

MANSUR RAHNAMA, WOJCIECH ŚWIĄTKOWSKI, STANISŁAW ZARĘBA¹⁾

OCENA AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ZASADOWEJ I KWAŚNEJ
W SUROWICY SZCZURÓW W PRZEBIEGU DOŚWIADCZALNEJ
OSTEOPOROZY POMENOPAUZALNEJ

AN ASSESSMENT OF THE ALKALINE AND ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN
RATS SERUM DURING EXPERIMENTAL POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: dr hab. T. Tomaszewski
¹⁾ Katedra i Zakład Bromatologii
Kierownik: prof. dr hab. S. Zaręba

Celem pracy była ocena aktywności fosfatazy zasadowej (Fz) i kwaśnej (Fk) w surowicy szczurów po usunięciu jajników oraz po zastosowaniu estrogenowej terapii zastępczej. Oceniono również związek pomiędzy gęstością mineralną kości (BMD) żuchwy i kręgosłupa a parametrami metabolizmu kostnego. Stężenie fosfatazy zasadowej i kwaśnej było najwyższe u zwierząt z niedoborem estrogenów, a podawanie 17-β estradiolu znamienne obniżyło poziom badanych markerów. Stwierdzono również istotną ujemną korelację Fz i Fk z BMD żuchwy i kręgosłupa.

WSTĘP

Tkanka kostna podlega ciągłym zmianom (tzw. *bone remodeling*) niezależnie od wieku organizmu i wykazuje dynamiczny metabolizm pomimo znacznej mineralizacji istoty międzykomórkowej [5]. Przemiany te można śledzić poprzez oznaczanie specyficznych markerów przebudowy kostnej oraz przez badanie gęstości i architektониki kości. Biochemiczne metody badania przebudowy kostnej umożliwiają ocenę dynamiki tego procesu [8, 9]. Obejmują one pomiary aktywności enzymów specyficznych dla komórek kościotwórczych i kościogubnych oraz pomiary stężeń składników macierzy kostnej uwalnianych do krwi podczas jej syntezy i degradacji. Substancje te oznaczane w surowicy i/lub moczu określa się mianem wskaźników obrotu kostnego [9]. Wśród nich wyróżnia się dodatkowo markery tworzenia i resorpcji kości. Do markerów tworzenia kości zalicza się aktywność fosfatazy zasadowej, poziom osteokalcyny i stężenie propeptydów kolagenu typu I w surowicy krwi. Markery biochemiczne resorpcji kości to: hydroksyprolina, hydroksylizyna, pirydynolina, dezoksyperydynolina, wapń wydalany z moczem, fosfataza kwaśna odporna na inhibicję winianem sodowym, wolny kwas *gamma*-karboksylowo-glutaminowy oraz C-końcowy telopeptyd kolagenu typu I w surowicy krwi [9, 15].

W prawidłowo funkcjonującym dojrzałym organizmie, procesy przebudowy kostnej (synteza macierzy przez osteoblasty, mineralizacja oraz resorpcja kości) są w równowadze. W przypadku osteoporozy równowaga ta zostaje zachwiana i dochodzi do przewagi procesu resorpcji nad osteogenezą. Początkowo zmiany te prowadzą do osteopenii, czyli zmniejszenia masy kostnej, która w równej mierze dotyczy elementów mineralnych, jak i macierzy kości. Kiedy masa kostna zmniejszy się do tego stopnia, że niemożliwe jest utrzymanie prawidłowej struktury szkieletu, występują złamania i inne objawy kliniczne [4]. Patologiczne zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej w osteoporozie można zobrazować wykonując badania gęstości kości (*bone mineral density* – BMD). Najczęściej wykonywane są badanie densytometryczne kości kręgosłupa, szyjki kości udowej oraz kości piętowej. Pozwalają one ocenić stan tkanki kostnej i stopień zaawansowania osteoporozy. Ostatnio przeprowadzane są również badania struktury kości żuchwy u kobiet z osteoporozą [8, 12]. Żuchwa jako składowa narządu żucia podlega ciągłym obciążeniom. Nieustanna czynność tego narządu i bardzo dobre ukrwienie pozwalają zakładać, że zaburzenia ogólnoustrojowe, takie jak osteoporoza, mogą manifestować się w jej obrębie.

Celem pracy była ocena aktywności fosfatazy zasadowej (Fz) oraz kwaśnej (Fk) w surowicy krwi szczurów w przebiegu doświadczalnej osteoporozy pomenopauzalnej. Próbowano również ocenić jak zmiany poziomu wybranych markerów przebudowy kostnej korelują z gęstością kości żuchwy i kręgosłupa szczura.

MATERIAŁ I METODY

Badania doświadczalne przeprowadzono na samicach szczurów szczepu *Wistar*. Wszystkim zwierzętom zapewniono stałość warunków zewnętrznych oraz standardową dietę. Do badań zostały wykorzystane młode dorosłe samice szczurów o masie ciała 250–300g. Po 2 tygodniowej adaptacji do warunków eksperymentalnych zwierzęta podzielono losowo na 7 grup doświadczalnych, liczących po 10 sztuk w każdej.

CL – grupa kontrolna szczurów, zwierząt zdrowych

SH – grupa szczurów traumatyzowana zabiegiem operacyjnym (*shame*)

OV – grupa szczurów po usunięciu jajników

OVO – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano *oleum pro iniectioe*, w celu zbadania wpływu podłoża oleistego badanego leku

OVH₁ – grupa zwierząt po usunięciu jajników, którym podawano 17 β -estradiol w dawce 1,25 μ g dwa razy w tygodniu

OVH₂ – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano 17 β -estradiol w dawce 12,5 μ g dwa razy w tygodniu

OVH₃ – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano 17 β -estradiol w dawce 125 μ g dwa razy w tygodniu.

Całkowity czas trwania eksperymentu wynosił 7 tygodni. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta usypiano, pobierano krew do badań, a następnie dekapitowano.

Aktywność fosfatazy zasadowej w surowicy krwi szczurów oznaczono metodą spektrofotometryczną przy długości fali 450 nm, opartą na kinetycznych procedurach podanych przez *Bowersa* i *McComba* [3] oraz rekomendowanych przez International Federation of Clinical Chemistry [11]. Fosfatzę kwaśną oznaczono metodą kolorymetryczną przy długości fali 405 nm, zmodyfikowaną przez *Hillmana* [10]. Pomiar gęstości kości kręgosłupa i żuchwy przeprowadzono za pomocą densytometru typu DPX-A wykorzystując pochłanianie promieni X w materiałach o różnej gęstości. Aparat emitował promieniowanie o dwóch kanałach energii. Do przeprowadzenia pomiaru gęstości kości zwierząt laboratoryjnych wykorzystano program komputerowy

Small Animal Software. Analizę komputerową uzyskanego skanu przeprowadzono za pomocą opcji Manual Analysis, która to opcja pozwoliła na uzyskanie wyników BMD (gęstości kości) w g/cm^2 .

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań poddano komputerowej analizie statystycznej. Istotność różnic pomiędzy grupami wyznaczono na podstawie przedziałów ufności (NIR) wyznaczonych z analizy wariancji (ANOVA). Istotność różnic zaznaczono w tabelach w kolumnie p. Średnie różnią się istotnie, jeśli nie są oznaczone tą samą literą. Współzależność między wybranymi cechami (poziom fosfatazy zasadowej i kwaśnej a gęstość kości żuchwy i kręgosłupa) wyrażono za pomocą współczynników korelacji *r-Pearsona*. W przypadku stwierdzenia istotnej korelacji wyznaczono równanie regresji.

WYNIKI BADAŃ

Poziom fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli I. Analiza średnich wartości przy założonym poziomie istotności $p < 0,05$ wykazała statystycznie istotne różnice w poziomie fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi badanych szczurów. Najwyższy średni poziom Fz był w grupie zwierząt po usunięciu jajników 132,57 U/L i istotnie różnił się w stosunku do wszystkich innych eksperymentalnych grup, z wyjątkiem grupy OVO. Najniższe stężenie fosfatazy zasadowej stwierdzono w surowicy samic szczurów otrzymujących 17 β -estradiol-grupy OVH₁, OVH₂, OVH₃; odpowiednio 29,50 μL , 24,74 μL , 26,22 μL . Poziom fosfatazy kwaśnej kształtował się podobnie. Najwyższy był w grupie OV-2,50 μL i różnił się istotnie w stosunku do wszystkich innych badanych grup. Obniżenie stężenia Fk w surowicy szczurów nastąpiło po zastosowaniu estrogenów – grupy OVH₁ (0,70 μL), OVH₂ (0,62 μL), OVH₃ (0,41 μL).

Tabela I. Poziom fosfatazy zasadowej (Fz) i kwaśnej (Fk) w surowicy krwi w badanych grupach (U/L).
The level of alkaline and acid phosphatase in the blood serum in examined groups (U/L).

Grupa doświadczalna szczurów	Liczba zwierząt	Fz (M \pm SD)	Istotność różnic (p ₁)*	Fk (M \pm SD)	Istotność różnic (p ₂)*
C1	10	60,24 \pm 13,07	b	1,36 \pm 0,16	a
SH	10	99,48 \pm 22,16	a	1,46 \pm 0,24	a
OV	10	132,57 \pm 42,71	c	2,50 \pm 0,08	c
OVO	10	114,35 \pm 32,94	ac	2,21 \pm 0,49	d
OVH ₁	10	29,50 \pm 0,41	d	0,70 \pm 0,34	b
OVH ₂	10	24,74 \pm 4,07	d	0,62 \pm 0,15	be
OVH ₃	10	26,22 \pm 2,34	d	0,41 \pm 0,07	e

* Średnie różnią się istotnie jeśli nie są oznaczone tą samą literą.

Wyniki średniej gęstości kości żuchwy i kręgosłupa przedstawiono w tab. II. Analiza średnich wartości w siedmiu badanych grupach i w przyjętym okresie obserwacji 7 tygodni wykazała, że gęstość kości żuchwy była najniższa u zwierząt po usunięciu jajników (grupa OV) – 0,0627 g/cm^2 . Wartość ta była statystycznie istotna w stosunku do grupy

Tabela II. Gęstość kości żuchwy i kręgosłupa (BMD) w badanych grupach (g/cm^2).
Bone mineral density of mandible and spine (BMD) in examined groups (g/cm^2).

Grupa doświadczalna szczurów	Liczba zwierząt	BMD żuchwy (M \pm SD)	Istotność różnic (p_1)*	BMD kręgosłupa (M \pm SD)	Istotność różnic (p_2)*
C1	10	0,0792 \pm 0,0148	bc	0,2848 \pm 0,0086	bc
SH	10	0,0730 \pm 0,081	ab	0,2797 \pm 0,0118	b
OV	10	0,0627 \pm 0,0109	a	0,2711 \pm 0,0073	a
OVO	10	0,0653 \pm 0,0104	a	0,2792 \pm 0,0116	b
OVH ₁	10	0,0782 \pm 0,0147	bc	0,2812 \pm 0,0073	b
OVH ₂	10	0,1236 \pm 0,0083	d	0,2909 \pm 0,0032	c
OVH ₃	10	0,0887 \pm 0,0102	c	0,2842 \pm 0,0076	bc

* Średnie różnią się istotnie jeśli nie są oznaczone tą samą literą.

kontrolnej szczurów oraz do wszystkich grup zwierząt po usunięciu jajników otrzymujących 17- β estradiol, grupy OVH₁, OVH₂, OVH₃.

Zaobserwowano również, że po 7 tygodniach doświadczenia gęstość kości kręgosłupa osiągnęła najniższą wartość w grupie szczurów po ovariectomii (OV) – 0,2711 g/cm^2 . Otrzymany wynik był statystycznie istotnie niższy w stosunku do wszystkich innych badanych grup.

Tabela III. Współzależność *r-Pearsona* pomiędzy badanymi cechami.
Correlation *r-Pearsona* between examined traits.

Badane cechy		n	r	p	Równanie regresji
Fz	BMD żuchwy	70	-0,568	< 0,001	$\text{BMD}_{\bar{Z}} = -0,0003 * \text{Fz} + 0,10039$
Fz	BMD kręgosłupa	70	-0,438	< 0,001	$\text{BMD}_{\text{KR}} = -0,0001 * \text{Fz} + 0,28800$
Fk	BMD żuchwy	70	-0,562	< 0,001	$\text{BMD}_{\bar{Z}} = -0,0161 * \text{Fk} + 0,10287$
Fk	BMD kręgosłupa	70	-0,439	< 0,001	$\text{BMD}_{\text{KR}} = -0,0055 * \text{Fk} + 0,28893$

Zależności pomiędzy badanymi wskaźnikami metabolizmu kostnego (Fz, Fk) a gęstością kości żuchwy i kręgosłupa (BMD) przedstawiono w tabeli III oraz na rycinach 1–4. W całej badanej populacji stwierdzono wysoce istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem Fz i Fk a BMD kręgosłupa. Również gęstość żuchwy korelowała ujemnie i istotnie z poziomem fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi. Oznacza to, że wzrostowi Fz i Fk towarzyszy spadek gęstości mineralnej badanych kości.

Ryc. 1. Korelacje pomiędzy poziomem fosfatazy zasadowej a gęstością żuchwy

Ryc. 2. Korelacje pomiędzy poziomem fosfatazy zasadowej a gęstością kręgosłupa

Ryc. 3. Korelacje pomiędzy poziomem fosfatazy kwaśnej a gęstością żuchwy

Ryc. 4. Korelacje pomiędzy poziomem fosfatazy kwaśnej a gęstością kręgosłupa

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Całkowita fosfataza zasadowa w surowicy krwi, jest mieszaniną izoenzymów pochodzących z kości, wątroby, jelit, łożyska [1, 7, 9, 14]. Przyjmuje się, że zdecydowana większość całkowitej aktywności Fz we krwi jest pochodzenia kostnego oraz że wzrost jej stężenia w surowicy określa wzrost aktywności kościotwórczej osteoblastów [8]. Zwiększenie poziomu Fz w surowicy może występować w wielu stanach chorobowych

m.in. w krzywicy, osteomalacji, chorobie *Pageta*, hiperfosfatazemia, mięsaku kościotwórczym, podczas gojenia się ran oraz w osteodystrofii nerkowej [2, 13]. Wykluczając jednostki chorobowe u badanych zwierząt eksperymentalnych, stwierdzono znaczny wzrost poziomu fosfatazy zasadowej u zwierząt po ovariectomii, w porównaniu do grupy kontrolnej. Tak wyraźna reakcja organizmu po wyłączeniu funkcji jajników pokazuje, jak dużą rolę w metabolizmie tkanki kostnej odgrywają naturalne, endogenne hormony płciowe. Fz jest markerem odbudowy kostnej, wzrost jej poziomu w surowicy po ovariectomii świadczyć może, że brak endogennych hormonów płciowych wywołuje znaczne zaburzenia w metabolizmie tkanki kostnej – zmniejszenie gęstości kości żuchwy i kręgosłupa badanych zwierząt. Podobna sytuacja zachodzi u kobiet w bezpośrednim okresie po zakończeniu miesiączkowania, gdy znacznie przyspiesza się przemiana tkanki kostnej [4,6]. Wzrost poziomu całkowitej fosfatazy zasadowej jest odzwierciedleniem przyspieszenia tworzenia kości w następstwie jej zwiększonej resorpcji [15,16]. Zastosowana suplementacja 17 β -estradiolu, spowodowała znaczne obniżenie się poziomu Fz w surowicy krwi. Poziom oznaczonej fosfatazy, nawet przy najniższej dawce estradiolu był znacznie niższy w stosunku do grupy kontrolnej. Również gęstość badanych kości uległa normalizacji (wartości zbliżone do grupy kontrolnej).

Fosfataza kwaśna (Fk) występująca w surowicy krwi jest mieszaniną pięciu izoenzymów, które występują w wielu tkankach: gruczole krokowym, kościach, wątrobie, nerkach, erytrocytach, śledzionie i trombocytach. Charakteryzuje ją optimum działania w zakresie kwaśnego pH i obecność wewnątrz lizosomów [1, 9]. Jako marker resorpcji kości, jej poziom w surowicy krwi wzrasta podczas wzmocnienia procesów resorpcji w wielu chorobach kości. Resorpcja tkanki kostnej w wyniku działania osteoklastów zachodzi wieloetapowo. Początkowo osteoklast przylegający do kości wywołuje lokalne zakwaszenie poprzez wydzielanie protonów, co prowadzi do rozpuszczenia składników nieorganicznych. Odsłonięta w ten sposób część organiczna kości jest częściowo trawiona przez wydzielone na zewnątrz enzymy lizosomalne. Następnie pofragmentowane struktury organiczne ulegają fagocytozie i ostatecznej wewnątrzkomórkowej degradacji [5]. Aktywność resorpcyjna osteoklastów pobudzana jest m.in. przez parathormon (PTH). Osteoklasty nie posiadają jednak receptorów dla PTH i dlatego stymulowanie osteoklastów i resorpcji kości odbywa się najprawdopodobniej przez osteoblasty, które pod wpływem zwiększonego poziomu PTH uwalniają interleukinę-6, pobudzającą dojrzałe osteoklasty do procesu resorpcji. Wiadomo, że jednym z czynników wywierających hamujący wpływ na osteoklasty są estrogeny [5, 7]. Z przeprowadzonych badań wynika, że poziom fosfatazy kwaśnej był najwyższy w grupach OV i OVO, co może wskazywać, że pozbawienie organizmu „ochronnego” działania estrogenów nasiliło resorpcję kości. Uwidocznili to się również w ocenie densytometrycznej badanych kości. Masa kostna żuchwy i kręgosłupa uległa istotnemu zmniejszeniu. Jednocześnie zastosowana suplementacja 17 β -estradiolu spowodowała spadek poziomu Fk w grupach OVH₁, OVH₂, OVH₃ i wzrost gęstości tkanki kostnej. Analizując zmiany stężenia markerów przebudowy kostnej w surowicy krwi zwierząt doświadczalnych oraz gęstość kości żuchwy i kręgosłupa stwierdzono, że wystąpiła istotna korelacja pomiędzy badanymi cechami. Może więc to świadczyć o wzmocnionym procesie metabolizmu kostnego w przeprowadzonym modelu osteoporozy pomenopauzalnej.

WNIOSKI

1. W przebiegu doświadczalnej osteoporozy pomenopauzalnej dochodzi do zmian aktywności fosfatazy zasadowej i kwaśnej w surowicy krwi badanych zwierząt.
2. Wzrostowi Fz i Fk towarzyszy spadek gęstości żuchwy i kręgosłupa (korelacja ujemna).
3. Oznaczenie markerów biochemicznych przebudowy kostnej może być uzupełniającą metodą diagnostyczną oceny zaburzeń przemiany tkanki kostnej.

M. Rahnama, W. Świątkowski, S. Zaręba

AN ASSESSMENT OF THE ALKALINE AND ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN RATS SERUM DURING EXPERIMENTAL POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

Summary

The aim of this study was to evaluate the activity of alkaline (ALP) and acid (ACP) phosphatase in the blood serum of rats after ovariectomy and with estrogen replacement therapy. The relationship between mandible and spine bone mineral density (BMD) and parameters of bone remodeling was also estimated.

The concentration of serum total alkaline and acid phosphatase was higher in the rats with estrogen deficiency, and statistically lower in rats administering 17 β -estradiol.

ALP and ACP levels were correlated significantly negative with mandible and spine BMD. Carried out examinations confirmed increasing bone resorption during experimental postmenopausal osteoporosis.

PIŚMIENNICTWO

1. *Angielski S.*: Zarys biochemii klinicznej i analitycznej. PZWL, Warszawa 1982.
2. *Bielaczyc A., Oleński J., Herud B.*: Resorpcja korzeni po doświadczalnym przemieszczeniu zębów u szczura z niedoborem wapnia w ustroju. *Czas. Stomat.* 1997, 50, 192–201.
3. *Bowers G. N., McComb R.B.*: A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* 1966, 12, 70–80.
4. *Buchsbaum H.J.*: Menopauza PZWL Warszawa 1989.
5. *Cichocki T., Litwin J.A., Mirecka J.*: Kompendium Histologii. Collegium Medicum UJ, Kraków 1996.
6. *Clifford J., Tenenhouse A.*: Biochemical markers of bone turnover. A look at laboratory tests that reflect bone status. *Postgr. Med.* 1998, 4, 104.
7. *Galus K.*: Choroby metaboliczne kości. Med. Tour Press Int., Warszawa 1994.
8. *Gołębiewska M., Ciłko A., Franciszek R., Wolczyński S.*: Ocena metabolizmu kostnego u bezzębnych kobiet w wieku pomenopauzalnym. *Prot. Stom.* 2000, 50, 316–325.
9. *Grabowska Z.S., Rogowski F., Ciłko A.*: Wybrane markery przebudowy tkanki kostnej. *Czas. Stomat.* 1996, 49, 436–440.
10. *Hillman G.*: Fortlaufende photometrische Messung der sauren Prostataphosphatase – Aktivität. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 1971, 9, 273–274.
11. IFCC Methods for the Measurements of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 5, Method for Alkaline Phosphatase. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 83, 21, 731–748.
12. *Kowalczyk R., Bohatyrewicz A., Kowalik P.*: Radiologiczne objawy osteoporozy w żuchwie. *Czas. Stomat.*, 1997, 50, 424–428.
13. *Lees C. J., Ramsey H.*: Histomorphometry and bone biomarkers in *Cynomolgus* females: A study in young, mature, and old monkeys. *Bone*, 1999, 24, 25–28.

14. *Magnuson P.*: Human bone alkaline phosphatase isoforms. Linköping University Medical Dissertations No. 574.
15. *Marcinkowska-Suchowierska E., Lisawa A., Marowska J., Lorencewicz Z., Talalaj M., Brzozowski R., Lorenc R.*: Biochemiczne markery przebudowy kości i ich przydatność do diagnostyki osteoporozy. *Wiad. Lek.* 1992, 45, 647–654.
16. *Romognoli E., Minisola G., Carnevale V., Scillifoni A., Frusciante V., Aliberti G., Minisola S.*: Assessment of Serum Total and Bone Alkaline Phosphatase Measurement in Clinical Practice. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1998, 36, 163–168.

Otrzymano: 2001.08.24