

Понирко А.О., Бумейстер В.І. Маркери ремоделювання кісткової тканини під час порушення кісткового метаболізму.

РЕФЕРАТ. Вступ. Цукровий діабет належить до групи виснажливих метаболічних захворювань, про це свідчать зміни, що виникають у органах та системах організму. На сьогоднішній день експериментальна діабетологія має велике значення для вивчення патогенезу цього захворювання. Функціональна та фізіологічна перебудова кісткової тканини відбувається завдяки врівноваженим процесам моделювання та ремоделювання, що проходять паралельно один одному. В статті наведено результати дослідження зміни біохімічних маркерів кісткового метаболізму у щурів зі стійкою гіперглікемією. **Метою** дослідження було визначення зв'язку між рівнем метаболічних змін остеогенних клітин та секрецією маркерів кісткового ремоделювання у кістках щурів за умов експериментальної гіперглікемії. **Методи.** Дослідження було проведено на 36 білих лабораторних щурах. Щурів вводили у стан хронічної гіперглікемії за допомогою одноразової інтраперитонеальної ін'єкції розчину дигідрату алоксану в дозі 150 мг/кг маси тіла на 0,9% розчині хлориду натрію. Рівень глюкози в крові визначали глюкозооксидазним методом. Рівень глюкози в сечі визначали експрес-методом з використанням тест-смужок. Щурів виводили з експерименту на кожну 30 добу шляхом декапітації під легким тіопентал-натрієвим наркозом. Тривалість експерименту 60 діб. Для дослідження вилучали стегнові кістки. Дослідження остеогенних клітин проводили за допомогою імуно-гістохімічного аналізу (ІГХ). Аналіз експресії остеопонтину та RANKL у кістковій тканині проводили із застосуванням світлового мікроскопа і шкали Allred. Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою програми Statistica v.10. **Результати.** Стійка гіперглікемія призводить до розвитку деструктивних змін у остеогенних клітинах щурів експериментальної групи. Вказані зміни проявлялися у сповільненні ремоделювання кісткової тканини, пригніченні остеогенних клітин та їх диференціації, що в свою чергу призводить до порушення ростових показників та мінеральної щільності кісткової тканини. При цьому у щурів експериментальної групи достовірні зміни виникають вже на 30 добу спостереження. **Підсумок.** Доведено, що у щурів на тлі постійно високого рівня гіперглікемії спостерігається виражене зниження процесів ремоделювання в кістковій тканині.

Ключові слова: кісткова тканина, остеобласти, остеокласти, гіперглікемія, RANKL, остеопонтин, метаболізм.