

MANSUR RAHNAMA¹, JADWIGA BŁONIAK², STANISŁAW ZARĘBA², DOROTA ŁUKASZEWICZ¹

WPŁYW DOŚWIADCZALNEJ KORTYKOIDOTERAPII NA POZIOM CYNKU
W ZĘBACH SZCZURÓW

THE INFLUENCE OF THE EXPERIMENTAL CORTICOIDOTHERAPY
ON THE ZINC LEVEL IN THE RATS TEETH

¹ Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej
Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: Dr hab. T. Tomaszewski

² Katedra i Zakład Bromatologii Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: Prof. dr hab. S. Zaręba

Zbadano zawartość cynku w zębach siecznych szczurów poddanych uprzednio korykoidoterapii doświadczalnej. Zwierzętom podawano hydrokortyzon oraz hydrokortyzon łącznie z preparatem wapniowym i witaminami A + D₃ lub z kalcitoniną przez okres 4 i 8 tygodni.

Stwierdzono obniżenie się poziomu cynku w tkance zębowej już po 4 tygodniach terapii hydrokortyzonem. Oznaczenie zawartości cynku wykonano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

WSTĘP

Cynk należy do mikroelementów niezbędnych dla ustroju. Konieczny jest do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu ludzkiego. Odgrywa ważną rolę zarówno w fizjologii jak i jego patologii. Transport cynku w organizmie wiąże się z białkami: albuminami (60%) i alfa₂ makroglobuliną (30 – 40%) oraz z aminokwasami: głównie z histydyną i cysteiną. Zmagazynowany w narządach mięsnych związany jest z metalotioneiną. Będąc składnikiem lub aktywatorem wielu enzymów uczestniczy w procesach przemiany kwasów nukleinowych, węglowodanów, tłuszczów i białek. Wchodząc w skład polimerazy DNA bierze udział w podziałach komórkowych. Cynk jest niezbędny do prawidłowej regeneracji naskórka, odpowiedzi immunologicznej ustroju, hemopoezy, spermatogenezy, niektórych czynności mózgu, prawidłowego widzenia, odczuwania smaku i węchu.

Cynk pozakomórkowy stanowi ok. 2% ogólnoustrojowych zasobów i występuje głównie we krwi. Największe ilości tego mikropierwiastka zgromadzone są w mięśniach, wątrobie i skórze skąd w wyniku przemian metabolicznych ulega on szybkiej eliminacji z ustroju. Znaczne ilości zmagazynowane są we włosach i tkance kostnej łącznie z zębami stanowiąc depozyty mało ruchliwe [7, 10, 11, 19].

Cynk odgrywa ważną rolę w procesach kostnienia i mineralizacji tkanki kostnej, w których bezpośrednio aktywuje syntezę aminoacetylo – tRNA w komórkach

osteoblastów, stymulując syntezę białek komórkowych. Hamuje proces tworzenia się osteoklastów. Tworzy połączenie chelatowe z β -alanylo-L-histydyną (AHZ), które stymuluje proces tworzenia się kości intensywniej od innych czynników kościotwórczych [19]. Przez analogię sugeruje się, że podobne mechanizmy zachodzą w tkankach twardych zębów.

Zęby wykazują najwyższy stopień zmineralizowania w organizmie człowieka, mają najbardziej zwartą budowę, ale w niekorzystnych warunkach w czasie zmiany gospodarki mineralnej czy hormonalnej, w tkance tej, podobnie jak w kościach szkieletu zachodzą zmiany w mikroarchitekturze – obserwuje się demineralizację zębów. Przyjmowanie przez dłuższy czas leków glikokortykosteroidowych prowadzi do zmian w tkance zębowej. W zębach zwierząt doświadczalnych stwierdzono mniejszą zawartość wapnia i magnezu [11, 14, 15].

Rola i zachowanie się pierwiastków śladowych m. in. cynku w tym procesie klinicznym, nie jest jeszcze dobrze poznana. Dlatego postanowiono zbadać na zwierzętach doświadczalnych wpływ terapii kortykosteroidowej na poziom cynku w zębach i tym samym określić udział cynku w procesie demineralizacji tkanki zębowej w osteoporozie polekowej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał analityczny stanowiły zęby sieczne szczurów rasy *Wistar* o masie około 250 g, którym podawano duże dawki hydrokortyzonu (i hydrokortyzonu łącznie z innymi lekami) przez okres 4 i 8 tygodni. Zęby te uznano za najodpowiedniejszy materiał badawczy gdyż występuje w nich stała odnowa tkanek twardych. Posiadają one szeroki otwór szczytowy, pojemny kanał korzeniowy i dużą masę miazgi co zapewnia dobrą wymianę jonową [3].

Szczury podzielono losowo na sześć grup liczących po 20 zwierząt w każdej, a każda grupa dzieliła się na dwie podgrupy w zależności od czasu trwania doświadczenia. W pierwszej podgrupie badania wykonano po 4 tygodniach, a w drugiej po 8 tygodniach trwania eksperymentu.

1. Grupa kontrolna (K) – szczurom podawano dootrzewnowe codziennie 0,9% fizjologiczny roztwór NaCl w ilości 0,5 ml/kg m.c.
2. Grupa doświadczalna (H) – zwierzętom tej grupy podawano codziennie dootrzewnowe *Hydrocortisonum hemisuccinatum* (Polfa) w dawce 30 mg/kg m.c. w dwóch dawkach podzielonych co 12 godzin (po 15 mg/kg m.c.).
3. Grupa doświadczalna (Ca) – dwa razy dziennie podawano szczurom dootrzewnowe 10% roztwór *Calcium gluconolactobionicum* (Polfa) w dawce 30 mg/kg m.c. oraz roztwór witaminy A + D₃ (Terpol) sondą żołądkową (p.o.) po 200 j.m. witaminy A i po 100 j.m. witaminy D₃.
4. Grupa doświadczalna (H + Ca) – zwierzętom podawano dootrzewnowo *Hydrocortisonum hemisuccinatum* w takich samych dawkach jak zwierzętom z grupy (H) i równocześnie 10% roztwór *Calcium gluconolactobionium* łącznie z witaminą A + D₃ w takich ilościach jak w grupie (Ca).
5. Grupa doświadczalna (M) – szczurom z tej grupy podawano 1 raz dziennie po 5 j.m./kg m.c. kalcytoniny łososiowej (Miacalcic firmy Sandoz).
6. Grupa doświadczalna (H + M) – zwierzętom podawano dootrzewnowo *Hydrocortisonum hemisuccinatum* w takich samych dawkach jak w grupie doświadczalnej (H) z równoczesnym dootrzewnowym podaniem kalcytoniny łososiowej 1 raz dziennie w ilości jak w grupie (M).

Po czterech tygodniach szczury z grup doświadczalnych: (K), (H), (Ca), (H + Ca), (M), (H + M) usypiano przy pomocy ketaminy, dekapitowano i preparowano zęby przeznaczone do

badania. W ten sam sposób przygotowano materiał analityczny po 8 tygodniach trwania doświadczenia.

Wypreparowane zęby umyto w wodzie destylowanej, wysuszono i zważono na wadze analitycznej z dokładnością 0,0001 g. Po uprzednim spaleniu w płomieniach palnika (w tyglach kwarcowych) mineralizowano je metodą „na sucho” w piecu muflowym w temp. 450°C. Proces mineralizacji przyspieszano za pomocą 1 cm³ stężonego kwasu azotowego (65% HNO₃ – Suprapur, firmy Merck). Popioły nie zawierające śladów węgla rozpuszczono w kwasie solnym (roztwór wodny 30% HCl – Suprapur, firmy Merck, 1+1 v/v) i przenoszono do kolb miarowych o poj. 15 cm³ przy użyciu wody dejonizowanej. Po wykonaniu 5-krotnych rozcieńczeń niektórych mineralizatów oznaczenia zawartości cynku przeprowadzono w spektrometrze absorpcji atomowej firmy Pye Unicam, typ SP 192, przy zastosowaniu następujących parametrów (13):

- długość fali analitycznej – 213, 9 nm,
- prąd lampy – 10 mA,
- szerokość szczeliny – 0,4 nm,
- przepływ powietrza – 5,0 dm³ x min⁻¹,
- przepływ acetyleny – 0,8 dm³ x min⁻¹,
- wysokość palnika – 10,0 cm.

Wyniki badań doświadczalnych poddano analizie statystycznej z użyciem testu t-Studenta, przy założonym poziomie istotności $p \leq 0,05$. Podano średnią arytmetyczną (M), odchylenie standardowe (S) i określono poziom istotności (P).

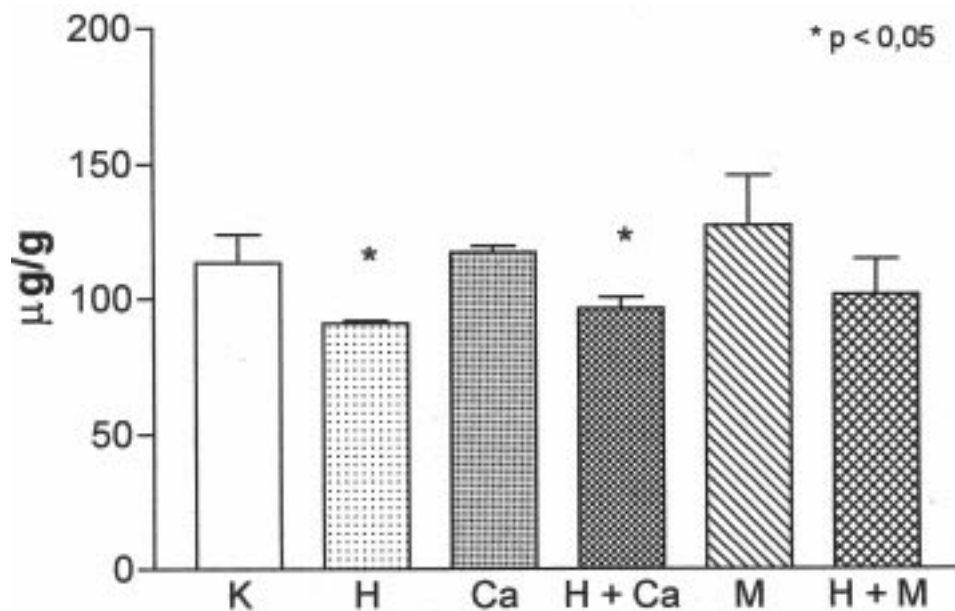
WYNIKI

Wyniki oznaczenia zawartości cynku w grupach doświadczalnych: (K), (H), (Ca), (H + Ca), (M), (H + M) po 4 i 8 tygodniach trwania eksperymentu umieszczono w tabeli I, a w sposób graficzny zilustrowano na rycinach 1 i 2.

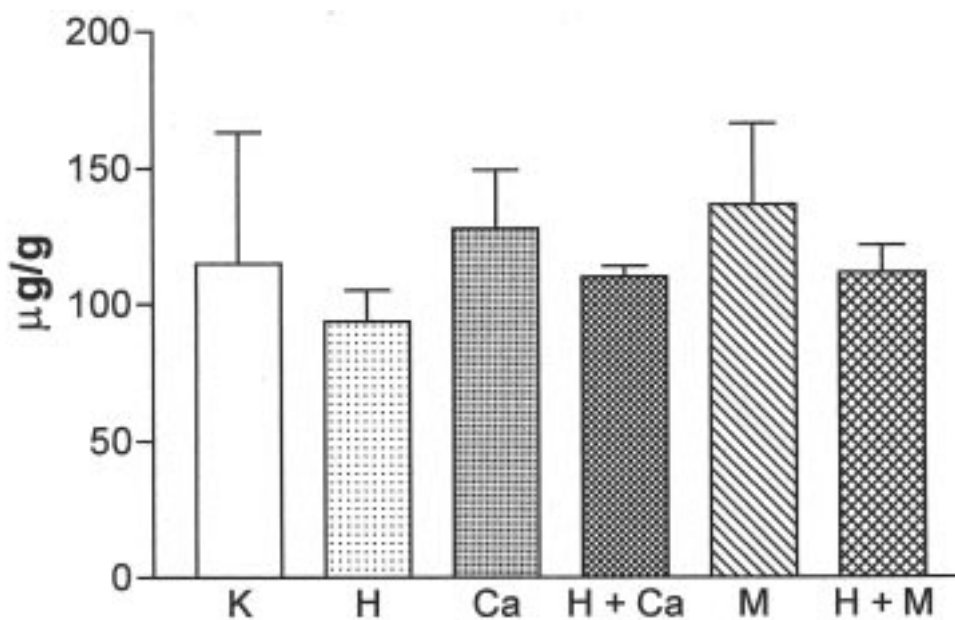
Tabela I. Poziom cynku w zębach szczurów
The levels of zinc in rats teeth after corticoidotherapy

Grupa doświadczalna szczurów	Okres badań (tyg.)	Liczba zwierząt	Zn µg/g (M)	Odchylenie standardowe SD	Poziom istotności P <
Kontrolna (K)	4	10	113,39	10,75	ns
	8	10	115,08	48,30	ns
Hydrokortyzon (H)	4	10	91,08	0,85	0,05
	8	10	93,81	11,39	ns
Calcium (Ca)	4	10	117,29	2,36	ns
	8	10	128,14	21,35	ns
Hydrokortyzon + Calcium (H + Ca)	4	10	96,46	4,14	0,05
	8	10	110,01	4,08	ns
Miacalcic (M)	4	10	127,24	18,32	ns
	8	10	136,55	29,86	ns
Hydrokortyzon + Miacalcic (H + M)	4	10	101,17	13,35	ns
	8	10	111,65	9,92	ns

Hydrokortyzon podawany szczurom w dawce 30 mg/kg m.c. w dwóch dawkach podzielonych spowodował istotne zmniejszenie się zawartości cynku w zębach szczurów już po 4 tygodniach trwania doświadczenia. Po 8 tygodniach kortykoidoterapii poziom



Ryc. 1. Poziom cynku w zębach szczurów po 4 tygodniach doświadczenia
The levels of zinc in rats teeth after 4 weeks of experiment



Ryc. 2. Poziom cynku w zębach szczurów po 8 tygodniach doświadczenia
The levels of zinc in rats teeth after 8 weeks of experiment

cynku w zębach był również niższy w porównaniu z zawartością Zn w tkance zębowej zwierząt grupy kontrolnej (K).

Leki stosowane w leczeniu osteoporozy: *Calcium gluconolactobionicum* i witaminy A + D₃ oraz Miacalcic, podawane szczurom łącznie z hydrokortyzonem spowodowały wzrost poziomu cynku w zębach w stosunku do zębów zwierząt z grupy (H), ale zawartość tego pierwiastka była niższa w porównaniu z grupą kontrolną (K). Istotna różnica wystąpiła po 4 tygodniowym doświadczeniu w grupie zwierząt (H + Ca).

W przeprowadzonym doświadczeniu badano również wpływ suplementacji wapniem na poziom cynku w zębach szczurów. Wapń podawany łącznie z witaminami A + D₃ powodował wzrost zawartości cynku w siekaczach zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobne działanie wykazywała kalcytonina, która wstrzykiwana szczurom przez okres 4 i 8 tygodni również podwyższała poziom cynku w zębach.

DYSKUSJA

W badaniach klinicznych u ludzi i w doświadczeniach na zwierzętach zaobserwowano, że podawanie leków glikokortykosteroidowych przez dłuższy okres czasu lub stosowanie ich w większych dawkach powoduje wtórną osteoporozę kości szkieletu [1, 2, 5, 9, 12] i zmiany osteoporotyczne w narządzie życia [14, 15, 18]. Kortykosteroidy zwiększają resorpcję kości obniżając absorpcję składników mineralnych w przewodzie pokarmowym i zwiększając ich wydalanie z organizmu z moczem lub kałem [7].

Samachson i wsp. [16] w badaniach na zwierzętach potwierdzili, że obszar kości bardziej zmineralizowany zawiera więcej cynku niż kość zawierająca mniej składników mineralnych. *Haumont* [8] podaje, że w miejscach rozpoczynającego się wapnienia kości również występuje cynk.

W badaniach makro- i mikroautoradiograficznych oraz histologicznych stwierdzono obecność cynku we wszystkich częściach narządu żucia. Największe ilości tego pierwiastka występowały w szkliwie, mniejsze w warstwie odontoblastów w miazdze i włóknach kolagenowych. Dodatkowe dostarczanie jonów cynku powoduje jego wychwyt i okresową kumulację w tkankach zęba [11]. Depozyt cynku uruchamiany jest dopiero w wyjątkowych, niekorzystnych dla organizmu warunkach, np. w zaburzeniach metabolicznych, także po glikokortykoidoterapii. Badania wykazały, że u kobiet z osteoporozą zwiększa się utrata cynku, który uważany jest za jeden z ważnych markerów tego schorzenia [7].

W przeprowadzonym doświadczeniu na szczurach stwierdzono, że podawanie zwierzętom hydrokortyzonu zarówno przez 4 jak i 8 tygodni powoduje zmniejszenie się poziomu cynku w ich zębach. W celu wyeliminowania niekorzystnego wpływu kortykoidoterapii na tkankę zębową, w innych grupach doświadczalnych podawano zwierzętom równocześnie hydrokortyzon z *Calcium gluconolactobionicum* łącznie z witaminą A + D₃ lub Miacalcic. Preparaty te nie były jednak w pełni skuteczne w utrzymaniu prawidłowej zawartości cynku w zębach. Jakkolwiek poziom cynku uległ podwyższeniu, to nadal był niższy od jego ilości znajdującej się w tkance zębowej zwierząt grupy kontrolnej.

Lepsze wyniki przynosi terapia skojarzona, którą stosował *Sambrook* i wsp. [17]. Stwierdzono, że utratę masy kostnej może chronić wapń podawany łącznie z kalcitriolem (wit. D₃) i stosowaną przez dłuższy czas kalcytoniną [4, 6]. Zwraca się również

uwagę na rolę preparatów cynkowych, które mogłyby być zastosowane w przypadku nadmiernej utraty cynku z tkanki kostnej i zębów w procesie osteoporozy, także post-eroidowej. *Yamaguchi* i wsp. [20] donoszą, że cynk stymuluje syntezę protein kości w komórkach kostnych szczura i działa synergistycznie z 1,25-dihydroksy witaminą D₃ stymulującą metabolizm kości.

Przeprowadzone doświadczenie wyjaśniło częściowo proces zachowania się cynku w zębach po kortykoidoterapii, które wiąże się z zagadnieniem roli pierwiastków śladowych w polekowej demineralizacji tkanki zębowej.

WNIOSKI

1. Kortykoidoterapia powoduje obniżenie się poziomu cynku w zębach zwierząt doświadczalnych.
2. Istotne zmiany zawartości cynku w tkance zębowej wystąpiły już po 4 tygodniach podawania hydrokortyzonu.
3. Inne leki (preparat wapniowy, witaminy A + D₃, kalcytonina) stosowane łącznie z hydrokortyzonem wpływają na wzrost poziomu cynku w zębach zwierząt w czasie kortykoidoterapii.
4. Suplementacja wapniem oraz podawanie kalcytoniny zwierzętom powoduje wzrost zawartości cynku w ich zębach.

M. Rahnama, J. Błoniarz, S. Zaręba, D. Łukaszewicz

THE INFLUENCE OF THE EXPERIMENTAL CORTICOID THERAPY ON THE ZINC LEVEL IN THE RATS TEETH

Summary

It was examined the zinc level in the rats teeth using atomic absorption spectrometry. The animals received hydrocortisone or hydrocortisone with calcium and vitamin A +D₃ or hydrocortisone with calcitonin, through 4 and 8 weeks. These results were compared with the control group.

It was shown the decrease of zinc level in the rats teeth after 4 weeks of corticoidotherapy. The other drugs administered with hydrocortisone caused the increase of zinc concentration in the teeth.

The results of the studies suggest that hydrocortisone induced the zinc mobilization from the hard teeth tissues of rats.

PIŚMIENNICTWO

1. *Adinoff A.D., Hollister J.R.*: Steroid – induced fractures and bone loss in patients with asthma. *N. Engl. J. Med.* 1983, 309, 265–268.
2. *Badurski J.*: Kalcytonina w leczeniu zmian kości i stawów – uzasadnienia doświadczalne i kliniczne oraz doświadczenia własne. *Pol. Tyg. Lek.* 1993, 48, Suppl. 3, 65–68.
3. *Belec C., Miechowski J.*: Wpływ pitnych wód mineralnych Krynicy na zawartość składników mineralnych w zębach zwierząt doświadczalnych. *Czas. Stomat.* 1967, 20, 1031–1038.
4. *Bouillon R.*: Witamina D a osteoporoza. *Post. Nauk Med.* 1990, 3, 171–176.
5. *Cooper C., Coupland C., Mitchell M.*: Reumatoid arthritis, corticosteroid therapy and hip fracture. *Ann. Rheum. Dis.* 1995, 54, 49–52.
6. *Gennari C.*: Zastosowanie kalcytoniny łososiowej w profilaktyce i leczeniu osteoporozy. *Post. Nauk. Med.* 1990, 3, 165–169.

7. *Germano C., Cabot W., Turner L.*: Osteoporoza – leczenie i zapobieganie. Wyd. MADA, Warszawa 2000, 147–148.
8. *Haumont S.*: Distribution of zinc in bone tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 1961, 9, 141–146.
9. *Jabłoński M., Gorzelak M.*: The influence of prolonged administration of high doses of hydrocortisone and salmon calcitonin on cortical bone strength in young adult rats. *Ann. UMCS*, 1998, 53, 229–237.
10. *Kierst W.*: Nauka o żywieniu zdrowego i chorego człowieka. PZWL, Warszawa 1989, 84–86, 703–705.
11. *Kwapińska H.*: Makroskopowa i mikroskopowa ocena rozmieszczenia cynku w twardych tkankach narządu żucia szczura białego. *Folia Medica Cracoviensia* 1991, 32, 299–308.
12. *Peat I.D., Healy S., Reid D. M., Ralston S.H.*: Steroid induced osteoporosis: an opportunity for prevention. *Ann. Rheum. Dis.* 1995, 54, 66–68.
13. *Pinta M.*: Absorpcyjna spektrometria atomowa – zastosowanie w analizie chemicznej. PWN, Warszawa 1977.
14. *Rahnama M.*: Gęstość kości szczęki i żuchwy szczura w doświadczalnej osteoporozie polekowej. *Czas. Stomat.* 1998, 51, 598–603.
15. *Rahnama M.*: Wpływ hydrokortyzonu na zawartość składników mineralnych w szczęce i żuchwie szczura. *Czas. Stomat.* 1998, 51, 739–743.
16. *Samachson J., Dennis J., Fawler R., Schmitz A.*: The reaction of ^{65}Zn with the surfaces of bone and bone mineral. *Biochem. Biophys. Acta* 1967, 148, 767–773.
17. *Sambrook P., Birmingham J., Kelly P., Kempler S., Nguyen T., Stat M., Pocock N., Eisman J.*: Prevention of corticosteroid osteoporosis. A Comparison of Calcium, Calcitriol and Calcitonin. *N. Engl. J. Med.* 1993, 328, 1747–1752.
18. *von Wowern N., Klausen B., Kollerup G.*: Osteoporosis: A Risk Factor in Periodontal Disease. *J. Periodontol.* 1994, 65, 1134–1138.
19. *Yamaguchi M.*: Role of zinc in bone formation and bone resorption. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1998, 11, 119–135.
20. *Yamaguchi M., Inamoto K.*: Differential effect of calcium regulating hormones on bone metabolism in weanling rats orally administered zinc sulfate. *Metabolism* 1986, 35, 1044–1047.

Otrzymano: 2000.07.24