DOI 10.31718/2077-1096.21.1.89

УДК 616.71–002 : 615.27 : 546

Ковальова І.О., Макаренко В.І., Сілкова О.В., Макаренко О.В., Костенко Г.В.

ВПЛИВ ПІРОЛІДИНДИТІОКАРБАМАТУ АМОНІЮ НА БІОМЕХАНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ СТЕГНОВОЇ КІСТКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ПОЄДНАНОГО НАДЛИШКОВОГО НАДХОДЖЕННЯ ФТОРИДУ ТА НІТРАТУ НАТРІЮ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Досліджено вплив інгібітора активації NF-κB піролідіндитіокарбамату амонію на біомеханічні характеристики стегнової кістки щурів за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію. Експерименти проведено на 30 білих щурах лінії Вістар масою 190-240 г, розподілених на 3 групи: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – після поєднаного введення фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) та нітрату натрію (500 мг/кг маси тіла) протягом 30 діб, у 3-й групі, починаючи з 15-ї доби інтоксикації, внутрішньоочеревинно вводили інгібітор активації NF-κB піролідіндитіокарбамат амонію в дозі 76 мг/кг 3 рази на тиждень. Дослідження біомеханічних властивостей стегнової кістки проводили за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 з оцінкою розривного навантаження (міцності) та відносного подовження кісток (пружності), а також за 4-х точковою схемою (випробовування на згин) за допомогою деформаційної установки МРК-1 з розрахунком модулю Юнга, межі міцності, відносної залишкової деформації до руйнування та відносного видовження до руйнування. Призначення піролідіндитіокарбамату амонію за умов експерименту достовірно збільшувало розривне навантаження при лінійному розриві та на згин на 35,3 та 23,5% відповідно порівняно з результатами 2-ї групи. Відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив і згин було більшим, ніж значення 2-ї групи на 7,9 та 18,6 %. При випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 було виявлено вірогідне підвищення модулю пружності Юнга на 19,8% порівняно з результатами 2-ї групи. Проте показники межі пружності та міцності, відносного видовження крайніх волокон до руйнування суттєво не змінювалися. Зроблено висновок, що інгібітор транскрипційного чинника NF-κB піролідіндитіокарбамат амонію за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію є ефективним остеопротективним засобом, збільшує міцність і пружність стегнових кісток.

Ключові слова: транскрипційний чинник каппа В, стегнова кістка, хронічна інтоксикація фторидом і нітратом натрію, піролідіндитіокарбамат амонію, біомеханічні характеристики.

Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації 0114U004941).

Неорганічні нітроген-умісні сполуки та фториди є сполуками з неоднозначним впливом на кісткову тканину. Нітрат-іони, як донатори нітрогену (II) оксиду (NO), можуть як підвищувати кісткову масу [6, 10], так і порушувати метаболічні та біомеханічні властивості кісток [9]. Клінічне застосування при остеопорозі органічних нітратів і лікарських засобів, що містять фториди, не завжди підвищує мінеральну щільність кісток та зменшує випадки переломів [4, 5]. Повідомляється, що при введенні фторидів можуть знижуватися біомеханічні властивості кісток [2, 3].

Примітно, що дія продуктів відновлення нітратів та фторид-іонів сприяє активації такого транскрипційного чинника, як ядерний фактор каппа В (NF-κB, англ. Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), що контролює біосинтез прозапальних і прооксидантних білків, а також гістолітичних ферментів [1].

Нещодавно нами показано, що інгібітори транскрипційного чинника NF-κB за умов поєднаного введення фториду та нітрату натрію нормалізують масу стегнових кісток і хребців, збільшують щільність і мінеральну насиченість стегнових кісток, а також щільність, мінеральну насиченість і міцність хребців (зменшується остеометричний індекс Simon) [8].

Доведеним є вплив активації NF-κB на про-

цес ремоделювання кісткової тканини [7], але наслідки цієї дії є суперечливими та важкопрогнозованими.

Метою роботи було з'ясування впливу інгібітора активації NF-κB піролідіндитіокарбамату амонію на біомеханічні характеристики стегнової кістки щурів за умов поєднаного надлишкового надходження фториду та нітрату натрію.

Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 30 білих щурах лінії Вістар масою 190-240 г, розподілених на 3 групи: 1-ша – інтактні тварини, 2-га – після поєднаного введення фториду натрію (10 мг/кг маси тіла) та нітрату натрію (500 мг/кг маси тіла) протягом 30 діб, у 3-й групі, починаючи з 15-ї доби інтоксикації, внутрішньоочеревинно вводили інгібітор активації NF-κB піролідіндитіокарбамат амонію ("Sigma-Aldrich, Inc.", США) в дозі 76 мг/кг 3 рази на тиждень [11].

Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, дотримуючись положень «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Виділяли і скелетували стегнові кістки.

Дослідження біомеханічних властивостей стегнової кістки проводили за 2-х точковою схе-

мою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) з використанням машини розривної РМУ-0,05-1 з оцінкою розривного навантаження (міцності) та відносного подовження кісток (пружності), а також за 4-х точковою схемою (випробовування на згин) за допомогою деформаційної установки МРК-1 з розрахунком модулю Юнга, межі міцності, відносної залишкової деформації до руйнування та відносного видовження до руйнування.

Товщину і ширину зразків вимірювали за допомогою мікрометра МК 0-25 з похибкою $\pm 0,01$ мм не менше ніж у 3-х місцях поблизу середини діафіза стегнової кістки. Відстань між опорами вимірювали за допомогою штангенциркуля з похибкою $\pm 0,02$ мм.

При випробовуванні на деформаційній установці МРК-1 використовували пристрій, що забезпечував деформацію згину за 4-х точковою схемою навантаження. Зразок поміщали в робочу зону установки та здійснювали згин зі стабільною швидкістю $0,25 \pm 0,01$ мм/хв до руйнування кістки. Процес деформації фіксувався на діаграмній стрічці при швидкості її руху 12 мм/хв за допомогою самописця КСП-4 в координатах «навантаження-прогин». Калібрування діаграми здійснювалося тарувальним вантажем масою 5 кг.

За діаграмою визначали модуль Юнга для згину (E), межу пружності $\sigma_{пр}$, межу міцності $\sigma_{мц}$ та відносне залишкове видовження крайніх волокон до руйнування δ за стандартною методикою.

Модуль Юнга під час згину ($E_{зг}$) в МПа обчислювали за формулою:

$$E_{зг} = \frac{0,185 \cdot L_v^3 \cdot (F_2 - F_1)}{bh^3 \cdot (z_2 - z_1)}$$

де: L_v – відстань між опорами, мм; F_2 – навантаження, що відповідає величині відносної деформації крайніх волокон 0,3%, Н; F_1 – навантаження, що відповідає величині відносної деформації крайніх волокон 0,1%, Н; b – ширина зразка, мм; h – товщина зразка, мм; z_2 – прогин зразка, який відповідає відносній деформації крайніх волокон 0,3%, мм; z_1 – прогин зразка, який відповідає відносній деформації крайніх волокон 0,1%, мм.

Відносну деформацію крайніх волокон (ϵ) обчислювали за формулою:

$$\epsilon = \frac{zh}{0,185 L_v^2}$$

де: L_v – відстань між опорами, мм; h – товщина зразка, мм; z – прогин зразка, мм.

Межа пружності та міцності (або тимчасовий опір) розраховувалися за формулою:

$$\sigma = \frac{F \cdot L_v}{bh^2}$$

де: F – навантаження, що відповідає відповідній межі, Н; L_v – відстань між опорами, мм; b – ширина зразка, мм; h – товщина зразка, мм.

Для розрахунку відносного видовження крайніх волокон до руйнування $\epsilon_{\max}$ (характеристика пластичності матеріалу) використовували максимальне значення прогину зразка.

Для визначення величини навантажень та стріли прогину за діаграмою деформації використовували масштаб за відповідними осями.

Статистичні розрахунки проводили з використанням програми "StatisticSoft 6.0". Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо вони відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували критерій t Стюдента для незалежних вибірок. У разі, коли ряди результатів не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Манна-Вітні.

Результати дослідження та їх обговорення

У таблиці 1 наведено результати дослідження впливу інгібітора транскрипційного чинника NF- κ B на біомеханічні властивості стегнової кістки за 2-х точковою схемою (випробовування на лінійний розрив) та 3-х точковою схемою (випробовування на згин) за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію з використанням машини розривної РМУ-0,05-1

Призначення піролідіндитіокарбамату амонію за умов експерименту достовірно збільшувало розривне навантаження при лінійному розриві та на згин на 35,3 та 23,5% відповідно порівняно з результатами 2-ї групи. Відносне подовження кісток при випробовуванні на лінійний розрив і згин було більшим, ніж значення 2-ї групи на 7,9 та 18,6 %.

Таблиця 1
Вплив піролідіндитіокарбамату амонію на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при дослідженні на машині розривній РМУ-0,05-1 ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Характер випробовування			
	На лінійний розрив (за 2-точковою схемою)		На згин (за 3-точковою схемою)	
	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %	Розривне навантаження, Н	Відносне подовження, %
Інтактні	104,2 $\pm$ 1,8	20,2 $\pm$ 0,3	117,2 $\pm$ 2,3	12,2 $\pm$ 0,4
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	63,4 $\pm$ 2,8 *	18,9 $\pm$ 0,3*	77,4 $\pm$ 2,7 *	8,6 $\pm$ 0,2*
+ введення амонію піролідіндитіокарбамату	85,8 $\pm$ 2,6 **,	20,4 $\pm$ 0,4 **	95,6 $\pm$ 2,6 **,	10,2 $\pm$ 0,3 **,

При оцінці біомеханічних властивостей стегнової кістки за умов призначення піролідіндітіокарбамату амонію при надмірному надходженні фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 (таблиця 2) бу-

ло виявлено вірогідне підвищення модулю пружності Юнга на 19,8% порівняно з результатами 2-ї групи. Проте показники межі пружності та міцності, відносного видовження крайніх волокон до руйнування суттєво не змінювалися.

Таблиця 2
Вплив піролідіндітіокарбамату амонію на біомеханічні властивості стегнової кістки за умов надлишкового надходження фториду та нітрату натрію при випробовуванні на згин за 4-х-точковою схемою за допомогою деформаційної установки МРК-1 ($M \pm m$, $n=15$)

Групи	Показники			
	Модуль Юнга Е, МПа	Межа пружності $\sigma_{пр.}$, МПа	Межа міцності $\sigma_{мц.}$, МПа	Відносне видовження до руйнування ϵ_{max} , %
Інтактні	2832,9 $\pm$ 146,6	55,4 $\pm$ 3,0	65,8 $\pm$ 3,8	3,2 $\pm$ 0,8
Сукупне введення фториду та нітрату натрію	2155,7 $\pm$ 56,5 *	52,1 $\pm$ 4,2	57,7 $\pm$ 5,3	4,1 $\pm$ 0,5
+ введення амонію піролідіндітіокарбамату	2582,1 $\pm$ 141,0 **	44,5 $\pm$ 5,7	59,6 $\pm$ 4,5	3,3 $\pm$ 0,2

Раніше було виявлено покращення тензометричних характеристик шкіри (міцності та еластичності) при введенні піролідіндітіокарбамату амонію за умов надмірного надходження нітрату натрію в організм щурів. Ці показники виявляють зворотну кореляційну залежність зі змінами маркерів деструкції сполучної тканини (колагенолізу та деполімеризації протеогліканів) [12].

NF- κ B забезпечує експресію генів прооксидантних і гістолітичних ферментів. Тому виявлене нами збільшення міцності та пружності стегнових кісток при введенні піролідіндітіокарбамату амонію за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію узгоджується з раніше виявленою нами здатністю інгібітора транскрипційного чинника NF- κ B знижувати показники нітрозативного стресу, обмежувати активність маркерних ферментів резорбції кісток, деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів кісткової тканини [8].

Це доводить доцільність розширення арсеналу остеопротективних засобів за рахунок інгібіторів NF- κ B.

Таким чином, інгібітор транскрипційного чинника NF- κ B піролідіндітіокарбамат амонію є ефективним остеопротективним засобом, збільшує міцність і пружність стегнових кісток за умов поєданого введення фториду та нітрату натрію.

Література

- Bogdanov AV, Kostenko VO. Vplyv inhibitora yadernoyi translokatsiyi transkryptsiynoho faktora κ B na oksyyny metabolizm u tkanyakh parodontu shchuriv za umov poyednanoho nadlyshkovoho nadkhodzhennya nitratu ta ftyrydu natriyu [Effect of inhibitor of nuclear translocation of transcription factor κ B on oxidative metabolism in periodontal tissues of rats under excessive combined sodium nitrate and fluoride intake]. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukrayins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi. 2017;17(1):217-279. (Ukrainian).
- Everett ET. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. J Dent Res. 2011;90(5):552-560.
- Haguenauer D, Welch V, Shea B et al. Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. Osteoporos Int. 2000;11(9):727-738.
- Golchin N, Hohensee C, LaCroix A, Gray SL. Nitrate Medications, Fractures, and Change in Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: Results from the Women's Health Initiative. J Bone Min Res. 2016 Sep; 31(9): 1760-1766.
- Gutteridge DH, Stewart GO, Prince RL et al. A randomized trial of sodium fluoride (60 mg) +/- estrogen in postmenopausal osteoporotic vertebral fractures: increased vertebral fractures and peripheral bone loss with sodium fluoride; concurrent estrogen prevents peripheral loss, but not vertebral fractures. Osteoporos Int. 2002;13(2):158-170.
- Kalyanaraman H, Ramdani G, Joshua J et al. A novel, direct no donor regulates osteoblast and osteoclast functions and increases bone mass in ovariectomized mice. J Bone Miner Res. 2017 Jan; 32(1): 46-59.
- Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. Ann Clin Biochem. 2018 May;55(3):308-327.
- Kovalova IO, Kostenko VO. Vplyv inhibitoriv transkryptsiynoho chynnyka κ B na metabolichni ta strukturni porushennya kistkovoyi tkanyyny za umov poyednanoho nadlyshkovoho nadkhodzhennya ftyrydu ta nitratu natriyu [Effect of transcription factor κ B inhibitors on metabolic and structural disorders in bone tissue under combined excessive intake of fluoride and sodium nitrate]. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukrayins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi. 2019;19(1): 65-70. (Ukrainian).
- Sorokin BV, Kostenko VO. Zminy komponentiv orhanichnoho matryksu kistkovoyi tkanyyny shchuriv pry vidtvorenni eksperymental'noho osteoporozu za umov khronichnoyi intoksykatsiyi nitratom natriyu [Alterations of components of organic bone matrix in rats under modeled osteoporosis and chronic sodium nitrate intoxication]. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visnyk Ukrayins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi. 2013; 13(2):220-224. (Ukrainian).
- Zuina M, Rigatellie G, Scaranellod F et al. Nitrates and osteoporosis: Which relationship? Eur J Intern Med. 2017 Sep;43:e22-23.
- Yelins'ka AM, Shvaikovs'ka OO, Kostenko VO. Vplyv pirolidyndytiokarbamatu amoniyu na produktsiyu aktyvnykh form kysnyu i azotu v tkanyakh parodontu ta slynnnykh zaloz shchuriv za umov systemnoho vvedennya lipopolisakharydu Salmonella typhi [Influence of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate on production of reactive oxygen and nitrogen species in tissues of periodontium and salivary glands of rats exposed to systemic administration of Salmonella typhi lipopolisaccharide]. Fiziol Zh. 2018;64(5):63-69. (Ukrainian).
- Khnil DA, Levkov AA, Kostenko VA. Effektivnost' sochetannogo primeneniya L-arginina i ingibitora yadernogo faktora κ B dlya korrektsii dezorganizatsii soyedinitel'noy tkani kozhi kryz pri izbytochnom postuplenii v organizm nitrata natriya [Efficiency of combined application of L-arginin and nuclear factor κ B inhibitor in correcting skin connective tissue disruption in skin of rats under excessive sodium nitrate intake. Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. 2018;16(1):36-40. (Russian).

Реферат

ВЛИЯНИЕ ПИРРОЛИДИНДИТИОКАРБАМАТА АММОНИЯ НА БИОМЕХАНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ БЕДРЕННОЙ КОСТИ КРЫС В УСЛОВИЯХ СОЧЕТАНОГО ИЗБЫТОЧНОГО ПОСТУПЛЕНИЯ ФТОРИДА И НИТРАТА НАТРИЯ

Ковалева И.А., Макаренко В.И., Силкова Е.В., Макаренко А.В., Костенко Г.В.

Ключевые слова: транскрипционный фактор каппа В, бедренная кость, хроническая интоксикация фторидом и нитратом натрия, пирролидиндитиокарбамат аммония, биомеханические характеристики.

Исследовано влияние ингибитора активации NF-κB пирролидиндитиокарбамата аммония на биомеханические характеристики бедренной кости крыс в условиях сочетанного избыточного поступления фторида и нитрата натрия. Эксперименты проведены на 30 белых крысах линии Вистар массой 190-240 г, разделенных на 3 группы: 1-я - интактные животные, 2-я - после введения фторида натрия (10 мг/кг массы тела) и нитрата натрия (500 мг/кг) в течение 30 суток, в 3-й группе, начиная с 15-го дня интоксикации, внутривенно вводили ингибитор активации NF-κB пирролидиндитиокарбамат аммония в дозе 76 мг/кг 3 раза в неделю. Исследование биомеханических свойств бедренной кости проводили по 2-х точечной схеме (испытание на линейный разрыв) и 3-х точечной схеме (испытание на изгиб) с использованием машины разрывной РМУ-0,05-1 с оценкой разрывной нагрузки (прочности) и относительного удлинения костей (упругости), а также по 4-х точечной схеме (испытание на изгиб) с помощью деформационной установки МРК-1 с расчетом модуля Юнга, предела прочности, относительной остаточной деформации до разрушения и относительного удлинения до разрушения. Назначение пирролидиндитиокарбамата аммония в условиях эксперимента достоверно увеличивало разрывную нагрузку при линейном разрыве и на изгиб на 35,3 и 23,5% соответственно по сравнению с результатами 2-й группы. Относительное удлинение костей при испытании на линейный разрыв и изгиб было большим, чем значение 2-й группы на 7,9 и 18,6%. При испытании на изгиб по 4-х точечной схеме с помощью деформационной установки МРК-1 было выявлено достоверное повышение модуля упругости Юнга на 19,8% по сравнению с результатами 2-й группы. Однако показатели предела упругости и прочности, относительного удлинения крайних волокон до разрушения существенно не менялись. Сделан вывод, что ингибитор транскрипционного фактора NF-κB пирролидиндитиокарбамат аммония в условиях сочетанного введения фторида и нитрата натрия является эффективным остеопротективным средством, увеличивает прочность и упругость бедренных костей.

Summary

IMPACT OF AMMONIUM PYRROLIDINE DITHIOCARBAMATE ON BIOMECHANICAL CHARACTERISTICS OF FEMORAL BONE IN RATS UNDER THE CONDITIONS OF COMBINED EXCESSIVE INTAKE OF FLUORIDE AND SODIUM NITRATE

Kovaleva I.O., Makarenko V.I., Silkova O.V., Makarenko O.V., Kostenko H.V.

Key words: transcription factor kappa B, femur, chronic intoxication with fluoride and sodium nitrate, ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, biomechanical characteristics.

This article describes the effect of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, an inhibitor of NF-κB activation, on the biomechanical characteristics of femoral bones in rats under the conditions of combined excess intake of fluoride and sodium nitrate. The series of experiments were performed on 30 white Wistar rats weighing 190-240 g, divided into 3 groups: 1st group included intact animals, 2nd group included animals exposed to the combined administration of sodium fluoride (10 mg/kg body weight) and sodium nitrate (500 mg / kg body weight) for 30 days; the 3rd group included rats, who starting from the 15th day of intoxication were injected with an inhibitor of NF-κB activation, ammonium pyrrolidine dithiocarbamate is a dose of 76 mg / kg 3 times a week. The investigation of the biomechanical properties of the femur was performed according to a 2-point scheme (linear rupture test) and a 3-point scheme (bending test) using a rupture machine RMU-0.05-1 with an assessment of rupture load (strength) and bone elongation (elasticity); we also applied a 4-point scheme (bending test) using the deformation test setup MRC-1 with following calculation of the Young's modulus, tensile strength, relative residual deformation to failure and relative elongation to failure. The administration of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate under the conditions of the experiment significantly increased the tensile load at linear rupture and bending by 35.3 and 23.5%, respectively, compared with the results in the 2nd group. The relative elongation of the femoral bones in the test for linear rupture and flexion was more pronounced than the values of the 2nd group by 7.9 and 18.6%. When testing for bending according to the 4-point scheme using the deformation setup MRK-1, we revealed a probable increase in the Young's modulus of elasticity by 19.8% compared to the results in the 2nd group. However, the indicators of the limit of elasticity and strength, the relative elongation of the extreme fibers before fracture did not change significantly. This enables us to conclude that ammonium pyrrolidine dithiocarbamate, the inhibitor of the NF-κB transcription factor, used under the conditions of combined administration of fluoride and sodium nitrate can serve an effective osteoprotective agent, which increases the strength and elasticity of the femoral bones.