

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

Научный доклад по результатам научно-квалификационной работы
(диссертации)

на тему:

**РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА (II) В РЕГУЛЯЦИИ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ И
ФОСФОРА**

направление подготовки **06.06.01 – Биологические науки**

направленность (профиль) **Физиология**

Выполнила:

Зайдуллина Алсу Ильдусовна

аспирант кафедры физиологии
и патологической физиологии

Научный руководитель:

Каримова Руфия Габдельхаевна

доктор биологических наук,
профессор

Казань – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	6
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	15
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	18
3.1	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола	18
3.2	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс разного пола	20
3.2.1	Динамика содержания уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс	20
3.2.2	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс	23
3.3	Зависимость многократных физиологических эффектов экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана на содержание кальция и фосфора в организме	25
3.3.1	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола при ежедневной стимуляции нитроксидергической системы	25
3.4	Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный остеопороз	27
3.5	Динамика изменения некоторых маркеров метаболизма костной ткани у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	28
3.5.1	Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	28

3.5.2	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	30
3.5.3	Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	31
3.5.4	Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	33
3.5.5	Активность нитроксидергической системы у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	35
3.5.6	Рентгенодиагностические исследования при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	37
3.5.7	Патоморфологические изменения при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	40
3.6	Определение остеопротективных эффектов доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз	41
3.6.1	Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	42
3.6.2	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	43
3.6.3	Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	45
3.6.4	Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	47

3.6.5	Содержание суммарного количества нитрат-и нитрит-анионов в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	49
	ВЫВОДЫ	51
	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	52
	СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Эндотелий представляет собой монослой пограничных клеток, выстилающий внутреннюю поверхность сосудистой системы от сердца до капилляров, и отделяющий циркулирующую кровь от тканей. Принято считать, что эндотелий является самой большой и наиболее важной железой организма. Эндотелиальные клетки ведут себя как рецепторно- эффекторный орган, реагирующий на различные физико-химические нейрогуморальные стимулы, происходящие внутри сосуда.

Таким образом, эндотелий играет ключевую роль в поддержании нормального тонуса, текучести крови, а также ограничении сосудистого воспаления и пролиферации гладкомышечных клеток .

Среди многочисленных биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим эндотелиальным фактором релаксации является оксид азота (NO) определяющийся практически во всех тканях. В 1980 году Furchgott R.F. и Zavadzki J.V. впервые экспериментально установили, что присутствие эндотелиальных клеток сосудов вызывает релаксацию изолированной аорты кролика в ответ на стимуляцию ацетилхолином. При удалении эндотелия из сосудов вазодилатация не отмечалась, но сохранялся ответ на нитроглицерин. Эта эндотелий-зависимая релаксация гладкой мускулатуры сосудов в ответ на ацетилхолин опосредуется эндогенным медиатором, первоначально названным эндотелиальным фактором релаксации, а впоследствии - оксидом азота.

Оксид азота (NO) - один из наиболее важных биологических медиаторов, который принимает участие во многих физиологических и патофизиологических процессах. Он является уникальным по своей природе и механизмам действия вторичным мессенджером в живой клетке, что доказано исследованиями многочисленных ученых со всего мира .

Множество исследований, проведенных к настоящему времени, позволяют констатировать факт регулирующего влияния NO на такие

процессы, как: мутагенез, апоптоз, гликолиз и перенос электронов в митохондриях; адгезия тромбоцитов и нейтрофилов, пролиферация миелоидных, прогениторных клеток; функционирование Т-лимфоцитов, опухолевых клеток, кератиноцитов; выделение питуитарных гормонов; регуляция тонуса бронхов и сфинктеров; сокращение мускулатуры кишечника, желудка, матки, сердца; нейродегенерация; регуляция артериального давления; иммунологические механизмы защиты и т.д.

В конце XX столетия учеными были сделаны выводы о ключевой роли оксида азота (NO) в снижение активности остеокластов и остеокластогенеза, связанного с костной резорбцией, установив, что в области перелома кости образование оксида азота увеличивается до максимальных концентраций, а введение ингибитора NO - синтаз сокращает скорость срастания переломов. В настоящее время нам известно, что значительную роль в процессах костного ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани играет кровоснабжение кости. Костные микрососуды имеют только эндотелий и не имеют мышечного и соединительнотканного слоев. Следовательно, именно эндотелий опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между остеобластами, остеокластами и кровью. Скорее всего, одной из причин ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани является эндотелиальная дисфункция, которая посредством негативного влияния на микроциркуляцию может приводить к нарушению процессов остеогенеза и остеорепарации, тем самым вызывая остеопороз.

В современной патогенетической терапии остеопороза не уделяется должного внимания препаратам, обладающим положительным влиянием на кровоснабжение костной ткани. Это указывает на актуальность исследования остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами.

На сегодняшний день актуальным является вопрос использования экзогенных доноров NO как при изучении механизмов действия оксида азота (NO) в организме, так и в клинических целях. Предлагается использование

экзогенных доноров для создания модельных систем *in vitro* и *in vivo*, поскольку они значительно упрощают имеющуюся в организме систему взаимодействия NO с клетками и внутриклеточными мессенджерами. Так как оксид азота (II) в этом случае поступает извне, то система оказывается независимой от NO-синтаз и их регуляции, а значит, результаты действия NO легче интерпретировать. В этом случае в значительной степени отсекаются эффекты других сигнальных веществ, которые могут сопутствовать биогенному NO.

Экзогенные доноры, в отличие от субстрата для NOS - L-аргинина, содержат NO в структуре молекулы, и их действие заключается в высвобождении этой молекулы в чистом виде.

На сегодняшний день еще не существует доноров, которые можно было бы назвать идеальными для исследований. Во-первых, NO-доноры различаются по эффективности высвобождения NO и в разной степени способны влиять на клетки. Во-вторых, эти вещества могут являться источниками побочных соединений, часто обладающих токсичностью (выделяемый нитропруссидом цианид). В-третьих постоянно высокий уровень нитратов в крови ведет к насыщению их рецепторов, расположенных в гладкой мускулатуре сосудов, истощению запасов SH-групп, обеспечивающих превращение молекул нитратов в NO; вследствие этого теряется реактивность сосудов и ослабляется вазодилатирующий эффект нитратов; при приеме нитратов на 20% снижается почечный кровоток (что поддерживает высокую концентрацию нитратов в крови) и повышается продукция контррегулирующих нейрогуморальных факторов для поддержания адекватного кровотока в почках (ренин-ангиотензиновая система), что в свою очередь затрудняет вазодилатирующее действие нитратов; уменьшается активность гуанилатциклазы и содержание цГМФ.

К числу перспективных доноров NO можно соотнести соединения бензофураксанового ряда, предложенные и синтезированные д.б.н.

Каримовой Р.Г., в качестве донора оксида азота и активатора растворимой формы гуанилатциклазы (pGC), а также других NO-зависимых ферментов.

Таким образом, актуальность изучения роли оксида азота (II) как корректирующего фактора при остеопоротических нарушениях подтверждается не только необходимостью использования установленных механизмов NO-регуляции в клинических целях (костные, почечные патологии, нарушения обмена веществ), но и возможностью предложить новый донор NO как перспективный лекарственный препарат.

Степень разработанности проблемы

Изыскание новых соединений доноров оксида азота препаратов и схем их применения для профилактики и лечения нарушений кальциево-фосфорного обмена, воздействующих на различные звенья патологического процесса, является актуальной задачей как фармации, так и ветеринарии. В современной патогенетической терапии остеопороза не уделяется должного внимания препаратам, обладающим положительным влиянием на кровоснабжение костной ткани. Это указывает на актуальность исследования остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами, таковыми являются препараты оксида азота. По химической природе среди препаратов оксида азота можно выделить такие группы, как нитраты, нитриты и нитрозотиолы, однако у этих препаратов имеются свои недостатки, такие как токсичность, кумулятивность и различная эффективность высвобождения оксида азота.

К числу перспективных доноров оксида азота следует отнести соединения бензофуроксанового ряда. Дело в том, что оксид азота в этом случае поступает извне и система оказывается независимой от NO-синтаз и их регуляции, в связи с этим в значительной степени отсекаются эффекты других сигнальных веществ, которые могут сопутствовать биогенному NO.

Следовательно, актуальность изучения роли оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора подтверждается не только

необходимостью использования установленных механизмов NO-регуляции в клинических целях.

Следовательно, изучение остеопротективных свойств экзогенного донора оксида азота (II) является актуальной проблемой.

Цель исследования - изучение роли оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику изменения количества общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче здоровых животных при стимуляции системы оксида азота (II) и ингибировании NO-синтаз.
2. Изучить активность нитроксидергической системы у здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом.
3. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у здоровых крыс.
4. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительной стимуляции системы оксида азота (II) субстратом для NOS L-аргинином.
5. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительном ингибировании NO-синтаз.
6. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительной стимуляции системы оксида азота (II) экзогенным донором NO.

Научная новизна

В работе продемонстрировано, что развивающийся экспериментальный остеопороз через две недели после введения преднизалона в дозе 50 мг/кг характеризуется ухудшением кровоснабжения костной ткани, отрицательной динамикой морфологических показателей, наличием прямой зависимости

между качеством кровоснабжения кости и микроархитектоникой, наличием признаков развития эндотелиальной дисфункции на основании функциональных тестов и биохимических исследований.

Выявлено, что экзогенный донор оксида азота хлофузан в дозе 1,0 мг/кг вводимый ежедневно в течение 30 дней животным с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом обладает эндотелиотропной активностью, а также остеопротективным действием.

В работе впервые выявлено, что хлофузан в дозе 2,0 мг/кг вводимый ежедневно в течение 30 дней животным с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом не обладает эндотелиотропной активностью, а наоборот, действует как ингибитор нитроксидергической системы.

В ходе исследования впервые выявлено, что L-аргинин в дозе 200,0 мг/кг не оказывает положительного влияния на нитроксидергическую систему и действует как его блокатор.

Таким образом, в результате выполненных исследований разработан комплекс положений и целостных представлений о роли эндотелиальной дисфункции в процессах ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани, а также патогенетически обоснованных подходов к фармакологической профилактике и коррекции их нарушений.

Научно-практическая значимость.

В работе доказана эффективность применения экзогенного донора оксида азота хлофузана в дозе 1,0 мг/кг для коррекции остеопоротических нарушений костей скелета. В эксперименте доказано, что использование исследуемого соединения позволяет нормализовать изменения в биохимическом исследовании сыворотки крови и в моче, а также в изучении содержания нитрат - и нитрит анионов в сыворотке крови. Данные соединения способствуют нормализации кровоснабжения костной ткани при развивающемся остеопорозе, замедлению отрицательной динамики микроструктурных изменений кости и биохимических показателей.

Результаты исследования позволяют рекомендовать проведение целенаправленных клинических испытаний экзогенного донора оксида азота хлофузана для изучения фармакологической остеопротективной активности при остеопорозе и переломах костей скелета на его фоне.

Методология и методы исследований. Методологической основой исследования является комплексный подход по изучению остеопоротических свойств экзогенного донора оксида азота (II) хлофузан и его лечебной эффективности при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе. Объектом исследования служили белые крысы. Системный подход включает: изучение лабораторно-диагностических факторов при нагрузке животных донорами и ингибитором NO-системы.

Основные положения выносимые на защиту:

1. Активизация системы оксида азота однократным введением экзогенного донора оксида азота (II) - хлофузана (1 мг/кг) приводит к депонированию кальция и фосфора в организме;
2. Стимуляция системы оксида азота (II) - хлофузаном (2 мг/кг) сопровождается повышением концентрации общего кальция в сыворотке крови у крыс.
3. Ингибирование NO-синтаз повышает экскрецию общего кальция с мочой в 4,0 раза.
4. Развитие глюкокортикоид-индуцированного остеопороза характеризуется снижением стабильных метаболитов NOx в 1,5 раза.
5. Многократное введение субстрата для NOS L-аргинина и ингибитора нос достоверно увеличивает содержание общего кальция в крови, что связано с саморегуляционной способностью системы NO.
6. Экзогенный донор оксида азота (II) обладает выраженными остеопротективными свойствами.

Степень достоверности и апробации результатов. Биометрическая обработка цифрового материала проведена на персональном компьютере по

общепринятым методикам вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Основные результаты исследований доложены и получили одобрение на: Международном научном форуме «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновский государственный аграрный университет - Ульяновский ГАУ. - Ульяновск, 2017); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины - СПбГАВМ. - Санкт-Петербург, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана - Казанский ГАВМ. - Казань, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Вятская государственная сельскохозяйственная академия - Вятская ГСХА. - Киров, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Оренбургский государственный аграрный университет - Оренбургский ГАУ. - Оренбург, 2017); VI Всероссийской молодёжной научно-практической конференции «Студенчество России: век XXI» (Орловский государственный аграрный университет - Орловский ГАУ. - Орел, 2018); Национальной научно-практической конференции «Научно-прикладные аспекты производства, переработки и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Ярославская государственная сельскохозяйственная академия - Ярославская ГСХА. - Ярославль, 2019); Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК» (Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана - Казанский ГАВМ. - Казань, 2019); Международной

научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: инноватика в современном мире» (Уфа, 2019);

Публикации: По теме диссертации опубликовано 17 научных статей, 3 из которых входят в список научных рецензируемых журналов включённых в Перечень ВАК при Минобрнауки российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук и 1 публикация входящая в Перечень Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 130 страницах компьютерного текста, включает в себя: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованного материала и приложение. Работа содержит 17 таблиц, 30 рисунков. Список использованной литературы включает 245 источников, из них 160 иностранных. Приложение на 12 страницах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на базе лаборатории кафедры физиологии и патологической физиологии ФГБОУ ВО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана" в период с 2015 по 2019 год.

В качестве материала для исследования были взяты биологические пробы (кровь, моча) от 312 лабораторных нелинейных крыс обоего пола нелинейных крыс и крыс линии Wistar, с массой тела 200,0 -300,0 г.

Для стимуляции системы оксида азота (II) использовали L-аргинин – субстрат для NOS, экзогенный донор NO - хлофузан и в качестве ингибитора нитроксидазной системы NOS - L-NAME.

При постановке эксперимента было сформировано XXVI групп, в каждой по 12 крыс (рисунок 2). Схематически проведенные исследования можно поделить на 6 этапов.

Первый этап включает в себя исследования содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола, где крысам I группы (n=12) внутрижелудочно вводили воду в объеме 3 мл; II группе животных (n=12) - ингибитор NO-синтаз L-NAME в дозе 20 мг/кг; животным III группы (n=12) - экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг; IV экспериментальной группе (n=12) - субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

Второй этап посвящен изучению содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс самцов: V группа - интактная (n=12); VI группа (n=12) состояла из крыс самцов, которым внутрижелудочно вводили ингибитор NO-синтаз L-NAME в дозе 20 мг/кг; VII группе самцов (n=12) вводили экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 2 мг/кг; VIII группа (n=12) получала внутрижелудочно субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

На третьем этапе аналогичные соединения в тех же объемных пропорциях, что и у самцов вводились самкам, где: IX (n=12) интактная

группа; X группа (n=12) - L-NAME; XI группа (n=12) - хлофузан; XII группа (n=12) - L-аргинин.

Четвертым этапом изучали действие ежедневной стимуляции системы оксида азота (II) на содержание общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола: крысам XIII группы (n=12) ежедневно вводили воду в объеме 3 мл, внутривентрикулярно; животным XIV группы (n=12) - экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг, внутривентрикулярно, в течение 30 дней. Взятие отбора проб проводили с интервалом в 10 дней.

На пятом этапе изучали содержание нитрат- и нитрит анионов в сыворотке крови у здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным остеопорозом. На этом этапе животные так же были разделены по половому признаку.

Шестым этапом исследовали содержание общего кальция, неорганического фосфора и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс при ежедневной стимуляции нитроксидазной системы. На этом этапе животные так же были разделены по половому признаку, где: крысы XIX группы (n=12) здоровые самцы (контрольная группа); XX группа (n=12) - интактные животные с остеопоротическими нарушениями; XXI группе самцов вводили экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг; XXII группе (n=12) - внутривентрикулярно субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг., в течении 30 дней. Самки были распределены следующими группами по аналогии самцов, где: XXIII группа (n=12) являлась контрольной группой; XXIV группа (n=12) состояла из интактных животных; XXV группа (n=12) получала хлофузан 1 мг/кг и XXVI группа (n=12) - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз у животных вызывали путем ежедневного внутривентрикулярного введения преднизолона в дозе 50 мг/кг в течении 14 дней согласно общепринятой методике [Зиганшина Л.Е., Бурнашева З.А., Валеева И.Х. 2002 г.].

Для сбора мочи крыс помещали в специальные метаболические клетки. Кровь у крыс брали из хвостовой вены, через 2 часа после введения доноров NO и ингибитора NOS.

Концентрацию кальция в сыворотке крови и моче определяли унифицированным колориметрическим методом с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Кальций в щелочной среде образует окрашенный комплекс с о-крезолфталейн комплексом. Интенсивность окраски определяли по оптической плотности при 570 нм на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия), пропорциональной концентрации кальция в пробе [26].

Количество фосфора в сыворотке крови и моче определяли спектрофотометрическим методом на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия) с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Метод основан на способности фосфат ионов образовывать в кислой среде с молибдатом аммония в присутствии детергента фосфорномолибденовый комплекс, оптическая плотность которого при длине волны 340 нм пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце [26].

Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия) с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Метод основан на том, что щелочная фосфатаза в щелочной среде катализирует реакцию дефосфорилирования синтетического субстрата р-нитрофенилфосфата (р-NPP) с образованием окрашенного продукта р-нитрофенола (р-NP). Количество образовавшегося р-нитрофенола определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорционально активности щелочной фосфатазы.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием t - критерий Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола

Для выявления содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс в зависимости от активности нитроксидергической системы нами было сформировано 4 группы (n=6) животных, которые состояли из нелинейных крыс обоего пола.

Таблица 1

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	I - Интактные	II - L-Name (20 мг/кг)	III - хлофузан (1 мг/кг)	IV - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,6 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,1^*$	$1,35 \pm 0,07^*$	$1,88 \pm 0,04^*$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,001 \pm 0,0002$	$0,005 \pm 0,0004^*$	$0,0009 \pm 0,0001^*$	$0,002 \pm 0,0001$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Количество общего кальция в сыворотке крови у интактных животных составляет $1,6 \pm 0,03$ ммоль/л ($p < 0,05$), ингибирование системы оксида азота (II) введением L-Name в дозе 20 мг/кг достоверно повышает уровень общего кальция в сыворотке крови в 1,5 раза ($p < 0,05$) и в 5,0 раз ($p < 0,05$) в моче, соответственно, что объясняется поступлением в организм ингибитора

оксида азота (II), которое приводит к увеличению концентрации кальция в сыворотке крови и моче.

Активизация системы NO экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает содержание общего кальция в крови и в моче в 1,1 раза ($p < 0,05$), обратный результат мы наблюдаем при активизации данной системы введение субстрата для NOS - L-аргинина (200 мг/кг), в данном случае количество общего кальция в сыворотке крови достоверно выше в 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой животных.

Таблица 2

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	I - Интактные	II - L-Name (20 мг/кг)	III - хлофузан (1 мг/кг)	IV - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,45 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,02^*$	$1,80 \pm 0,03^*$	$1,81 \pm 0,02^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,09 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,02 \pm 0,003^*$	$0,03 \pm 0,002^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Активизация и ингибирование системы оксида азота (II) введением блокатора NO - синтаз - L-NAME (20 мг/кг), субстрата для NOS L-аргинина (200 мг/кг) и экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана (1 мг/кг) достоверно снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке

крови в 1,3 раза ($p < 0,05$) во всех группах и в 3,0 раза в моче во II и III группах, стимуляция хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает количество неорганического фосфора в моче в 4,5 раза ($p < 0,05$), что имеет практическое значение в поддержании кальциево - фосфорного баланса у больных хронической почечной недостаточностью. Поскольку, при данном заболевании у больных наблюдается гиперфосфатемия, обусловленная замедленным выведением фосфатов с мочой, и гипокальциемия, образующейся в следствии угнетения всасывания кальция в кишечнике за счет уменьшения образования в почках активной дигидроксилированной формы витамина D3.

Таким образом, установлено, что содержание кальция в сыворотке крови и процесс экскреции его с мочой находится в зависимости от активности системы оксида азота.

3.2 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс раного пола

Ранее изученное состояние системы оксида азота в организме у разных видов животных показало зависимость полученных эффектов от пола животных, поэтому в дальнейших исследованиях экспериментальные группы животных состояли из половозрелых самцов и половозрелых самок.

3.2.1 Динамика содержания уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс

В связи с тем, что изначально нами было изучено действие экзогенного донора NO хлофузана в дозе 1 мг/кг, на следующем этапе было принято решение продемонстрировать действие этого донора в удвоенной дозе (2 мг/кг).

Стимуляция нитроксидазной системы крыс (самцов) экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном в дозе (2 мг/кг) достоверно повышает содержание общего кальция в сыворотке крови и моче у самцов, по сравнению с интактной группой в 1,87 ($p<0,05$) и 2,0 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 3

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у крыс самцов при активизации и ингибировании нитроксидазной системы

Показатель	Группа животных			
	V - интактные	VI - L-Name (20 мг/кг)	VII - хлофузан (2 мг/кг)	VIII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1^*$	$2,4 \pm 0,05^*$	$1,78 \pm 0,02^*$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,001 \pm 0,003$	$0,004 \pm 0,0004^*$	$0,002 \pm 0,0003^*$	$0,002 \pm 0,001^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Содержание общего кальция в крови и моче у самцов при введении субстрата для NOS L-аргинина (200 мг/кг) и ингибитора NO-синтаз L-NAME не привело к каким-либо достоверным изменениям по сравнению с группой животных не разделенных по половому признаку.

Таблица 4

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	V - Интактные	VI - L-Name (20 мг/кг)	VII - хлофузан (2 мг/кг)	VIII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,8 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,03^*$	$1,42 \pm 0,01^*$	$1,41 \pm 0,01^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,1 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,0009^*$	$0,03 \pm 0,004^*$	$0,02 \pm 0,003^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Аналогичная картина наблюдается по отношению к содержанию неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов, где содержание неорганического фосфора достоверно понижается во всех опытных группах как и в группах животных не разделенных по половому признаку.

Установлено, что при ингибировании системы NO и стимуляции субстратом для NOS L-аргинином экскреция фосфора с мочой у самцов достоверно уменьшается в 5,0 раз и составляет 0,02 моль/100г/24ч.

Таким образом, выявлено, что экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан в дозе 2 мг/кг достоверно повышает содержание кальция в сыворотке крови у крыс.

3.2.2 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс

Стимуляция нитроксидазной системы самок экзогенным донором NO хлофузаном (2 мг/кг) достоверно повышает количество общего кальция в 1,38 раза ($p < 0,05$) в крови и в 2,0 раза ($p < 0,05$) в моче по сравнению с интактной группой.

Сравнительный анализ половой зависимости содержания кальция в сыворотке крови и моче во всех представленных группах дает следующие результаты: в интактной группе самок количество кальция в сыворотке крови больше в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой самцов; аналогичная динамика наблюдается при ингибировании системы, в группе L-NAME, где содержание кальция в 1,18 раза ($p < 0,05$) больше у самок чем у самцов; схожие данные прослеживаются и после стимуляции системы оксида азота (II), где количество кальция в крови у самок в 1,04 раза ($p < 0,05$) больше чем у самцов, что скорее всего связано с тем что, образование оксида азота в организме у самок протекает более интенсивно по сравнению с активностью системы NO в организме самцов [Шимановского Н.Л., Гуревича К.С. 2000, Каримовой Р.Г., 2011.]

Таблица 5

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у самок крыс при активизации и ингибировании нитроксидазной системы

Показатель	Группа животных			
	IX - интактные	X - L-Name (20 мг/кг)	XI - хлофузан (2 мг/кг)	XII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,8 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,02^*$	$2,5 \pm 0,02^*$	$1,84 \pm 0,01$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,002 \pm$ $0,0003$	$0,006 \pm$ $0,003^*$	$0,004 \pm$ $0,0003$	$0,004 \pm 0,002$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Следовательно, активизация системы оксида азота (II) экзогенным донором NO – хлофузаном в дозе 2 мг/кг приводит к увеличению концентрации общего кальция в крови и моче что, скорее всего связано с саморегуляционной способностью системы оксида азота (II).

Таблица 6

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	XI - интактные	X - L-Name (20 мг/кг)	XI - хлофузан (1 мг/кг)	XII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,41 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,01^*$	$1,8 \pm 0,06^*$	$1,91 \pm 0,04^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,002 \pm 0,0003$	$0,0009 \pm 0,001^*$	$0,0007 \pm 0,006^*$	$0,0004 \pm 0,003^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

То есть, увеличение содержания метаболитов NO в организме приводит к внутриклеточному накоплению симметричного и асимметричного диметиларгинина, которые являются эндогенными ингибиторами системы NOS, о чем свидетельствуют показатели, приведенные в таблице 3 и 5, где действие ингибитора NOS и экзогенного донора оксида азота (II) действуют аналогичным образом.

Результаты, отраженные в таблицах 4 и 6 позволяют сделать вывод что, изменение активности системы оксида азота приводит к снижению фосфора в сыворотке крови у крыс. Количество неорганического фосфора в крови у крыс интактной группы составляет $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л и $2,41 \pm 0,1$ ммоль/л у самок и самцов соответственно. Нагрузка донором NO привело к

уменьшению фосфора в крови у самцов в 2,0 раза ($p<0,005$) (таблица 4), у самок – в 1,75 раза ($p<0,05$).

3.3 Зависимость многократных физиологических эффектов экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана на содержание кальция и фосфора в организме

Поскольку, ранее нами было установлено, что введение хлофузана в дозе 1 мг/кг достоверно понижает содержание общего кальция в сыворотке крови и моче, в то время как доза 2 мг/кг действует как ингибитор нитроксидергической системы, вызвало интерес определение экзогенного донора хлофузана в дозе 1 мг/кг при многократном его введении.

3.3.1 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола при ежедневной стимуляции нитроксидергической системы

Содержание кальция в сыворотке крови интактных крыс при ежедневной нагрузке водой внутрижелудочно в объеме 3,0 мл составляет $1,24\pm0,09$ ммоль/л и достоверно не меняется в течение эксперимента. На уровне тенденции в 20 день наблюдается повышение результата, а к тридцатому дню эксперимента показатель повышается в 1,12 раза ($p<0,01$) и составляет $1,5\pm0,08$ ммоль/л.

Таблица 7

Содержание общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у интактных белых крыс

Дни исследований	Показатель	
	количество общего кальция в сыворотке крови у крыс, ммоль/л (XIII группа)	количество неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс, ммоль/л (XIII группа)
до введения	1,24±0,09	2,72±0,01
10 день	1,28±0,06*	2,71±0,02
20 день	1,33±0,01*	2,73±0,04*
30 день	1,5±0,08*	2,91±0,03*

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

В сыворотке крови контрольной группы крыс содержание фосфора равно 2,72±0,01 ммоль/л, ежедневная нагрузка водой внутрижелудочно в объеме 3,0 мл достоверно не вызывает изменений концентрации неорганического фосфора в крови в течение двадцати дней. К 30-му дню этот показатель повышается в 1,11 раза ($p<0,01$) и составляет 2,91±0,03 моль/л.

Многократное введение донора оксида азота хлофузана в дозе 1,0 мг/кг сопровождается снижением концентрации кальция в сыворотке крови крыс в 1,1 раза ($p<0,01$) (1,09±0,09 моль/л против 1,30±0,01 моль/л) на десятый день эксперимента. К 20-му дню этот показатель возвращается к первоначальному уровню, а к 30-му дню эксперимента - достоверно повышается в 1,05 раза и составляет 1,42±0,01 моль/л.

Таблица 8

Содержание кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у белых крыс при ежедневном введении донора NO - хлофузана в дозе 1 мг/кг

Дни исследований	Показатель	
	количество общего кальция в крови у крыс, ммоль/л (XIV группа)	количество неорганического фосфора в крови у белых крыс, ммоль/л (XIV группа)
до введения	2,30±0,01	1,72±0,04
10 день	2,09±0,09	1,73±0,01*
20 день	2,29±0,06*	2,5±0,05*
30 день	2,42±0,01*	2,6±0,03*

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Многократное введение донора оксида азота (II) хлофузана в объеме 1,0 мг/кг увеличивает концентрацию фосфора в сыворотке крови в 1,45 раза ($p<0,01$) на 20 день исследований и сохраняется на этом уровне до конца эксперимента.

Следовательно, ежедневное поступление экзогенного донора NO-хлофузана (1,0 мг/кг) в организм белых крыс благоприятствует понижению содержания общего кальция и фосфора в сыворотке крови в течении 10 дней.

3.4 Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный остеопороз

Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный (стероидный) остеопороз вызывали путем внутрижелудочного введения препарата преднизалона в дозе 50 мг/кг в течении 14 дней.

Установлено, что глюкокортикоиды снижают абсорбцию кальция в кишечнике, увеличивают экскрецию кальция с мочой, повышают секрецию или активность паратгормона, уменьшают продукцию гонадотропинов и половых гормонов, вызывают снижение мышечной массы, деградацию коллагена. Глюкокортикоиды оказывают влияние на внутриклеточные

регуляторные системы моделирования и ремоделирования костной ткани, в том числе Wnt-сигнальный путь, систему RANKL/OPG (лиганд рецептора активатора нуклеарного κ B/остеопротегерин). Выше перечисленные механизмы стимулируют активность остеокластов и увеличивают резорбцию кости, нарушают микроархитектонику. Не менее значимым является эффект, оказываемый на остеобласты: снижение активности остеобластов, усиление апоптоза, подавление репликации или нарушение дифференцировки преостеобластов в зрелые клетки.

3.5 Динамика изменения некоторых маркеров метаболизма костной ткани у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Остеопороз – метаболическое заболевание, характеризующееся снижением костной массы и микроструктурной перестройкой костной ткани, в связи с чем снижается прочность кости и повышается риск переломов. Остеопороз, особенно на ранней стадии, не всегда можно определить по каким-либо внешним признакам. Поэтому для более точной диагностики следует провести биохимические исследования.

3.5.1 Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Поскольку кальций является одним из строительных материалов костной ткани, анализ на кальций в крови при остеопорозе необходим для определения гиперкальциемии. Остеопенический этап патологии характеризуется недостатком элемента из-за синдрома мальабсорбции, ревматоидного процесса, нарушений всасываемости кишечника или долгого приема глюкокортикоидов.

Содержание общего кальция в сыворотке крови у здоровых самцов крыс составило $1,3 \pm 0,1$ ммоль/л, что в 1,61 раза ($p < 0,01$) ниже, чем у крыс в первый день после последнего введения преднизалона 50 мг/кг, аналогичная ситуация у самок крыс, где содержание общего кальция в сыворотке крови у здоровых крыс меньше в 1,65 раза ($p < 0,01$) чем у остеопорозных.

Таблица 9

Динамика содержания общего кальция в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество общего кальция, ммоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$1,3 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,1$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$2,1 \pm 0,05^*$	$2,8 \pm 0,07^*$
опытная группа (10 день)	$1,97 \pm 0,15^*$	$1,81 \pm 0,13^*$
опытная группа (20 день)	$1,83 \pm 0,16^*$	$1,82 \pm 0,07^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К десятому дню количество общего кальция в сыворотке крови имеет тенденцию к снижению как у самцов, так и у самок, а к двадцатому дню снижается в 1,12 раза ($p < 0,01$) ($1,83 \pm 0,16$ ммоль/л против $2,1 \pm 0,05$ ммоль/л) у самцов и в 1,09 раза ($p < 0,01$) ($2,8 \pm 0,07$ ммоль/л против $1,82 \pm 0,07$ ммоль/л) у самок крыс.

Следовательно, при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе количество общего кальция в сыворотке крови возрастает, что связано со снижением кишечной абсорбции кальция, усилением почечной экскреции и ослаблением канальцевой реабсорции кальция.

3.5.2 Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Поскольку, неорганический фосфор является компонентом двигательных органов: он участвует в образовании скелетной ткани и в клеточном энергетическом метаболизме, а так же регулирует плотность костей и уровень кальция в них, поэтому определение фосфора при остеопорозе в крови необходимо при высоком риске остеомалации, исходя из этого следующим этапом изучали содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс.

Таблица 10

Динамика содержания неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество неорганического фосфора, ммоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$2,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,07$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$3,8 \pm 0,08^*$	$4,21 \pm 0,07^*$
опытная группа (10 день)	$3,7 \pm 0,33^*$	$3,33 \pm 0,13^*$
опытная группа (20 день)	$3,4 \pm 0,31^*$	$3,27 \pm 0,09$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

В контрольной группе самцов крыс количество неорганического фосфора составляет $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, в опытной группе данный показатель повышается в 1,4 раза ($p < 0,01$) ($2,8 \pm 0,04$ ммоль/л против $3,9 \pm 0,07$ ммоль/л), аналогичная ситуация наблюдается у самок крыс, в данном случае

количество неорганического фосфора в сыворотке крови выросло в 1,32 раза ($p < 0,01$) ($4,21 \pm 0,07$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

В опытной группе самцов крыс на 10 день эксперимента происходит незначительное снижение неорганического фосфора $3,7 \pm 0,33$ ммоль/л против $3,4 \pm 0,31$ ммоль/л, у самок данный показатель достоверно снижается в 1,26 раза ($p < 0,01$) и составляет $3,33 \pm 0,13$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л.

Количество неорганического фосфора остается повышенным на 20 день эксперимента у самцов крыс, у самок же данный показатель приходит в норму и составляет $3,27 \pm 0,09$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л.

3.5.3 Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Кость формируется остеобластами. Основная их функция – синтез остеоида (протеинового матрикса), который на 90-95 % состоит из коллагена 1-го типа, на 5 % – из белка остеокальцина и затем минерализуется кальцием и фосфатом из внеклеточной жидкости. Остеобласты содержат фермент щелочную фосфатазу, несут рецепторы к паратиреоидному гормону и кальцитриолу и способны к пролиферации. Минеральная часть кости состоит из гидроксиапатита и аморфного фосфата кальция, которые связаны с белками органического матрикса.

Известно, что в костях непрерывно происходят процессы ремоделирования, включающие в себя резорбцию (разрушение) существующей костной ткани и образование новой. Резорбция кости осуществляется остеокластами. Это подвижные клетки, которые выделяют протеолитические ферменты и кислую фосфатазу, вызывая деградацию коллагена, разрушение гидроксиапатита и выведение минералов из матрикса.

Щелочная фосфатаза, в данном случае, отображает активность остеобластов в костной ткани. Стимуляция остеобластов происходит при

интенсивных процессах деструкции костей, которые сопровождают остеопороз. При остеопорозе уровень щелочной фосфатазы увеличивается, причем нарушения метаболизма костной ткани возникает раньше первых изменений плотности костей, следовательно показатели фермента щелочной фосфатазы необходимы для определения состояния костей, наличия метастазов, остеодистрофии и остеопороза.

В контрольной группе самцов содержание щелочной фосфатазы составило $268,3 \pm 7,4$ ед/л, у самок - $228,3 \pm 7,4$ ед/л. Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у животных больных остеопорозом увеличивается в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самцов и 1,4 раза ($p < 0,01$) у самок, соответственно.

К десятому дню остеопороза в экспериментальной группе самцов крыс содержание щелочной фосфатазы становится выше полученных данных на первый день эксперимента и составляет $344,5 \pm 9,4$ ед/л, что показывает увеличение от первоначальных данных в 1,3 раза ($p < 0,01$).

Таблица 11

Динамика содержания щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество щелочной фосфатазы, ед/л	
	Самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$268,3 \pm 7,4$	$228,3 \pm 7,4$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$343,6 \pm 4,8^*$	$328,8 \pm 9,5^*$
опытная группа (10 день)	$344,5 \pm 9,4^*$	$322,6 \pm 12,4^*$
опытная группа (20 день)	$330,1 \pm 10,7^*$	$282,1 \pm 11,7^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К 20 дню эксперимента показатели щелочной фосфатазы у самцов и самок остаются повышенными, $330,1 \pm 10,7$ ед/л против $268,3 \pm 7,4$ ед/л у самцов и $282,1 \pm 11,7$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л у самок, следовательно глюкокортикоид-индуцированный остеопороз повышает содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови и остается в таком положении и в 20 день эксперимента.

3.5.4 Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

В кости постоянно происходят процессы разрушения старой и формирования новой ткани. Между отдельными молекулами костного коллагена имеются дезоксипиридилиновые поперечные связи. Они важны для его стабилизации. При резорбции кости происходит разрушение коллагена и выход дезоксипиридинолина в сосудистое русло.

Преобладание процессов деградации кости приводят к потере костной массы. Далее ДПИД выводится через почки с мочой. ДПИД содержится в основном в костной ткани (некоторое количество содержится в хрящевой ткани и сухожилиях), и поэтому является одним из наиболее четких параметров ее обмена. Дезоксипиридинолин - наиболее специфичный маркер резорбции костной ткани. Он преимущественно содержится в коллагене I типа костной ткани и в небольшом количестве в дентине, аорте и связках. При этом все ткани, кроме костной, характеризуются медленным обменом, и их вклад в экскрецию дезоксипиридинолина с мочой ничтожен. Экскреция дезоксипиридинолина достоверно увеличивается при остеопорозе, остеоартритах и ревматоидном артрите. Дезоксипиридинолин (ДПИД) — наиболее наглядный маркер резорбции кости, поэтому следующим этапом нами было изучено содержание дезоксипиридинолина в моче у здоровых и остеопорозных животных.

В контрольной группе животных количество дезоксипиридинолина в моче у самцов крыс составило $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л, данный показатель увеличился в 1,98 раза ($p < 0,01$) в первый же день после последнего введения глюкокортикоидов, у самок данный показатель повысился в 2,19 раза ($p < 0,01$) и составило $162,75 \pm 1,28$ пикомоль/л против $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л.

К 10-му дню содержание дезоксипиридинолина в моче у самцов незначительно снизился $146,6 \pm 5,3$ пикомоль/л против $158,0 \pm 2,8$ пикомоль/л, у самок $143,0 \pm 2,49$ пикомоль/л против $162,75 \pm 1,28$ пикомоль/л.

Таблица 12

Динамика содержания дезоксипиридинолина в моче у крыс обоего пола

Группа	Количество ДПИД, пикомоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$81,6 \pm 3,4$	$74,2 \pm 2,34$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$158,0 \pm 2,8^*$	$162,75 \pm 1,28^*$
опытная группа (10 день)	$146,6 \pm 5,3^*$	$143,0 \pm 2,49^*$
опытная группа (20 день)	$138,1 \pm 4,7^*$	$141,1 \pm 3,2^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К двадцатому дню эксперимента содержание дезоксипиридинолина в моче у самцов составило $138,1 \pm 4,7$ пикомоль/л и $141,1 \pm 3,2$ пикомоль/л у самок, оставаясь выше нормы в 1,69 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,9 раза ($p < 0,01$) у самок, таким образом доказывая сохранность остеопороза в течении двадцати дней.

3.5.5 Активность нитроксидергической системы у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Учитывая лабораторно-диагностические данные позволяющие констатировать развитие остеопороза у крыс нами было изучено состояние нитроксидергической системы для определения наличия связи между костной системой и системой NO.

Количество нитрат- и нитрит- анионов в сыворотке крови у здоровых самцов крыс составило $22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л, что в 1,46 раза ($p < 0,01$) выше чем у самцов со стероидным остеопорозом ($22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л, против $15,17 \pm 0,84$ мкмоль/л).

Таблица 13

Динамика содержания стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у самцов крыс

Группа	Количество стабильных метаболитов NO, мкмоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$22,28 \pm 0,53$	$23,54 \pm 0,32$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$15,17 \pm 0,84^*$	$16,09 \pm 0,7^*$
опытная группа (10 день)	$16,81 \pm 0,84^*$	$18,77 \pm 0,82^*$
опытная группа (20 день)	$17,48 \pm 0,61^*$	$18,39 \pm 0,5^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К десятому дню после последнего введения преднизалона 50 мг/кг количество нитрат- и нитрит- анионов в сыворотке крови повысилось в 1,1

раза ($p<0,01$), а к двадцатому дню экспериментально вызванного остеопороза - в 1,2 раза ($p<0,01$), однако даже в 20-й день эксперимента количество NO в сыворотке крови у крыс в 1,35 раза ($p<0,01$) ниже, чем у здоровых животных.

Содержание нитрат- и нитрит- анионов в крови у самок составляет в нормальном физиологическом состоянии $23,54\pm0,32$ мкмоль/л, у самцов $22,28\pm0,53$ мкмоль/л, а аналогичный показатель у крыс при экспериментально вызванном остеопорозе у самок составляет $16,09\pm0,7$ мкмоль/л, а у самцов $15,17\pm0,84$ мкмоль/л. Количество стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у самок достоверно выше в 1,05 раза ($p<0,01$) по сравнению с самцами, что согласуется с ранее опубликованными работами профессора Каримовой Р.Г., о половой специфичности нитроксидазной системы крыс.

К десятому дню эксперимента количество стабильных метаболитов оксида азота (II) увеличиваются в 1,21 раза ($p<0,01$).

В двадцатый день эксперимента содержание NO в сыворотке крови у самок крыс достоверно ниже в 1,28 раза ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой ($23,54\pm0,32$ мкмоль/л против $18,39 \pm 0,5$ мкмоль/л).

В норме у самок уровень метаболитов в 1,29 раза ($p<0,01$) выше, чем при остеопоротических нарушениях. У самцов в 1,46 раза ($p<0,01$) больше образуется нитрат- и нитрит-анионов (NO_x) в сыворотке крови в нормальном физиологическом состоянии, в отличие от патологического.

Следовательно, активность системы оксида азота (II) при экспериментально вызванном глюкокортикоид -индуцированным остеопорозе достоверно снижается.

3.5.6 Рентгенодиагностические исследования при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

По диагностическим критериям остеопороз делится на умеренный и сильный. Слабо выраженный остеопороз обусловлен низкой минеральной плотностью костей и диагностируется при наличии прозрачной тени и исчерченности костной ткани на снимке. Умеренный остеопороз уже связан с более существенным снижением плотности костей, которое характеризуется выгнутостью позвонков либо их клиновидными изменениями. Тяжелый остеопороз увеличивает прозрачность костной ткани на снимках.

В связи с тем, что нами были проведены биохимические исследования позволяющие поставить диагноз на остеопороз, проведение рентгенографии было не столь важно, поскольку с помощью рентгенографии остеопороз можно диагностировать при потерях 25-30% от общей массы костей. Однако двух недельное применение глюкокортикоидов позволило рассмотреть наличие остеопороза на крысах, указывая на увеличения рентгенопрозрачности тел позвонков и кифоза грудного отдела позвоночного столба.



Рисунок - 1. кифоз грудного отдела позвоночника



Рисунок - 2. кифоз грудного отдела позвоночника, верхняя проекция

На позвонках определяется клиновидность, отмечается их вытягивание в длину.



Рисунок 3 - клиновидные позвонки

На хвостовых позвонках отмечается нехарактерные для позвонков светлые зоны.



Рисунок 4 - верхняя проекция

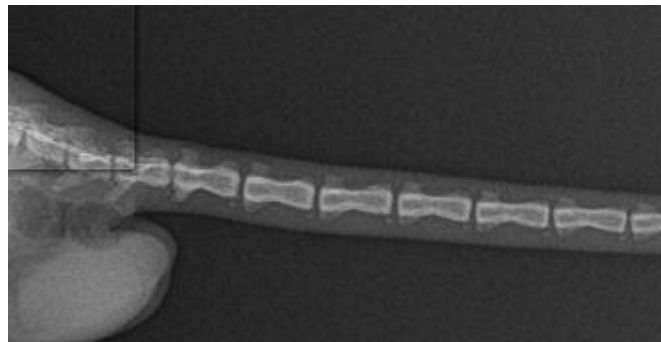


Рисунок 5 - рассасывание хвостовых позвонков при остеопорозе

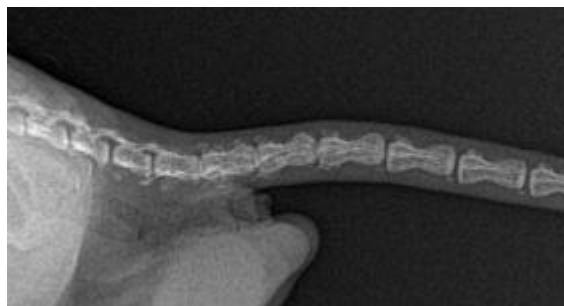


Рисунок 6 - хвостовые позвонки здоровой крысы

Обзорная рентгенограмма позволяет выявить стероидный ОП при потере костного вещества на 30-40% (Лепарский Е. А., 1996 г.), что, конечно же, указывает на невозможность ранней диагностики при помощи этого метода.

3.5.7 Патоморфологические изменения при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Гистологическая, как и рентгенологическая, картина остеопоротической перестройки различной этиологии всегда одинакова. Поэтому отличить на рентгенограмме одной кости старческий остеопороз от других видов по рентгенологической картине и тем более по гистологическим препаратам невозможно, однако гистологически остеопороз выражается в пониженной деятельности остеобластов.

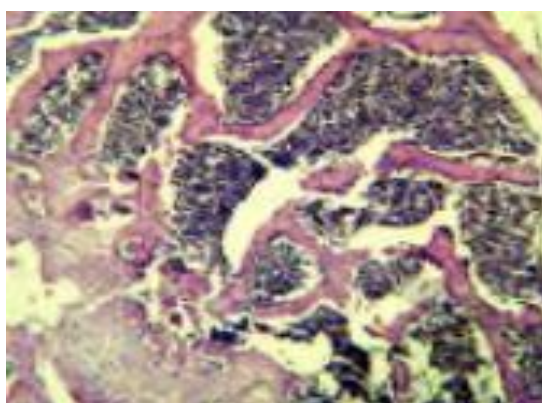


Рисунок 7 - проксимальный метафиз бедренной кости у крысы с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом.

Трабекулы истончаются и в дальнейшем могут совсем исчезнуть; пространства или пазухи между отдельными трабекулами и пластинками в губчатом веществе расширяются и заполняются соединительной и главным образом жировой тканью, т. е. миелоидный костный мозг становится жировым и фиброзным. Компактная кость частично превращается в губчатую кость, спонгиозируется, корковый слой длинной трубчатой кости истончается изнутри, увеличивается диаметр костномозгового канала.

Остеопоротические изменения в костях скелета были подтверждены гистологически спустя 14 дней приема глюкокортикоидов.

Гистологически выявлено истончение костных трабекул и увеличение межтрабекулярного пространства (рис. 7)

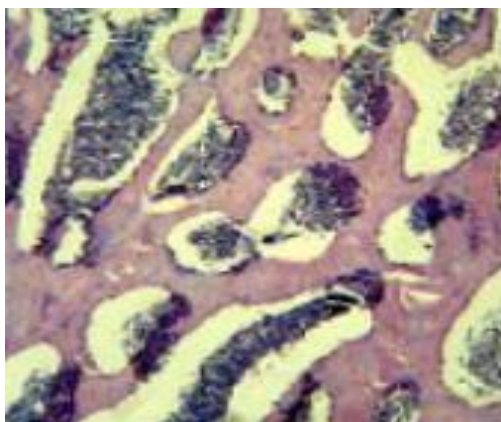


Рисунок 8 - проксимальный метафиз бедренной кости у здоровой крысы

3.6 Определение остеопротективных эффектов доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз

Для изучения остеопротективных свойств доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз при длительном их использовании было сформировано 6 групп крыс разного пола ($n=6$), которые в течении 14 дней в одно и то же время внутрижелудочно с помощью зонда получали преднизалон в дозе 50 мг/кг для постановки экспериментального остеопороза, затем этим животным в течении десяти дней вводили субстрат для NOS L-аргинин в дозе 200 мг/кг в 10% концентрации, экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан в дозе 1 мг/кг в 0,1% концентрации и ингибитор NOS L-Name в дозе 20 мг/кг в 2% концентрации. Подопытных животных ежедневно взвешивали для правильного расчета дозировки соединений.

3.6.1 Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Содержание общего кальция в сыворотке крови у самцов крыс с диагнозом остеопороз составляет $2,1 \pm 0,05$ ммоль/л, что в 1,61 раза ($p < 0,01$) выше, чем у здоровых животных. У самок данный показатель увеличивается в 2,31 раза ($p < 0,01$) и составляет $2,8 \pm 0,07$ ммоль/л против $1,21 \pm 0,1$ ммоль/л.

Таблица 13

Динамика содержания общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание общего кальция в сыворотке крови ммоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$1,3 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,1$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$2,1 \pm 0,05^*$	$2,8 \pm 0,07^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$2,55 \pm 0,11^{**}$	$2,40 \pm 0,08^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$2,89 \pm 0,26^{**}$	$2,82 \pm 0,2$
хлофузан (1 мг/кг)	$1,53 \pm 0,19^{**}$	$1,24 \pm 0,05^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Нагрузка L-аргинином в течении 10 дней крыс с экспериментально вызванным глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом повысил содержание общего кальция в сыворотке крови у самцов в 1,21 раза ($p < 0,01$),

у самок данный показатель наоборот снижается в 1,16 раза ($p < 0,01$) и составляет $2,40 \pm 0,08$ ммоль/л и $2,55 \pm 0,11$ ммоль/л.

Ингибирование нитроксидергической системы нагрузкой крыс L-NAME в дозе 20 мг/кг достоверно повышает содержание общего кальция в сыворотке крови в 1,37 раза ($p < 0,01$), у самок отмечается лишь тенденция к увеличению $2,82 \pm 0,2$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,07$ ммоль/л. По сравнению с L-аргинином нагрузка крыс ингибитором повысило количество общего кальция в сыворотке крови в 1,13 раза ($p < 0,01$) ($2,89 \pm 0,26$ ммоль/л против $2,55 \pm 0,11$ ммоль/л) у самцов и в 1,17 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,82 \pm 0,2$ ммоль/л против $2,40 \pm 0,08$ ммоль/л).

Активизация нитроксидергической системы экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно снижает содержание общего кальция в сыворотке крови в 1,37 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,25 раза у самок крыс, соответственно. Содержание общего кальция в сыворотке крови животных больных остеопорозом после нагрузки хлофузаном (1 мг/кг) остается выше чем у здоровых интактных крыс в 1,17 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,02 раза ($p < 0,01$) у самок. По сравнению с группой крыс которые получали ингибитор L-NAME, содержание общего кальция в сыворотке крови в группе хлофузан ниже в 1,88 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,27 раза ($p < 0,01$) у самок.

3.6.2 Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

В контрольной группе животных количество неорганического фосфора увеличивается по сравнению со здоровыми животными, в 1,35 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,31 раза у самок.

Внутрижелудочное введение L-аргинина в дозе 200 мг/кг в течении 10 дней снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс, в 1,38 раза ($p < 0,01$) у самцов ($2,74 \pm 0,35$ ммоль/л против $3,8 \pm 0,08$

ммоль/л) и в 1,44 раза ($p<0,01$) у самок ($2,91 \pm 0,16$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л).

Таблица 14

Динамика содержания неорганического фосфора в сыворотке крови у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови ммоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$2,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,07$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$3,8 \pm 0,08^*$	$4,21 \pm 0,07^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$2,74 \pm 0,35^{**}$	$2,91 \pm 0,16^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$4,17 \pm 0,13^{**}$	$3,59 \pm 0,23^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$2,89 \pm 0,14^{**}$	$2,74 \pm 0,06^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови животных после нагрузки L-аргинином приближается к показателям здоровых животных, так у самцов данный показатель становится ниже в 1,02 раза по сравнению с интактной группой и составляет $2,74 \pm 0,35$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, у самок же в 1,09 раза ($p<0,01$) ($2,91 \pm 0,16$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

Ингибирование нитроксидазной системы достоверно повышает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у самцов в 1,11 раза ($p<0,01$) и составляет $4,17 \pm 0,13$ ммоль/л, у самок наблюдается достоверное

снижение неорганического фосфора в сыворотке крови крыс в 1,17 раза ($p < 0,01$) и составляет $3,59 \pm 0,23$ ммоль/л. Содержание неорганического фосфора у самцов в 1,16 раза ($p < 0,01$) выше, чем у самок $4,17 \pm 0,13$ ммоль/л против $3,59 \pm 0,23$ ммоль/л.

По сравнению со здоровыми крысами содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс группы L-NAME наблюдается достоверное увеличение показателей в 1,48 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самок.

Активизация нитроксидергической системы экзогенным донором NO хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови крыс, в 1,31 раза ($p < 0,01$) у самцов, по сравнению с контрольной группой и составляет $2,89 \pm 0,14$ ммоль/л против $3,8 \pm 0,08$ ммоль/л и в 1,53 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,74 \pm 0,06$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л).

Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови крыс после нагрузки хлофузаном становится выше в 1,03 раза ($p < 0,01$) у самцов $2,89 \pm 0,14$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, и ниже в 1,16 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,74 \pm 0,06$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

Количество неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола снижается как при нагрузке субстратом для NO-системы L-аргинином (200 мг/кг), так и при активизации системы NO донором - хлофузаном (1 мг/кг).

3.6.3 Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

У здоровых животных количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови составляет $268,3 \pm 7,4$ ед/л у самцов и $228,3 \pm 7,4$ ед/л у самок, при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе данный показатель увеличивается в 1,28 раза ($p < 0,01$) у самцов ($343,6 \pm 4,8$ ед/л против $268,3 \pm$

7,4 ед/л) и в 1,44 раза ($p<0,01$) у самок ($328,8 \pm 9,5$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л).

Нагрузка экспериментальных животных L-аргинином повысило содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс, в 1,13 раза ($p<0,01$) у самцов ($389,9 \pm 9,82$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,14 раза ($p<0,01$) у самок и составило $375,9 \pm 9,41$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л. Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных группы L-аргинин по сравнению со здоровыми крысами выше в 1,45 раза ($p<0,01$) у самцов и в 1,64 раза ($p<0,01$) у самок, соответственно.

Таблица 15

Динамика содержания щелочной фосфатазы в сыворотке крови у
остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и
ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови ед/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$268,3 \pm 7,4$	$228,3 \pm 7,4$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$343,6 \pm 4,8^*$	$328,8 \pm 9,5^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$389,9 \pm 9,82^{**}$	$375,9 \pm 9,41^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$395,6 \pm 19,2^{**}$	$367,7 \pm 21,4^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$270,26 \pm 4,64^{**}$	$256,3 \pm 7,41^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Ингибирование нитроксидазической системы достоверно повышает содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс обоего пола.

Таким образом, количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови самцов возрастает в 1,15 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($395,6 \pm 19,2$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,47 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными самцами. Аналогичная картина наблюдается у самок, где содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс выше в 1,11 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой животных ($367,7 \pm 21,4$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л) и в 1,61 раза ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми животными ($367,7 \pm 21,4$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л). Активизация нитроксидергической системы субстратом для NOS L-аргинином в дозе 200 мг/кг и его ингибирование повлияли однообразно на содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс.

Активизация нитроксидергической системы хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно снизило содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови как у самцов, так и у самок. У самцов данный показатель снизился в 1,27 раза ($p < 0,01$) ($270,26 \pm 4,64$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,28 раза ($p < 0,01$) у самок ($256,3 \pm 7,41$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л).

Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс после нагрузки хлофузаном остался выше в 1,007 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самок крыс.

3.6.4 Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Содержание дезоксипиридинолина (ДПИД) в моче у здоровых животных составляет $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л у самцов и $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л у самок крыс. При остеопорозе данный показатель увеличивался в 1,93 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,19 раза ($p < 0,01$) у самок ($74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л против $162,75 \pm 1,28$).

Активизация системы оксида азота субстратом для NOS L-аргинином снижает содержание дезоксипиридинолина в моче по сравнению с

контрольной группой в 1,26 раза ($p<0,01$) у самцов и в 1,37 раза ($p<0,01$) у самок, однако по сравнению со здоровыми животными в группе L-аргинин количество дезоксипиридинолина в моче оставался на высоком уровне и составлял $124,75 \pm 1,72$ пикомоль/л у самцов, что в 1,52 раза ($p<0,01$) выше и $118,7 \pm 2,9$ пикомоль/л у самок, что выше нормы в 1,59 раза ($p<0,01$).

Таблица 16

Динамика содержания дезоксипиридинолина в моче у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание ДПД в моче пикомоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$81,6 \pm 3,4$	$74,2 \pm 2,34$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$158,0 \pm 2,8^*$	$162,75 \pm 1,28^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$124,75 \pm 1,72^{**}$	$118,7 \pm 2,9^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$178,6 \pm 2,48^{**}$	$181,1 \pm 3,03^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$96,2 \pm 3,94^{**}$	$91,6 \pm 4,24^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Ингибирование нитроксидазной системы повышает содержание дезоксипиридинолина в моче, в 1,13 раза ($p<0,01$) у самцов по сравнению с контрольной группой и в 2,18 раза ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми животными. У самок данный показатель увеличился в 1,11 раза ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой и в 2,44 раза ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми животными ($181,1 \pm 3,03$ пикомоль/л против $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л).

Активизация нитроксидазной системы хлофузаном снижает количество дезоксипиридинолина в моче в 1,64 раза ($p<0,01$) по сравнению с

контрольной группой животных, по сравнению со здоровыми животными количество дезоксипиридинолина в моче в опытной группе хлофузана выше в 1,17 раза ($p < 0,01$) и составляет $96,2 \pm 3,94$ пикомоль/л против $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л. У самцов крыс наблюдается аналогичная картина, где количество дезоксипиридинолина в моче составляет $91,6 \pm 4,24$ пикомоль/л, что ниже в 1,77 раза ($p < 0,01$) чем в контрольной группе и выше 1,23 раза чем у здоровых крыс.

3.6.5 Содержание суммарного количества нитрат-и нитрит-анионов в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Количество нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови у здоровых крыс составляет $22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л у самцов и $23,54 \pm 0,32$ мкмоль/л у самок. Данные показатели достоверно снижаются при остеопоротических нарушениях костной системы, у самцов количество NO в сыворотке крови снижается до $15,17 \pm 0,84$ мкмоль/л, что в 1,46 раза ($p < 0,01$) ниже по сравнению со здоровыми крысами, у самок же аналогичный показатель снижается в 1,55 раза ($p < 0,01$) ($15,09 \pm 0,7$ мкмоль/л против $23,54 \pm 0,32$).

Многократное внутрижелудочное введение L-аргинина крысам с остеопоротическими нарушениями снизило содержание стабильных метаболитов NO в сыворотке крови в 1,06 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,11 раза ($p < 0,01$) у самок.

Ингибирование нитроксидергической системы снизило содержание оксида азота в 1,34 раза ($p < 0,01$) в сыворотке крови у самцов и в 1,17 раза ($p < 0,01$) у самок, по сравнению с контрольной группой животных

Таблица 17

Динамика содержания стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Количество стабильных метаболитов NO, мкмоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	22,28 ± 0,53	23,54±0,32
контрольная группа (эксп. остеопороз)	15,17 ± 0,84*	15,09±0,7*
L-аргинин (200 мг/кг)	14,31 ± 0,58**	13,58 ± 0,83**
L-NAME (20 мг/кг)	11,24 ± 0,63**	12,84 ± 0,75**
хлофузан (1 мг/кг)	19,63 ± 0,37**	19,54 ± 0,55**

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Длительное время применения хлофузана в дозе 1 мг/кг сопровождается повышением стабильных метаболитов NO в сыворотке крови в 1,3 раза ($p < 0,01$), следовательно ежедневная стимуляция нитроксидергической системы при остеопоротических нарушениях экзогенным донором NO хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно стабилизирует биохимические показатели сыворотки крови, следовательно хлофузан (1 мг/кг) обладает выраженными остеопротеکتивными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Активизация системы оксида азота однократным введением экзогенного донора оксида азота (II) - хлофузана (1 мг/кг) приводит к депонированию кальция и фосфора в организме;
2. Стимуляция системы оксида азота (II) - хлофузаном (2 мг/кг) сопровождается повышением концентрации общего кальция в сыворотке крови у крыс.
3. Ингибирование NO-синтаз повышает экскрецию общего кальция с мочой в 4,0 раза.
4. Развитие глюкокортикоид-индуцированного остеопороза характеризуется снижением стабильных метаболитов NOx в 1,5 раза.
5. Многократное введение субстрата для NOS L-аргинина достоверно увеличивает содержание общего кальция в крови, что связано с саморегуляционной способностью системы NO.
6. Экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан 1 мг/кг обладает выраженными остеопротективными свойствами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Экзогенный донор оксида азота (II), соединение бензофуроксанового ряда хлофузан в дозе 1 мг/кг, рекомендуется для дальнейшего изучения остеопротективных свойств у сельскохозяйственных животных.

2. Активизация системы хлофузаном может иметь практическое значение в поддержании кальциево - фосфорного баланса у больных хронической почечной недостаточностью.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

1. Киргизова И.А. Роль оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора в организме / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина., Киргизова И.А. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. Известия Оренбургского ГАУ. - Том 1 (63). - Оренбург, 2017. - С. 195-197.

2. Зайдуллина А.И. Влияние доноров оксида азота (II) на обмен кальция и фосфора в организме у белых крыс / Р.Г. Каримова, И.А. Киргизова, А.И. Зайдуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Ученые записки КГАВМ. - Том 229 (1). - Казань, 2017. - С. 49-52.

3. Шиманская В.М. Роль оксида азота (II) как регулятора клеточных процессов в формировании костной системы / А.И. Зайдуллина, В.М. Шиманская // Материалы Всероссийского конкурса студенческих научно-исследовательских работ "Студент - исследователь". ФГБОУ ВО Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма. - г. Казань, 2017. - С. 375-377.

4. Зайдуллина А.И. Влияние соединения бензофуроксанового ряда на NO-зависимые механизмы регуляции обмена кальция и фосфора в организме белых крыс / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Ученые записки КГАВМ. - Том 231 - Казань, 2017. - С. 45-51.

5. Зайдуллина А.И. Перспектива применения доноров оксида азота (II) для коррекции нарушений обмена кальция в организме / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны».- СПб, Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г. – С. 96-97.

6. Айзатуллова А.Р. Влияние соединения бензофуроксанового ряда на обмен кальция в организме /А.И. Зайдуллина, А.Р. Айзатуллова // Материалы Всероссийского конкурса студенческих научно-исследовательских работ

"Студент - исследователь". ФГБОУ ВО Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма. - г. Казань, 2018. - С. 4-8.

7. Rufiya G Karimova. The role of NO-system in the realization of ion-regulating function of the kidneys in the model of chronic renal failure / Rufiya G Karimova, Alisa A Belova, Alsu I Zaidullina // Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences. - 9 (6) - 2018. - P. 1143-1150.

8. Зайдуллина А.И. Экспериментальные исследования остеопротективных свойств экзогенного донора оксида азота (II) / А.И. Зайдуллина // Материалы VI Всероссийской молодёжной научно-практической конференция «Студенчество России: век XXI». - г. Орел, 2018. - С. 36-43.

9. Зайдуллина А.И. Профилактика развития остеопороза стимуляцией нитроксидазной системы / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Материалы национальной научно-практической конференции "Научно-прикладные аспекты производства, переработки и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции". - г. Ярославль, 28 марта 2019. - С. 115-123.

10. Зайдуллина А.И. Особенности нитроксидазной системы у телят / А.С. Латыпова, И.Т. Сибгатуллин, А.И. Зайдуллина // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК». - г. Казань, 2019.

11. Зайдуллина А.И. Активность нитроксидазной системы у крыс с остеопоротическими нарушениями / А.И. Зайдуллина // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК». - г. Казань, 2019.

12. Davletov Danil. The search for new means of treatment and prevention of osteoporosis / Davletov Danil, Zaydullina Alsu // 21st veterinary medicine student scientific research congress. - Istanbul, 17 April 2019.

13. Зайдуллина А.И. Изучение особенностей нитроксидергической системы в целях профилактики остеодистрофии / А.И. Зайдуллина, И.Р. Зайдуллин, Р.Г. Каримова // Материалы Международной научно-практической конференции "Фундаментальные и прикладные научные исследования: инноватика в современном мире". - г. Уфа, 23 мая 2019. - С. 68-75.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	6
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	15
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	18
3.1	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола	18
3.2	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс разного пола	20
3.2.1	Динамика содержания уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс	20
3.2.2	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс	23
3.3	Зависимость многократных физиологических эффектов экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана на содержание кальция и фосфора в организме	25
3.3.1	Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола при ежедневной стимуляции нитроксидергической системы	25
3.4	Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный остеопороз	27
3.5	Динамика изменения некоторых маркеров метаболизма костной ткани у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	28
3.5.1	Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	28

3.5.2	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	30
3.5.3	Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	31
3.5.4	Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	33
3.5.5	Активность нитроксидергической системы у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	35
3.5.6	Рентгенодиагностические исследования при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	37
3.5.7	Патоморфологические изменения при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе	40
3.6	Определение остеопротективных эффектов доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз	41
3.6.1	Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	42
3.6.2	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	43
3.6.3	Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	45
3.6.4	Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	47

3.6.5	Содержание суммарного количества нитрат-и нитрит-анионов в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз	49
	ВЫВОДЫ	51
	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	52
	СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Эндотелий представляет собой монослой пограничных клеток, выстилающий внутреннюю поверхность сосудистой системы от сердца до капилляров, и отделяющий циркулирующую кровь от тканей. Принято считать, что эндотелий является самой большой и наиболее важной железой организма. Эндотелиальные клетки ведут себя как рецепторно- эффекторный орган, реагирующий на различные физико-химические нейрогуморальные стимулы, происходящие внутри сосуда.

Таким образом, эндотелий играет ключевую роль в поддержании нормального тонуса, текучести крови, а также ограничении сосудистого воспаления и пролиферации гладкомышечных клеток .

Среди многочисленных биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим эндотелиальным фактором релаксации является оксид азота (NO) определяющийся практически во всех тканях. В 1980 году Furchgott R.F. и Zavadzki J.V. впервые экспериментально установили, что присутствие эндотелиальных клеток сосудов вызывает релаксацию изолированной аорты кролика в ответ на стимуляцию ацетилхолином. При удалении эндотелия из сосудов вазодилатация не отмечалась, но сохранялся ответ на нитроглицерин. Эта эндотелий-зависимая релаксация гладкой мускулатуры сосудов в ответ на ацетилхолин опосредуется эндогенным медиатором, первоначально названным эндотелиальным фактором релаксации, а впоследствии - оксидом азота.

Оксид азота (NO) - один из наиболее важных биологических медиаторов, который принимает участие во многих физиологических и патофизиологических процессах. Он является уникальным по своей природе и механизмам действия вторичным мессенджером в живой клетке, что доказано исследованиями многочисленных ученых со всего мира .

Множество исследований, проведенных к настоящему времени, позволяют констатировать факт регулирующего влияния NO на такие

процессы, как: мутагенез, апоптоз, гликолиз и перенос электронов в митохондриях; адгезия тромбоцитов и нейтрофилов, пролиферация миелоидных, прогениторных клеток; функционирование Т-лимфоцитов, опухолевых клеток, кератиноцитов; выделение питуитарных гормонов; регуляция тонуса бронхов и сфинктеров; сокращение мускулатуры кишечника, желудка, матки, сердца; нейродегенерация; регуляция артериального давления; иммунологические механизмы защиты и т.д.

В конце XX столетия учеными были сделаны выводы о ключевой роли оксида азота (NO) в снижение активности остеокластов и остеокластогенеза, связанного с костной резорбцией, установив, что в области перелома кости образование оксида азота увеличивается до максимальных концентраций, а введение ингибитора NO - синтаз сокращает скорость срастания переломов. В настоящее время нам известно, что значительную роль в процессах костного ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани играет кровоснабжение кости. Костные микрососуды имеют только эндотелий и не имеют мышечного и соединительнотканного слоев. Следовательно, именно эндотелий опосредует всю гуморальную регуляцию обмена между остеобластами, остеокластами и кровью. Скорее всего, одной из причин ухудшения регионарного кровоснабжения костной ткани является эндотелиальная дисфункция, которая посредством негативного влияния на микроциркуляцию может приводить к нарушению процессов остеогенеза и остеорепарации, тем самым вызывая остеопороз.

В современной патогенетической терапии остеопороза не уделяется должного внимания препаратам, обладающим положительным влиянием на кровоснабжение костной ткани. Это указывает на актуальность исследования остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами.

На сегодняшний день актуальным является вопрос использования экзогенных доноров NO как при изучении механизмов действия оксида азота (NO) в организме, так и в клинических целях. Предлагается использование

экзогенных доноров для создания модельных систем *in vitro* и *in vivo*, поскольку они значительно упрощают имеющуюся в организме систему взаимодействия NO с клетками и внутриклеточными мессенджерами. Так как оксид азота (II) в этом случае поступает извне, то система оказывается независимой от NO-синтаз и их регуляции, а значит, результаты действия NO легче интерпретировать. В этом случае в значительной степени отсекаются эффекты других сигнальных веществ, которые могут сопутствовать биогенному NO.

Экзогенные доноры, в отличие от субстрата для NOS - L-аргинина, содержат NO в структуре молекулы, и их действие заключается в высвобождении этой молекулы в чистом виде.

На сегодняшний день еще не существует доноров, которые можно было бы назвать идеальными для исследований. Во-первых, NO-доноры различаются по эффективности высвобождения NO и в разной степени способны влиять на клетки. Во-вторых, эти вещества могут являться источниками побочных соединений, часто обладающих токсичностью (выделяемый нитропруссидом цианид). В-третьих постоянно высокий уровень нитратов в крови ведет к насыщению их рецепторов, расположенных в гладкой мускулатуре сосудов, истощению запасов SH-групп, обеспечивающих превращение молекул нитратов в NO; вследствие этого теряется реактивность сосудов и ослабляется вазодилатирующий эффект нитратов; при приеме нитратов на 20% снижается почечный кровоток (что поддерживает высокую концентрацию нитратов в крови) и повышается продукция контррегулирующих нейрогуморальных факторов для поддержания адекватного кровотока в почках (ренин-ангиотензиновая система), что в свою очередь затрудняет вазодилатирующее действие нитратов; уменьшается активность гуанилатциклазы и содержание цГМФ.

К числу перспективных доноров NO можно соотнести соединения бензофуроксанового ряда, предложенные и синтезированные д.б.н.

Каримовой Р.Г., в качестве донора оксида азота и активатора растворимой формы гуанилатциклазы (pGC), а также других NO-зависимых ферментов.

Таким образом, актуальность изучения роли оксида азота (II) как корректирующего фактора при остеопоротических нарушениях подтверждается не только необходимостью использования установленных механизмов NO-регуляции в клинических целях (костные, почечные патологии, нарушения обмена веществ), но и возможностью предложить новый донор NO как перспективный лекарственный препарат.

Степень разработанности проблемы

Изыскание новых соединений доноров оксида азота препаратов и схем их применения для профилактики и лечения нарушений кальциево-фосфорного обмена, воздействующих на различные звенья патологического процесса, является актуальной задачей как фармации, так и ветеринарии. В современной патогенетической терапии остеопороза не уделяется должного внимания препаратам, обладающим положительным влиянием на кровоснабжение костной ткани. Это указывает на актуальность исследования остеопротективного действия препаратов с доказанными положительными эндотелиотропными эффектами, таковыми являются препараты оксида азота. По химической природе среди препаратов оксида азота можно выделить такие группы, как нитраты, нитриты и нитрозотиолы, однако у этих препаратов имеются свои недостатки, такие как токсичность, кумулятивность и различная эффективность высвобождения оксида азота.

К числу перспективных доноров оксида азота следует отнести соединения бензофуроксанового ряда. Дело в том, что оксид азота в этом случае поступает извне и система оказывается независимой от NO-синтаз и их регуляции, в связи с этим в значительной степени отсекаются эффекты других сигнальных веществ, которые могут сопутствовать биогенному NO.

Следовательно, актуальность изучения роли оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора подтверждается не только

необходимостью использования установленных механизмов NO-регуляции в клинических целях.

Следовательно, изучение остеопротективных свойств экзогенного донора оксида азота (II) является актуальной проблемой.

Цель исследования - изучение роли оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику изменения количества общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче здоровых животных при стимуляции системы оксида азота (II) и ингибировании NO-синтаз.
2. Изучить активность нитроксидергической системы у здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом.
3. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у здоровых крыс.
4. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительной стимуляции системы оксида азота (II) субстратом для NOS L-аргинином.
5. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительном ингибировании NO-синтаз.
6. Изучить динамику изменения биохимических маркеров костного метаболизма у крыс с экспериментально вызванным остеопорозом при длительной стимуляции системы оксида азота (II) экзогенным донором NO.

Научная новизна

В работе продемонстрировано, что развивающийся экспериментальный остеопороз через две недели после введения преднизалона в дозе 50 мг/кг характеризуется ухудшением кровоснабжения костной ткани, отрицательной динамикой морфологических показателей, наличием прямой зависимости

между качеством кровоснабжения кости и микроархитектоникой, наличием признаков развития эндотелиальной дисфункции на основании функциональных тестов и биохимических исследований.

Выявлено, что экзогенный донор оксида азота хлофузан в дозе 1,0 мг/кг вводимый ежедневно в течение 30 дней животным с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом обладает эндотелиотропной активностью, а также остеопротективным действием.

В работе впервые выявлено, что хлофузан в дозе 2,0 мг/кг вводимый ежедневно в течение 30 дней животным с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом не обладает эндотелиотропной активностью, а наоборот, действует как ингибитор нитроксидергической системы.

В ходе исследования впервые выявлено, что L-аргинин в дозе 200,0 мг/кг не оказывает положительного влияния на нитроксидергическую систему и действует как его блокатор.

Таким образом, в результате выполненных исследований разработан комплекс положений и целостных представлений о роли эндотелиальной дисфункции в процессах ремоделирования и репаративной регенерации костной ткани, а также патогенетически обоснованных подходов к фармакологической профилактике и коррекции их нарушений.

Научно-практическая значимость.

В работе доказана эффективность применения экзогенного донора оксида азота хлофузана в дозе 1,0 мг/кг для коррекции остеопоротических нарушений костей скелета. В эксперименте доказано, что использование исследуемого соединения позволяет нормализовать изменения в биохимическом исследовании сыворотки крови и в моче, а также в изучении содержания нитрат - и нитрит анионов в сыворотке крови. Данные соединения способствуют нормализации кровоснабжения костной ткани при развивающемся остеопорозе, замедлению отрицательной динамики микроструктурных изменений кости и биохимических показателей.

Результаты исследования позволяют рекомендовать проведение целенаправленных клинических испытаний экзогенного донора оксида азота хлофузана для изучения фармакологической остеопротективной активности при остеопорозе и переломах костей скелета на его фоне.

Методология и методы исследований. Методологической основой исследования является комплексный подход по изучению остеопоротических свойств экзогенного донора оксида азота (II) хлофузан и его лечебной эффективности при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе. Объектом исследования служили белые крысы. Системный подход включает: изучение лабораторно-диагностических факторов при нагрузке животных донорами и ингибитором NO-системы.

Основные положения выносимые на защиту:

1. Активизация системы оксида азота однократным введением экзогенного донора оксида азота (II) - хлофузана (1 мг/кг) приводит к депонированию кальция и фосфора в организме;
2. Стимуляция системы оксида азота (II) - хлофузаном (2 мг/кг) сопровождается повышением концентрации общего кальция в сыворотке крови у крыс.
3. Ингибирование NO-синтаз повышает экскрецию общего кальция с мочой в 4,0 раза.
4. Развитие глюкокортикоид-индуцированного остеопороза характеризуется снижением стабильных метаболитов NOx в 1,5 раза.
5. Многократное введение субстрата для NOS L-аргинина и ингибитора нос достоверно увеличивает содержание общего кальция в крови, что связано с саморегуляционной способностью системы NO.
6. Экзогенный донор оксида азота (II) обладает выраженными остеопротективными свойствами.

Степень достоверности и апробации результатов. Биометрическая обработка цифрового материала проведена на персональном компьютере по

общепринятым методикам вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Основные результаты исследований доложены и получили одобрение на: Международном научном форуме «Молодежь и наука XXI века» (Ульяновский государственный аграрный университет - Ульяновский ГАУ. - Ульяновск, 2017); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины - СПбГАВМ. - Санкт-Петербург, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана - Казанский ГАВМ. - Казань, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Вятская государственная сельскохозяйственная академия - Вятская ГСХА. - Киров, 2017); Всероссийском конкурсе на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Мнсельхоза России (Оренбургский государственный аграрный университет - Оренбургский ГАУ. - Оренбург, 2017); VI Всероссийской молодёжной научно-практической конференции «Студенчество России: век XXI» (Орловский государственный аграрный университет - Орловский ГАУ. - Орел, 2018); Национальной научно-практической конференции «Научно-прикладные аспекты производства, переработки и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (Ярославская государственная сельскохозяйственная академия - Ярославская ГСХА. - Ярославль, 2019); Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК» (Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана - Казанский ГАВМ. - Казань, 2019); Международной

научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: инноватика в современном мире» (Уфа, 2019);

Публикации: По теме диссертации опубликовано 17 научных статей, 3 из которых входят в список научных рецензируемых журналов включённых в Перечень ВАК при Минобрнауки российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук и 1 публикация входящая в Перечень Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 130 страницах компьютерного текста, включает в себя: введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, заключение, выводы, практические предложения, список сокращений, список использованного материала и приложение. Работа содержит 17 таблиц, 30 рисунков. Список использованной литературы включает 245 источников, из них 160 иностранных. Приложение на 12 страницах.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены на базе лаборатории кафедры физиологии и патологической физиологии ФГБОУ ВО "Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана" в период с 2015 по 2019 год.

В качестве материала для исследования были взяты биологические пробы (кровь, моча) от 312 лабораторных нелинейных крыс обоего пола нелинейных крыс и крыс линии Wistar, с массой тела 200,0 -300,0 г.

Для стимуляции системы оксида азота (II) использовали L-аргинин – субстрат для NOS, экзогенный донор NO - хлофузан и в качестве ингибитора нитроксидазной системы NOS - L-NAME.

При постановке эксперимента было сформировано XXVI групп, в каждой по 12 крыс (рисунок 2). Схематически проведенные исследования можно поделить на 6 этапов.

Первый этап включает в себя исследования содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола, где крысам I группы (n=12) внутрижелудочно вводили воду в объеме 3 мл; II группе животных (n=12) - ингибитор NO-синтаз L-NAME в дозе 20 мг/кг; животным III группы (n=12) - экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг; IV экспериментальной группе (n=12) - субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

Второй этап посвящен изучению содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс самцов: V группа - интактная (n=12); VI группа (n=12) состояла из крыс самцов, которым внутрижелудочно вводили ингибитор NO-синтаз L-NAME в дозе 20 мг/кг; VII группе самцов (n=12) вводили экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 2 мг/кг; VIII группа (n=12) получала внутрижелудочно субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

На третьем этапе аналогичные соединения в тех же объемных пропорциях, что и у самцов вводились самкам, где: IX (n=12) интактная

группа; X группа (n=12) - L-NAME; XI группа (n=12) - хлофузан; XII группа (n=12) - L-аргинин.

Четвертым этапом изучали действие ежедневной стимуляции системы оксида азота (II) на содержание общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола: крысам XIII группы (n=12) ежедневно вводили воду в объеме 3 мл, внутривентрикулярно; животным XIV группы (n=12) - экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг, внутривентрикулярно, в течение 30 дней. Взятие отбора проб проводили с интервалом в 10 дней.

На пятом этапе изучали содержание нитрат- и нитрит анионов в сыворотке крови у здоровых крыс и крыс с экспериментально вызванным остеопорозом. На этом этапе животные так же были разделены по половому признаку.

Шестым этапом исследовали содержание общего кальция, неорганического фосфора и щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс при ежедневной стимуляции нитроксидазной системы. На этом этапе животные так же были разделены по половому признаку, где: крысы XIX группы (n=12) здоровые самцы (контрольная группа); XX группа (n=12) - интактные животные с остеопоротическими нарушениями; XXI группе самцов вводили экзогенный донор NO - хлофузан в дозе 1 мг/кг; XXII группе (n=12) - внутривентрикулярно субстрат для NOS - L-аргинин в дозе 200 мг/кг., в течении 30 дней. Самки были распределены следующими группами по аналогии самцов, где: XXIII группа (n=12) являлась контрольной группой; XXIV группа (n=12) состояла из интактных животных; XXV группа (n=12) получала хлофузан 1 мг/кг и XXVI группа (n=12) - L-аргинин в дозе 200 мг/кг.

Глюкокортикоид-индуцированный остеопороз у животных вызывали путем ежедневного внутривентрикулярного введения преднизолона в дозе 50 мг/кг в течении 14 дней согласно общепринятой методике [Зиганшина Л.Е., Бурнашева З.А., Валеева И.Х. 2002 г.].

Для сбора мочи крыс помещали в специальные метаболические клетки. Кровь у крыс брали из хвостовой вены, через 2 часа после введения доноров NO и ингибитора NOS.

Концентрацию кальция в сыворотке крови и моче определяли унифицированным колориметрическим методом с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Кальций в щелочной среде образует окрашенный комплекс с о-крезолфталеин комплексом. Интенсивность окраски определяли по оптической плотности при 570 нм на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия), пропорциональной концентрации кальция в пробе [26].

Количество фосфора в сыворотке крови и моче определяли спектрофотометрическим методом на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия) с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Метод основан на способности фосфат ионов образовывать в кислой среде с молибдатом аммония в присутствии детергента фосформолибденовый комплекс, оптическая плотность которого при длине волны 340 нм пропорциональна концентрации неорганического фосфора в исследуемом образце [26].

Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом на "Анализаторе биохимическом фотометрическом кинетическом Би-Ан" (Россия) с набором реактивов («Ольвекс», Россия). Метод основан на том, что щелочная фосфатаза в щелочной среде катализирует реакцию дефосфорилирования синтетического субстрата р-нитрофенилфосфата (р-NPP) с образованием окрашенного продукта р-нитрофенола (р-NP). Количество образовавшегося р-нитрофенола определяется по увеличению оптической плотности реакционной среды при 405 нм и пропорционально активности щелочной фосфатазы.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием t - критерий Стьюдента.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола

Для выявления содержания общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс в зависимости от активности нитроксидергической системы нами было сформировано 4 группы (n=6) животных, которые состояли из нелинейных крыс обоего пола.

Таблица 1

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	I - Интактные	II - L-Name (20 мг/кг)	III - хлофузан (1 мг/кг)	IV - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,6 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,1^*$	$1,35 \pm 0,07^*$	$1,88 \pm 0,04^*$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,001 \pm 0,0002$	$0,005 \pm 0,0004^*$	$0,0009 \pm 0,0001^*$	$0,002 \pm 0,0001$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Количество общего кальция в сыворотке крови у интактных животных составляет $1,6 \pm 0,03$ ммоль/л ($p < 0,05$), ингибирование системы оксида азота (II) введением L-Name в дозе 20 мг/кг достоверно повышает уровень общего кальция в сыворотке крови в 1,5 раза ($p < 0,05$) и в 5,0 раз ($p < 0,05$) в моче, соответственно, что объясняется поступлением в организм ингибитора

оксида азота (II), которое приводит к увеличению концентрации кальция в сыворотке крови и моче.

Активизация системы NO экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает содержание общего кальция в крови и в моче в 1,1 раза ($p < 0,05$), обратный результат мы наблюдаем при активизации данной системы введение субстрата для NOS - L-аргинина (200 мг/кг), в данном случае количество общего кальция в сыворотке крови достоверно выше в 1,1 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой животных.

Таблица 2

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс обоего пола при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	I - Интактные	II - L-Name (20 мг/кг)	III - хлофузан (1 мг/кг)	IV - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,45 \pm 0,05$	$1,84 \pm 0,02^*$	$1,80 \pm 0,03^*$	$1,81 \pm 0,02^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,09 \pm 0,002$	$0,03 \pm 0,001^*$	$0,02 \pm 0,003^*$	$0,03 \pm 0,002^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Активизация и ингибирование системы оксида азота (II) введением блокатора NO - синтаз - L-NAME (20 мг/кг), субстрата для NOS L-аргинина (200 мг/кг) и экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана (1 мг/кг) достоверно снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке

крови в 1,3 раза ($p < 0,05$) во всех группах и в 3,0 раза в моче во II и III группах, стимуляция хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает количество неорганического фосфора в моче в 4,5 раза ($p < 0,05$), что имеет практическое значение в поддержании кальциево - фосфорного баланса у больных хронической почечной недостаточностью. Поскольку, при данном заболевании у больных наблюдается гиперфосфатемия, обусловленная замедленным выведением фосфатов с мочой, и гипокальциемия, образующейся в следствии угнетения всасывания кальция в кишечнике за счет уменьшения образования в почках активной дигидроксилированной формы витамина D3.

Таким образом, установлено, что содержание кальция в сыворотке крови и процесс экскреции его с мочой находится в зависимости от активности системы оксида азота.

3.2 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у крыс раного пола

Ранее изученное состояние системы оксида азота в организме у разных видов животных показало зависимость полученных эффектов от пола животных, поэтому в дальнейших исследованиях экспериментальные группы животных состояли из половозрелых самцов и половозрелых самок.

3.2.1 Динамика содержания уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс

В связи с тем, что изначально нами было изучено действие экзогенного донора NO хлофузана в дозе 1 мг/кг, на следующем этапе было принято решение продемонстрировать действие этого донора в удвоенной дозе (2 мг/кг).

Стимуляция нитроксидергической системы крыс (самцов) экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном в дозе (2 мг/кг) достоверно повышает содержание общего кальция в сыворотке крови и моче у самцов, по сравнению с интактной группой в 1,87 ($p<0,05$) и 2,0 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 3

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у крыс самцов при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	V - интактные	VI - L-Name (20 мг/кг)	VII - хлофузан (2 мг/кг)	VIII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,3 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,1^*$	$2,4 \pm 0,05^*$	$1,78 \pm 0,02^*$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,001 \pm 0,003$	$0,004 \pm 0,0004^*$	$0,002 \pm 0,0003^*$	$0,002 \pm 0,001^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Содержание общего кальция в крови и моче у самцов при введении субстрата для NOS L-аргинина (200 мг/кг) и ингибитора NO-синтаз L-NAME не привело к каким-либо достоверным изменениям по сравнению с группой животных не разделенных по половому признаку.

Таблица 4

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов крыс при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	V - Интактные	VI - L-Name (20 мг/кг)	VII - хлофузан (2 мг/кг)	VIII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,8 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,03^*$	$1,42 \pm 0,01^*$	$1,41 \pm 0,01^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,1 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,0009^*$	$0,03 \pm 0,004^*$	$0,02 \pm 0,003^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Аналогичная картина наблюдается по отношению к содержанию неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самцов, где содержание неорганического фосфора достоверно понижается во всех опытных группах как и в группах животных не разделенных по половому признаку.

Установлено, что при ингибировании системы NO и стимуляции субстратом для NOS L-аргинином экскреция фосфора с мочой у самцов достоверно уменьшается в 5,0 раз и составляет 0,02 моль/100г/24ч.

Таким образом, выявлено, что экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан в дозе 2 мг/кг достоверно повышает содержание кальция в сыворотке крови у крыс.

3.2.2 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс

Стимуляция нитроксидазной системы самок экзогенным донором NO хлофузаном (2 мг/кг) достоверно повышает количество общего кальция в 1,38 раза ($p < 0,05$) в крови и в 2,0 раза ($p < 0,05$) в моче по сравнению с интактной группой.

Сравнительный анализ половой зависимости содержания кальция в сыворотке крови и моче во всех представленных группах дает следующие результаты: в интактной группе самок количество кальция в сыворотке крови больше в 1,3 раза ($p < 0,05$) по сравнению с интактной группой самцов; аналогичная динамика наблюдается при ингибировании системы, в группе L-NAME, где содержание кальция в 1,18 раза ($p < 0,05$) больше у самок чем у самцов; схожие данные прослеживаются и после стимуляции системы оксида азота (II), где количество кальция в крови у самок в 1,04 раза ($p < 0,05$) больше чем у самцов, что скорее всего связано с тем что, образование оксида азота в организме у самок протекает более интенсивно по сравнению с активностью системы NO в организме самцов [Шимановского Н.Л., Гуревича К.С. 2000, Каримовой Р.Г., 2011.]

Таблица 5

Динамика уровня общего кальция в сыворотке крови и моче у самок крыс при активизации и ингибировании нитроксидазной системы

Показатель	Группа животных			
	IX - интактные	X - L-Name (20 мг/кг)	XI - хлофузан (2 мг/кг)	XII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество общего кальция в крови, ммоль/л	$1,8 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,02^*$	$2,5 \pm 0,02^*$	$1,84 \pm 0,01$
количество общего кальция в моче, моль/100 г/24 часа	$0,002 \pm$ $0,0003$	$0,006 \pm$ $0,003^*$	$0,004 \pm$ $0,0003$	$0,004 \pm 0,002$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Следовательно, активизация системы оксида азота (II) экзогенным донором NO – хлофузаном в дозе 2 мг/кг приводит к увеличению концентрации общего кальция в крови и моче что, скорее всего связано с саморегуляционной способностью системы оксида азота (II).

Таблица 6

Динамика уровня неорганического фосфора в сыворотке крови и моче у самок крыс при активизации и ингибировании нитроксидергической системы

Показатель	Группа животных			
	XI - интактные	X - L-Name (20 мг/кг)	XI - хлофузан (1 мг/кг)	XII - L-аргинина (200 мг/кг)
количество неорганического фосфора в крови, ммоль/л	$2,41 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,01^*$	$1,8 \pm 0,06^*$	$1,91 \pm 0,04^*$
количество неорганического фосфора в моче, моль/100г/24ч	$0,002 \pm 0,0003$	$0,0009 \pm 0,001^*$	$0,0007 \pm 0,006^*$	$0,0004 \pm 0,003^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

То есть, увеличение содержания метаболитов NO в организме приводит к внутриклеточному накоплению симметричного и ассиметричного диметиларгинина, которые являются эндогенными ингибиторами системы NOS, о чем свидетельствуют показатели, приведенные в таблице 3 и 5, где действие ингибитора NOS и экзогенного донора оксида азота (II) действуют аналогичным образом.

Результаты, отраженные в таблицах 4 и 6 позволяют сделать вывод что, изменение активности системы оксида азота приводит к снижению фосфора в сыворотке крови у крыс. Количество неорганического фосфора в крови у крыс интактной группы составляет $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л и $2,41 \pm 0,1$ ммоль/л у самок и самцов соответственно. Нагрузка донором NO привело к

уменьшению фосфора в крови у самцов в 2,0 раза ($p<0,005$) (таблица 4), у самок – в 1,75 раза ($p<0,05$).

3.3 Зависимость многократных физиологических эффектов экзогенного донора оксида азота (II) хлофузана на содержание кальция и фосфора в организме

Поскольку, ранее нами было установлено, что введение хлофузана в дозе 1 мг/кг достоверно понижает содержание общего кальция в сыворотке крови и моче, в то время как доза 2 мг/кг действует как ингибитор нитроксидергической системы, вызвало интерес определение экзогенного донора хлофузана в дозе 1 мг/кг при многократном его введении.

3.3.1 Динамика уровня общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола при ежедневной стимуляции нитроксидергической системы

Содержание кальция в сыворотке крови интактных крыс при ежедневной нагрузке водой внутрижелудочно в объеме 3,0 мл составляет $1,24\pm0,09$ ммоль/л и достоверно не меняется в течение эксперимента. На уровне тенденции в 20 день наблюдается повышение результата, а к тридцатому дню эксперимента показатель повышается в 1,12 раза ($p<0,01$) и составляет $1,5\pm0,08$ ммоль/л.

Таблица 7

Содержание общего кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у интактных белых крыс

Дни исследований	Показатель	
	количество общего кальция в сыворотке крови у крыс, ммоль/л (XIII группа)	количество неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс, ммоль/л (XIII группа)
до введения	1,24±0,09	2,72±0,01
10 день	1,28±0,06*	2,71±0,02
20 день	1,33±0,01*	2,73±0,04*
30 день	1,5±0,08*	2,91±0,03*

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

В сыворотке крови контрольной группы крыс содержание фосфора равно 2,72±0,01 ммоль/л, ежедневная нагрузка водой внутрижелудочно в объеме 3,0 мл достоверно не вызывает изменений концентрации неорганического фосфора в крови в течение двадцати дней. К 30-му дню этот показатель повышается в 1,11 раза ($p<0,01$) и составляет 2,91±0,03 моль/л.

Многократное введение донора оксида азота хлофузана в дозе 1,0 мг/кг сопровождается снижением концентрации кальция в сыворотке крови крыс в 1,1 раза ($p<0,01$) (1,09±0,09 моль/л против 1,30±0,01 моль/л) на десятый день эксперимента. К 20-му дню этот показатель возвращается к первоначальному уровню, а к 30-му дню эксперимента - достоверно повышается в 1,05 раза и составляет 1,42±0,01 моль/л.

Таблица 8

Содержание кальция и неорганического фосфора в сыворотке крови у белых крыс при ежедневном введении донора NO - хлофузана в дозе 1 мг/кг

Дни исследований	Показатель	
	количество общего кальция в крови у крыс, ммоль/л (XIV группа)	количество неорганического фосфора в крови у белых крыс, ммоль/л (XIV группа)
до введения	2,30±0,01	1,72±0,04
10 день	2,09±0,09	1,73±0,01*
20 день	2,29±0,06*	2,5±0,05*
30 день	2,42±0,01*	2,6±0,03*

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой.

Многократное введение донора оксида азота (II) хлофузана в объеме 1,0 мг/кг увеличивает концентрацию фосфора в сыворотке крови в 1,45 раза ($p<0,01$) на 20 день исследований и сохраняется на этом уровне до конца эксперимента.

Следовательно, ежедневное поступление экзогенного донора NO-хлофузана (1,0 мг/кг) в организм белых крыс благоприятствует понижению содержания общего кальция и фосфора в сыворотке крови в течении 10 дней.

3.4 Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный остеопороз

Экспериментальный глюкокортикоид-индуцированный (стероидный) остеопороз вызывали путем внутрижелудочного введения препарата преднизалона в дозе 50 мг/кг в течении 14 дней.

Установлено, что глюкокортикоиды снижают абсорбцию кальция в кишечнике, увеличивают экскрецию кальция с мочой, повышают секрецию или активность паратгормона, уменьшают продукцию гонадотропинов и половых гормонов, вызывают снижение мышечной массы, деградацию коллагена. Глюкокортикоиды оказывают влияние на внутриклеточные

регуляторные системы моделирования и ремоделирования костной ткани, в том числе Wnt-сигнальный путь, систему RANKL/OPG (лиганд рецептора активатора нуклеарного κ B/остеопротегерин). Выше перечисленные механизмы стимулируют активность остеокластов и увеличивают резорбцию кости, нарушают микроархитектонику. Не менее значимым является эффект, оказываемый на остеобласты: снижение активности остеобластов, усиление апоптоза, подавление репликации или нарушение дифференцировки преостеобластов в зрелые клетки.

3.5 Динамика изменения некоторых маркеров метаболизма костной ткани у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Остеопороз – метаболическое заболевание, характеризующееся снижением костной массы и микроструктурной перестройкой костной ткани, в связи с чем снижается прочность кости и повышается риск переломов. Остеопороз, особенно на ранней стадии, не всегда можно определить по каким-либо внешним признакам. Поэтому для более точной диагностики следует провести биохимические исследования.

3.5.1 Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Поскольку кальций является одним из строительных материалов костной ткани, анализ на кальций в крови при остеопорозе необходим для определения гиперкальциемии. Остеопенический этап патологии характеризуется недостатком элемента из-за синдрома мальабсорбции, ревматоидного процесса, нарушений всасываемости кишечника или долгого приема глюкокортикоидов.

Содержание общего кальция в сыворотке крови у здоровых самцов крыс составило $1,3 \pm 0,1$ ммоль/л, что в 1,61 раза ($p < 0,01$) ниже, чем у крыс в первый день после последнего введения преднизалона 50 мг/кг, аналогичная ситуация у самок крыс, где содержание общего кальция в сыворотке крови у здоровых крыс меньше в 1,65 раза ($p < 0,01$) чем у остеопорозных.

Таблица 9

Динамика содержания общего кальция в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество общего кальция, ммоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$1,3 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,1$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$2,1 \pm 0,05^*$	$2,8 \pm 0,07^*$
опытная группа (10 день)	$1,97 \pm 0,15^*$	$1,81 \pm 0,13^*$
опытная группа (20 день)	$1,83 \pm 0,16^*$	$1,82 \pm 0,07^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К десятому дню количество общего кальция в сыворотке крови имеет тенденцию к снижению как у самцов, так и у самок, а к двадцатому дню снижается в 1,12 раза ($p < 0,01$) ($1,83 \pm 0,16$ ммоль/л против $2,1 \pm 0,05$ ммоль/л) у самцов и в 1,09 раза ($p < 0,01$) ($2,8 \pm 0,07$ ммоль/л против $1,82 \pm 0,07$ ммоль/л) у самок крыс.

Следовательно, при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе количество общего кальция в сыворотке крови возрастает, что связано со снижением кишечной абсорбции кальция, усилением почечной экскреции и ослаблением канальцевой реабсорции кальция.

3.5.2 Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Поскольку, неорганический фосфор является компонентом двигательных органов: он участвует в образовании скелетной ткани и в клеточном энергетическом метаболизме, а так же регулирует плотность костей и уровень кальция в них, поэтому определение фосфора при остеопорозе в крови необходимо при высоком риске остеомалации, исходя из этого следующим этапом изучали содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс.

Таблица 10

Динамика содержания неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество неорганического фосфора, ммоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$2,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,07$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$3,8 \pm 0,08^*$	$4,21 \pm 0,07^*$
опытная группа (10 день)	$3,7 \pm 0,33^*$	$3,33 \pm 0,13^*$
опытная группа (20 день)	$3,4 \pm 0,31^*$	$3,27 \pm 0,09$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

В контрольной группе самцов крыс количество неорганического фосфора составляет $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, в опытной группе данный показатель повышается в 1,4 раза ($p < 0,01$) ($2,8 \pm 0,04$ ммоль/л против $3,9 \pm 0,07$ ммоль/л), аналогичная ситуация наблюдается у самок крыс, в данном случае

количество неорганического фосфора в сыворотке крови выросло в 1,32 раза ($p < 0,01$) ($4,21 \pm 0,07$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

В опытной группе самцов крыс на 10 день эксперимента происходит незначительное снижение неорганического фосфора $3,7 \pm 0,33$ ммоль/л против $3,4 \pm 0,31$ ммоль/л, у самок данный показатель достоверно снижается в 1,26 раза ($p < 0,01$) и составляет $3,33 \pm 0,13$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л.

Количество неорганического фосфора остается повышенным на 20 день эксперимента у самцов крыс, у самок же данный показатель приходит в норму и составляет $3,27 \pm 0,09$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л.

3.5.3 Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Кость формируется остеобластами. Основная их функция – синтез остеоида (протеинового матрикса), который на 90-95 % состоит из коллагена 1-го типа, на 5 % – из белка остеокальцина и затем минерализуется кальцием и фосфатом из внеклеточной жидкости. Остеобласты содержат фермент щелочную фосфатазу, несут рецепторы к паратиреоидному гормону и кальцитриолу и способны к пролиферации. Минеральная часть кости состоит из гидроксиапатита и аморфного фосфата кальция, которые связаны с белками органического матрикса.

Известно, что в костях непрерывно происходят процессы ремоделирования, включающие в себя резорбцию (разрушение) существующей костной ткани и образование новой. Резорбция кости осуществляется остеокластами. Это подвижные клетки, которые выделяют протеолитические ферменты и кислую фосфатазу, вызывая деградацию коллагена, разрушение гидроксиапатита и выведение минералов из матрикса.

Щелочная фосфатаза, в данном случае, отображает активность остеобластов в костной ткани. Стимуляция остеобластов происходит при

интенсивных процессах деструкции костей, которые сопровождают остеопороз. При остеопорозе уровень щелочной фосфатазы увеличивается, причем нарушения метаболизма костной ткани возникает раньше первых изменений плотности костей, следовательно показатели фермента щелочной фосфатазы необходимы для определения состояния костей, наличия метастазов, остеодистрофии и остеопороза.

В контрольной группе самцов содержание щелочной фосфатазы составило $268,3 \pm 7,4$ ед/л, у самок - $228,3 \pm 7,4$ ед/л. Количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови у животных больных остеопорозом увеличивается в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самцов и 1,4 раза ($p < 0,01$) у самок, соответственно.

К десятому дню остеопороза в экспериментальной группе самцов крыс содержание щелочной фосфатазы становится выше полученных данных на первый день эксперимента и составляет $344,5 \pm 9,4$ ед/л, что показывает увеличение от первоначальных данных в 1,3 раза ($p < 0,01$).

Таблица 11

Динамика содержания щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс обоего пола

Группа	Количество щелочной фосфатазы, ед/л	
	Самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$268,3 \pm 7,4$	$228,3 \pm 7,4$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$343,6 \pm 4,8^*$	$328,8 \pm 9,5^*$
опытная группа (10 день)	$344,5 \pm 9,4^*$	$322,6 \pm 12,4^*$
опытная группа (20 день)	$330,1 \pm 10,7^*$	$282,1 \pm 11,7^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К 20 дню эксперимента показатели щелочной фосфатазы у самцов и самок остаются повышенными, $330,1 \pm 10,7$ ед/л против $268,3 \pm 7,4$ ед/л у самцов и $282,1 \pm 11,7$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л у самок, следовательно глюкокортикоид-индуцированный остеопороз повышает содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови и остается в таком положении и в 20 день эксперимента.

3.5.4 Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

В кости постоянно происходят процессы разрушения старой и формирования новой ткани. Между отдельными молекулами костного коллагена имеются дезоксипиридилиновые поперечные связи. Они важны для его стабилизации. При резорбции кости происходит разрушение коллагена и выход дезоксипиридинолина в сосудистое русло.

Преобладание процессов деградации кости приводят к потере костной массы. Далее ДПИД выводится через почки с мочой. ДПИД содержится в основном в костной ткани (некоторое количество содержится в хрящевой ткани и сухожилиях), и поэтому является одним из наиболее четких параметров ее обмена. Дезоксипиридинолин - наиболее специфичный маркер резорбции костной ткани. Он преимущественно содержится в коллагене I типа костной ткани и в небольшом количестве в дентине, аорте и связках. При этом все ткани, кроме костной, характеризуются медленным обменом, и их вклад в экскрецию дезоксипиридинолина с мочой ничтожен. Экскреция дезоксипиридинолина достоверно увеличивается при остеопорозе, остеоартритах и ревматоидном артрите. Дезоксипиридинолин (ДПИД) — наиболее наглядный маркер резорбции кости, поэтому следующим этапом нами было изучено содержание дезоксипиридинолина в моче у здоровых и остеопорозных животных.

В контрольной группе животных количество дезоксипиридинолина в моче у самцов крыс составило $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л, данный показатель увеличился в 1,98 раза ($p < 0,01$) в первый же день после последнего введения глюкокортикоидов, у самок данный показатель повысился в 2,19 раза ($p < 0,01$) и составило $162,75 \pm 1,28$ пикомоль/л против $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л.

К 10-му дню содержание дезоксипиридинолина в моче у самцов незначительно снизился $146,6 \pm 5,3$ пикомоль/л против $158,0 \pm 2,8$ пикомоль/л, у самок $143,0 \pm 2,49$ пикомоль/л против $162,75 \pm 1,28$ пикомоль/л.

Таблица 12

Динамика содержания дезоксипиридинолина в моче у крыс обоего пола

Группа	Количество ДПИД, пикомоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$81,6 \pm 3,4$	$74,2 \pm 2,34$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$158,0 \pm 2,8^*$	$162,75 \pm 1,28^*$
опытная группа (10 день)	$146,6 \pm 5,3^*$	$143,0 \pm 2,49^*$
опытная группа (20 день)	$138,1 \pm 4,7^*$	$141,1 \pm 3,2^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К двадцатому дню эксперимента содержание дезоксипиридинолина в моче у самцов составило $138,1 \pm 4,7$ пикомоль/л и $141,1 \pm 3,2$ пикомоль/л у самок, оставаясь выше нормы в 1,69 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,9 раза ($p < 0,01$) у самок, таким образом доказывая сохранность остеопороза в течении двадцати дней.

3.5.5 Активность нитроксидергической системы у крыс при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Учитывая лабораторно-диагностические данные позволяющие констатировать развитие остеопороза у крыс нами было изучено состояние нитроксидергической системы для определения наличия связи между костной системой и системой NO.

Количество нитрат- и нитрит- анионов в сыворотке крови у здоровых самцов крыс составило $22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л, что в 1,46 раза ($p < 0,01$) выше чем у самцов со стероидным остеопорозом ($22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л, против $15,17 \pm 0,84$ мкмоль/л).

Таблица 13

Динамика содержания стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у самцов крыс

Группа	Количество стабильных метаболитов NO, мкмоль/л	
	самцы	самки
контрольная группа (здоровые)	$22,28 \pm 0,53$	$23,54 \pm 0,32$
опытная группа (эксп. остеопороз)	$15,17 \pm 0,84^*$	$16,09 \pm 0,7^*$
опытная группа (10 день)	$16,81 \pm 0,84^*$	$18,77 \pm 0,82^*$
опытная группа (20 день)	$17,48 \pm 0,61^*$	$18,39 \pm 0,5^*$

Примечание: * - достоверно по сравнению с контрольной группой.

К десятому дню после последнего введения преднизалона 50 мг/кг количество нитрат- и нитрит- анионов в сыворотке крови повысилось в 1,1

раза ($p<0,01$), а к двадцатому дню экспериментально вызванного остеопороза - в 1,2 раза ($p<0,01$), однако даже в 20-й день эксперимента количество NO в сыворотке крови у крыс в 1,35 раза ($p<0,01$) ниже, чем у здоровых животных.

Содержание нитрат- и нитрит- анионов в крови у самок составляет в нормальном физиологическом состоянии $23,54 \pm 0,32$ мкмоль/л, у самцов $22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л, а аналогичный показатель у крыс при экспериментально вызванном остеопорозе у самок составляет $16,09 \pm 0,7$ мкмоль/л, а у самцов $15,17 \pm 0,84$ мкмоль/л. Количество стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у самок достоверно выше в 1,05 раза ($p<0,01$) по сравнению с самцами, что согласуется с ранее опубликованными работами профессора Каримовой Р.Г., о половой специфичности нитроксидазной системы крыс.

К десятому дню эксперимента количество стабильных метаболитов оксида азота (II) увеличиваются в 1,21 раза ($p<0,01$).

В двадцатый день эксперимента содержание NO в сыворотке крови у самок крыс достоверно ниже в 1,28 раза ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой ($23,54 \pm 0,32$ мкмоль/л против $18,39 \pm 0,5$ мкмоль/л).

В норме у самок уровень метаболитов в 1,29 раза ($p<0,01$) выше, чем при остеопоротических нарушениях. У самцов в 1,46 раза ($p<0,01$) больше образуется нитрат- и нитрит-анионов (NO_x) в сыворотке крови в нормальном физиологическом состоянии, в отличие от патологического.

Следовательно, активность системы оксида азота (II) при экспериментально вызванном глюкокортикоид -индуцированным остеопорозе достоверно снижается.

3.5.6 Рентгенодиагностические исследования при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

По диагностическим критериям остеопороз делится на умеренный и сильный. Слабо выраженный остеопороз обусловлен низкой минеральной плотностью костей и диагностируется при наличии прозрачной тени и исчерченности костной ткани на снимке. Умеренный остеопороз уже связан с более существенным снижением плотности костей, которое характеризуется выгнутостью позвонков либо их клиновидными изменениями. Тяжелый остеопороз увеличивает прозрачность костной ткани на снимках.

В связи с тем, что нами были проведены биохимические исследования позволяющие поставить диагноз на остеопороз, проведение рентгенографии было не столь важно, поскольку с помощью рентгенографии остеопороз можно диагностировать при потерях 25-30% от общей массы костей. Однако двух недельное применение глюкокортикоидов позволило рассмотреть наличие остеопороза на крысах, указывая на увеличения рентгенопрозрачности тел позвонков и кифоза грудного отдела позвоночного столба.



Рисунок - 1. кифоз грудного отдела позвоночника



Рисунок - 2. кифоз грудного отдела позвоночника, верхняя проекция

На позвонках определяется клиновидность, отмечается их вытягивание в длину.



Рисунок 3 - клиновидные позвонки

На хвостовых позвонках отмечается нехарактерные для позвонков светлые зоны.



Рисунок 4 - верхняя проекция

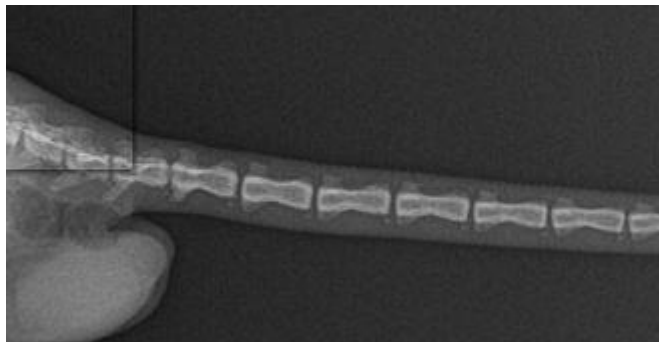


Рисунок 5 - рассасывание хвостовых позвонков при остеопорозе

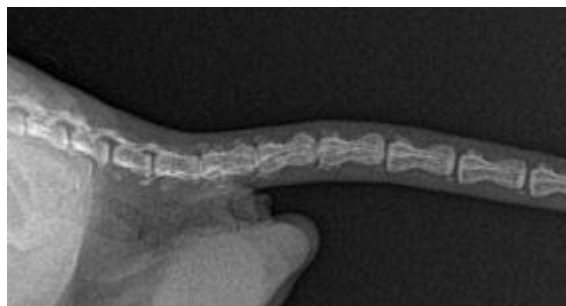


Рисунок 6 - хвостовые позвонки здоровой крысы

Обзорная рентгенограмма позволяет выявить стероидный ОП при потере костного вещества на 30-40% (Лепарский Е. А., 1996 г.), что, конечно же, указывает на невозможность ранней диагностики при помощи этого метода.

3.5.7 Патоморфологические изменения при экспериментальном глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе

Гистологическая, как и рентгенологическая, картина остеопоротической перестройки различной этиологии всегда одинакова. Поэтому отличить на рентгенограмме одной кости старческий остеопороз от других видов по рентгенологической картине и тем более по гистологическим препаратам невозможно, однако гистологически остеопороз выражается в пониженной деятельности остеобластов.

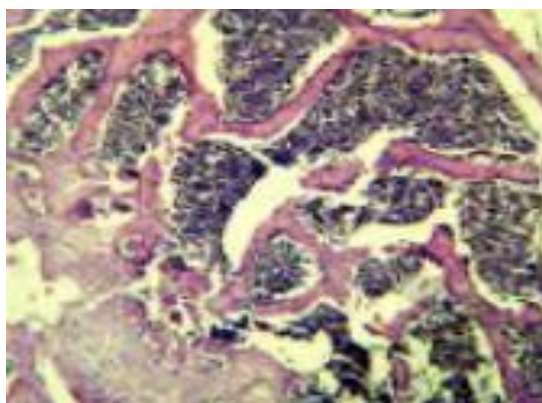


Рисунок 7 - проксимальный метафиз бедренной кости у крысы с глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом.

Трабекулы истончаются и в дальнейшем могут совсем исчезнуть; пространства или пазухи между отдельными трабекулами и пластинками в губчатом веществе расширяются и заполняются соединительной и главным образом жировой тканью, т. е. миелоидный костный мозг становится жировым и фиброзным. Компактная кость частично превращается в губчатую кость, спонгиозируется, корковый слой длинной трубчатой кости истончается изнутри, увеличивается диаметр костномозгового канала.

Остеопоротические изменения в костях скелета были подтверждены гистологически спустя 14 дней приема глюкокортикоидов.

Гистологически выявлено истончение костных трабекул и увеличение межтрабекулярного пространства (рис. 7)

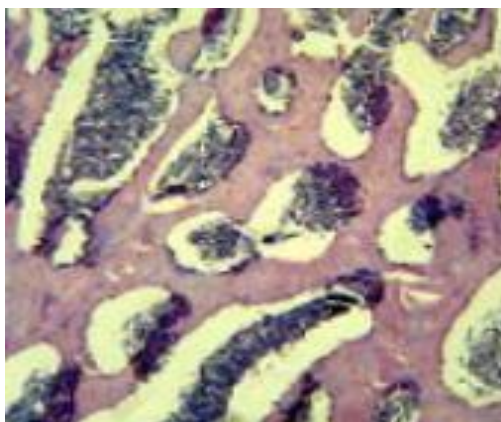


Рисунок 8 - проксимальный метафиз бедренной кости у здоровой крысы

3.6 Определение остеопротективных эффектов доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз

Для изучения остеопротективных свойств доноров оксида азота и ингибитора NO-синтаз при длительном их использовании было сформировано 6 групп крыс разного пола ($n=6$), которые в течении 14 дней в одно и то же время внутрижелудочно с помощью зонда получали преднизалон в дозе 50 мг/кг для постановки экспериментального остеопороза, затем этим животным в течении десяти дней вводили субстрат для NOS L-аргинин в дозе 200 мг/кг в 10% концентрации, экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан в дозе 1 мг/кг в 0,1% концентрации и ингибитор NOS L-Name в дозе 20 мг/кг в 2% концентрации. Подопытных животных ежедневно взвешивали для правильного расчета дозировки соединений.

3.6.1 Содержание общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Содержание общего кальция в сыворотке крови у самцов крыс с диагнозом остеопороз составляет $2,1 \pm 0,05$ ммоль/л, что в 1,61 раза ($p < 0,01$) выше, чем у здоровых животных. У самок данный показатель увеличивается в 2,31 раза ($p < 0,01$) и составляет $2,8 \pm 0,07$ ммоль/л против $1,21 \pm 0,1$ ммоль/л.

Таблица 13

Динамика содержания общего кальция в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание общего кальция в сыворотке крови ммоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$1,3 \pm 0,1$	$1,21 \pm 0,1$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$2,1 \pm 0,05^*$	$2,8 \pm 0,07^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$2,55 \pm 0,11^{**}$	$2,40 \pm 0,08^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$2,89 \pm 0,26^{**}$	$2,82 \pm 0,2$
хлофузан (1 мг/кг)	$1,53 \pm 0,19^{**}$	$1,24 \pm 0,05^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Нагрузка L-аргинином в течении 10 дней крыс с экспериментально вызванным глюкокортикоид-индуцированным остеопорозом повысил содержание общего кальция в сыворотке крови у самцов в 1,21 раза ($p < 0,01$),

у самок данный показатель наоборот снижается в 1,16 раза ($p < 0,01$) и составляет $2,40 \pm 0,08$ ммоль/л и $2,55 \pm 0,11$ ммоль/л.

Ингибирование нитроксидергической системы нагрузкой крыс L-NAME в дозе 20 мг/кг достоверно повышает содержание общего кальция в сыворотке крови в 1,37 раза ($p < 0,01$), у самок отмечается лишь тенденция к увеличению $2,82 \pm 0,2$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,07$ ммоль/л. По сравнению с L-аргинином нагрузка крыс ингибитором повысило количество общего кальция в сыворотке крови в 1,13 раза ($p < 0,01$) ($2,89 \pm 0,26$ ммоль/л против $2,55 \pm 0,11$ ммоль/л) у самцов и в 1,17 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,82 \pm 0,2$ ммоль/л против $2,40 \pm 0,08$ ммоль/л).

Активизация нитроксидергической системы экзогенным донором оксида азота (II) хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно снижает содержание общего кальция в сыворотке крови в 1,37 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,25 раза у самок крыс, соответственно. Содержание общего кальция в сыворотке крови животных больных остеопорозом после нагрузки хлофузаном (1 мг/кг) остается выше чем у здоровых интактных крыс в 1,17 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,02 раза ($p < 0,01$) у самок. По сравнению с группой крыс которые получали ингибитор L-NAME, содержание общего кальция в сыворотке крови в группе хлофузан ниже в 1,88 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,27 раза ($p < 0,01$) у самок.

3.6.2 Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

В контрольной группе животных количество неорганического фосфора увеличивается по сравнению со здоровыми животными, в 1,35 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,31 раза у самок.

Внутрижелудочное введение L-аргинина в дозе 200 мг/кг в течении 10 дней снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс, в 1,38 раза ($p < 0,01$) у самцов ($2,74 \pm 0,35$ ммоль/л против $3,8 \pm 0,08$

ммоль/л) и в 1,44 раза ($p<0,01$) у самок ($2,91 \pm 0,16$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л).

Таблица 14

Динамика содержания неорганического фосфора в сыворотке крови у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови ммоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$2,8 \pm 0,04$	$3,2 \pm 0,07$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$3,8 \pm 0,08^*$	$4,21 \pm 0,07^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$2,74 \pm 0,35^{**}$	$2,91 \pm 0,16^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$4,17 \pm 0,13^{**}$	$3,59 \pm 0,23^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$2,89 \pm 0,14^{**}$	$2,74 \pm 0,06^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови животных после нагрузки L-аргинином приближается к показателям здоровых животных, так у самцов данный показатель становится ниже в 1,02 раза по сравнению с интактной группой и составляет $2,74 \pm 0,35$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, у самок же в 1,09 раза ($p<0,01$) ($2,91 \pm 0,16$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

Ингибирование нитроксидазной системы достоверно повышает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у самцов в 1,11 раза ($p<0,01$) и составляет $4,17 \pm 0,13$ ммоль/л, у самок наблюдается достоверное

снижение неорганического фосфора в сыворотке крови крыс в 1,17 раза ($p < 0,01$) и составляет $3,59 \pm 0,23$ ммоль/л. Содержание неорганического фосфора у самцов в 1,16 раза ($p < 0,01$) выше, чем у самок $4,17 \pm 0,13$ ммоль/л против $3,59 \pm 0,23$ ммоль/л.

По сравнению со здоровыми крысами содержание неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс группы L-NAME наблюдается достоверное увеличение показателей в 1,48 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самок.

Активизация нитроксидергической системы экзогенным донором NO хлофузаном (1 мг/кг) достоверно снижает содержание неорганического фосфора в сыворотке крови крыс, в 1,31 раза ($p < 0,01$) у самцов, по сравнению с контрольной группой и составляет $2,89 \pm 0,14$ ммоль/л против $3,8 \pm 0,08$ ммоль/л и в 1,53 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,74 \pm 0,06$ ммоль/л против $4,21 \pm 0,07$ ммоль/л).

Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови крыс после нагрузки хлофузаном становится выше в 1,03 раза ($p < 0,01$) у самцов $2,89 \pm 0,14$ ммоль/л против $2,8 \pm 0,04$ ммоль/л, и ниже в 1,16 раза ($p < 0,01$) у самок ($2,74 \pm 0,06$ ммоль/л против $3,2 \pm 0,07$ ммоль/л).

Количество неорганического фосфора в сыворотке крови у крыс обоего пола снижается как при нагрузке субстратом для NO-системы L-аргинином (200 мг/кг), так и при активизации системы NO донором - хлофузаном (1 мг/кг).

3.6.3 Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

У здоровых животных количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови составляет $268,3 \pm 7,4$ ед/л у самцов и $228,3 \pm 7,4$ ед/л у самок, при глюкокортикоид-индуцированном остеопорозе данный показатель увеличивается в 1,28 раза ($p < 0,01$) у самцов ($343,6 \pm 4,8$ ед/л против $268,3 \pm$

7,4 ед/л) и в 1,44 раза ($p < 0,01$) у самок ($328,8 \pm 9,5$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л).

Нагрузка экспериментальных животных L-аргинином повысило содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс, в 1,13 раза ($p < 0,01$) у самцов ($389,9 \pm 9,82$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,14 раза ($p < 0,01$) у самок и составило $375,9 \pm 9,41$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л. Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови животных группы L-аргинин по сравнению со здоровыми крысами выше в 1,45 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,64 раза ($p < 0,01$) у самок, соответственно.

Таблица 15

Динамика содержания щелочной фосфатазы в сыворотке крови у
остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и
ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови ед/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$268,3 \pm 7,4$	$228,3 \pm 7,4$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$343,6 \pm 4,8^*$	$328,8 \pm 9,5^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$389,9 \pm 9,82^{**}$	$375,9 \pm 9,41^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$395,6 \pm 19,2^{**}$	$367,7 \pm 21,4^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$270,26 \pm 4,64^{**}$	$256,3 \pm 7,41^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Ингибирование нитроксидазической системы достоверно повышает содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс обоего пола.

Таким образом, количество щелочной фосфатазы в сыворотке крови самцов возрастает в 1,15 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой ($395,6 \pm 19,2$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,47 раза ($p < 0,01$) по сравнению с интактными самцами. Аналогичная картина наблюдается у самок, где содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови крыс выше в 1,11 раза ($p < 0,01$) по сравнению с контрольной группой животных ($367,7 \pm 21,4$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л) и в 1,61 раза ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми животными ($367,7 \pm 21,4$ ед/л против $228,3 \pm 7,4$ ед/л). Активизация нитроксидергической системы субстратом для NOS L-аргинином в дозе 200 мг/кг и его ингибирование повлияли однообразно на содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс.

Активизация нитроксидергической системы хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно снизило содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови как у самцов, так и у самок. У самцов данный показатель снизился в 1,27 раза ($p < 0,01$) ($270,26 \pm 4,64$ ед/л против $343,6 \pm 4,8$ ед/л) и в 1,28 раза ($p < 0,01$) у самок ($256,3 \pm 7,41$ ед/л против $328,8 \pm 9,5$ ед/л).

Содержание щелочной фосфатазы в сыворотке крови у крыс после нагрузки хлофузаном остался выше в 1,007 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 1,12 раза ($p < 0,01$) у самок крыс.

3.6.4 Содержание дезоксипиридинолина в моче у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Содержание дезоксипиридинолина (ДПИД) в моче у здоровых животных составляет $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л у самцов и $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л у самок крыс. При остеопорозе данный показатель увеличивался в 1,93 раза ($p < 0,01$) у самцов и в 2,19 раза ($p < 0,01$) у самок ($162,75 \pm 1,28$ пикомоль/л против $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л).

Активизация системы оксида азота субстратом для NOS L-аргинином снижает содержание дезоксипиридинолина в моче по сравнению с

контрольной группой в 1,26 раза ($p<0,01$) у самцов и в 1,37 раза ($p<0,01$) у самок, однако по сравнению со здоровыми животными в группе L-аргинин количество дезоксипиридинолина в моче оставался на высоком уровне и составлял $124,75 \pm 1,72$ пикомоль/л у самцов, что в 1,52 раза ($p<0,01$) выше и $118,7 \pm 2,9$ пикомоль/л у самок, что выше нормы в 1,59 раза ($p<0,01$).

Таблица 16

Динамика содержания дезоксипиридинолина в моче у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Содержание ДПД в моче пикомоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	$81,6 \pm 3,4$	$74,2 \pm 2,34$
контрольная группа (эксп. остеопороз)	$158,0 \pm 2,8^*$	$162,75 \pm 1,28^*$
L-аргинин (200 мг/кг)	$124,75 \pm 1,72^{**}$	$118,7 \pm 2,9^{**}$
L-NAME (20 мг/кг)	$178,6 \pm 2,48^{**}$	$181,1 \pm 3,03^{**}$
хлофузан (1 мг/кг)	$96,2 \pm 3,94^{**}$	$91,6 \pm 4,24^{**}$

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Ингибирование нитроксидергической системы повышает содержание дезоксипиридинолина в моче, в 1,13 раза ($p<0,01$) у самцов по сравнению с контрольной группой и в 2,18 раза ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми животными. У самок данный показатель увеличился в 1,11 раза ($p<0,01$) по сравнению с контрольной группой и в 2,44 раза ($p<0,01$) по сравнению со здоровыми животными ($181,1 \pm 3,03$ пикомоль/л против $74,2 \pm 2,34$ пикомоль/л).

Активизация нитроксидергической системы хлофузаном снижает количество дезоксипиридинолина в моче в 1,64 раза ($p<0,01$) по сравнению с

контрольной группой животных, по сравнению со здоровыми животными количество дезоксипиридинолина в моче в опытной группе хлофузана выше в 1,17 раза ($p<0,01$) и составляет $96,2 \pm 3,94$ пикомоль/л против $81,6 \pm 3,4$ пикомоль/л. У самцов крыс наблюдается аналогичная картина, где количество дезоксипиридинолина в моче составляет $91,6 \pm 4,24$ пикомоль/л, что ниже в 1,77 раза ($p<0,01$) чем в контрольной группе и выше 1,23 раза чем у здоровых крыс.

3.6.5 Содержание суммарного количества нитрат-и нитрит-анионов в сыворотке крови у крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Количество нитрат- и нитрит-анионов в сыворотке крови у здоровых крыс составляет $22,28 \pm 0,53$ мкмоль/л у самцов и $23,54 \pm 0,32$ мкмоль/л у самок. Данные показатели достоверно снижаются при остеопоротических нарушениях костной системы, у самцов количество NO в сыворотке крови снижается до $15,17 \pm 0,84$ мкмоль/л, что в 1,46 раза ($p<0,01$) ниже по сравнению со здоровыми крысами, у самок же аналогичный показатель снижается в 1,55 раза ($p<0,01$) ($15,09 \pm 0,7$ мкмоль/л против $23,54 \pm 0,32$).

Многократное внутрижелудочное введение L-аргинина крысам с остеопоротическими нарушениями снизило содержание стабильных метаболитов NO в сыворотке крови в 1,06 раза ($p<0,01$) у самцов и в 1,11 раза ($p<0,01$) у самок.

Ингибирование нитроксидергической системы снизило содержание оксида азота в 1,34 раза ($p<0,01$) в сыворотке крови у самцов и в 1,17 раза ($p<0,01$) у самок, по сравнению с контрольной группой животных

Таблица 17

Динамика содержания стабильных метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови у остеопорозных крыс при нагрузке донорами оксида азота и ингибитором NO-синтаз

Группа	Количество стабильных метаболитов NO, мкмоль/л	
	самцы	самки
интактная группа (здоровые крысы)	22,28 ± 0,53	23,54±0,32
контрольная группа (эксп. остеопороз)	15,17 ± 0,84*	15,09±0,7*
L-аргинин (200 мг/кг)	14,31 ± 0,58**	13,58 ± 0,83**
L-NAME (20 мг/кг)	11,24 ± 0,63**	12,84 ± 0,75**
хлофузан (1 мг/кг)	19,63 ± 0,37**	19,54 ± 0,55**

Примечание: * - достоверно по сравнению с интактной группой; ** - достоверно по сравнению с контрольной группой.

Длительное время применения хлофузана в дозе 1 мг/кг сопровождается повышением стабильных метаболитов NO в сыворотке крови в 1,3 раза ($p<0,01$), следовательно ежедневная стимуляция нитроксидергической системы при остеопоротических нарушениях экзогенным донором NO хлофузаном в дозе 1 мг/кг достоверно стабилизирует биохимические показатели сыворотки крови, следовательно хлофузан (1 мг/кг) обладает выраженными остеопротеکتивными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Активизация системы оксида азота однократным введением экзогенного донора оксида азота (II) - хлофузана (1 мг/кг) приводит к депонированию кальция и фосфора в организме;
2. Стимуляция системы оксида азота (II) - хлофузаном (2 мг/кг) сопровождается повышением концентрации общего кальция в сыворотке крови у крыс.
3. Ингибирование NO-синтаз повышает экскрецию общего кальция с мочой в 4,0 раза.
4. Развитие глюкокортикоид-индуцированного остеопороза характеризуется снижением стабильных метаболитов NOx в 1,5 раза.
5. Многократное введение субстрата для NOS L-аргинина достоверно увеличивает содержание общего кальция в крови, что связано с саморегуляционной способностью системы NO.
6. Экзогенный донор оксида азота (II) хлофузан 1 мг/кг обладает выраженными остеопротективными свойствами.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Экзогенный донор оксида азота (II), соединение бензофуроксанового ряда хлофузан в дозе 1 мг/кг, рекомендуется для дальнейшего изучения остеопротективных свойств у сельскохозяйственных животных.

2. Активизация системы хлофузаном может иметь практическое значение в поддержании кальциево - фосфорного баланса у больных хронической почечной недостаточностью.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

1. Киргизова И.А. Роль оксида азота (II) в регуляции обмена кальция и фосфора в организме / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина., Киргизова И.А. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. Известия Оренбургского ГАУ. - Том 1 (63). - Оренбург, 2017. - С. 195-197.

2. Зайдуллина А.И. Влияние доноров оксида азота (II) на обмен кальция и фосфора в организме у белых крыс / Р.Г. Каримова, И.А. Киргизова, А.И. Зайдуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Ученые записки КГАВМ. - Том 229 (1). - Казань, 2017. - С. 49-52.

3. Шиманская В.М. Роль оксида азота (II) как регулятора клеточных процессов в формировании костной системы / А.И. Зайдуллина, В.М. Шиманская // Материалы Всероссийского конкурса студенческих научно-исследовательских работ "Студент - исследователь". ФГБОУ ВО Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма. - г. Казань, 2017. - С. 375-377.

4. Зайдуллина А.И. Влияние соединения бензофуроксанового ряда на NO-зависимые механизмы регуляции обмена кальция и фосфора в организме белых крыс / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. Ученые записки КГАВМ. - Том 231 - Казань, 2017. - С. 45-51.

5. Зайдуллина А.И. Перспектива применения доноров оксида азота (II) для коррекции нарушений обмена кальция в организме / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны».- СПб, Издательство ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2017 г. – С. 96-97.

6. Айзатуллова А.Р. Влияние соединения бензофуроксанового ряда на обмен кальция в организме /А.И. Зайдуллина, А.Р. Айзатуллова // Материалы Всероссийского конкурса студенческих научно-исследовательских работ

"Студент - исследователь". ФГБОУ ВО Поволжская государственная академия физической культуры, спорта и туризма. - г. Казань, 2018. - С. 4-8.

7. Rufiya G Karimova. The role of NO-system in the realization of ion-regulating function of the kidneys in the model of chronic renal failure / Rufiya G Karimova, Alisa A Belova, Alsu I Zaidullina // Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences. - 9 (6) - 2018. - P. 1143-1150.

8. Зайдуллина А.И. Экспериментальные исследования остеопротективных свойств экзогенного донора оксида азота (II) / А.И. Зайдуллина // Материалы VI Всероссийской молодёжной научно-практической конференция «Студенчество России: век XXI». - г. Орел, 2018. - С. 36-43.

9. Зайдуллина А.И. Профилактика развития остеопороза стимуляцией нитроксидергической системы / Р.Г. Каримова, А.И. Зайдуллина // Материалы национальной научно-практической конференции "Научно-прикладные аспекты производства, переработки и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции". - г. Ярославль, 28 марта 2019. - С. 115-123.

10. Зайдуллина А.И. Особенности нитроксидергической системы у телят / А.С. Латыпова, И.Т. Сибгатуллин, А.И. Зайдуллина // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК». - г. Казань, 2019.

11. Зайдуллина А.И. Активность нитроксидергической системы у крыс с остеопоротическими нарушениями / А.И. Зайдуллина // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и учащейся молодежи «Молодежные разработки и инновации в решении приоритетных задач АПК». - г. Казань, 2019.

12. Davletov Danil. The search for new means of treatment and prevention of osteoporosis / Davletov Danil, Zaydullina Alsu // 21st veterinary medicine student scientific research congress. - Istanbul, 17 April 2019.

13. Зайдуллина А.И. Изучение особенностей нитроксидергической системы в целях профилактики остеодистрофии / А.И. Зайдуллина, И.Р. Зайдуллин, Р.Г. Каримова // Материалы Международной научно-практической конференции "Фундаментальные и прикладные научные исследования: инноватика в современном мире". - г. Уфа, 23 мая 2019. - С. 68-75.