

MANSUR RAHNAMA<sup>2</sup>, JADWIGA BŁONIAK<sup>1</sup>, STANISŁAW ZARĘBA<sup>1</sup>, WOJCIECH ŚWIĄTKOWSKI<sup>2</sup>

BADANIA WPŁYWU NIEDOBORU ESTROGENÓW NA POZIOM  
MANGANU W ZĘBACH I ŻUCHWIE SZCZURÓW PO OWARIEKTOMII

STUDY ON THE INFLUENCE OF ESTROGENS DEFICIENCY ON  
THE MANGANESE LEVEL IN THE TEETH AND MANDIBLE OF THE RATS  
AFTER OVARECTOMY

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Bromatologii  
Akademia Medyczna

20–081 Lublin, ul. Staszica 4

Kierownik: prof. dr hab. S. Zaręba

<sup>2</sup> Katedra i Klinika Chirurgii Stomatologicznej i Szczękowo-Twarzowej  
Akademia Medyczna

20–081 Lublin, ul. Karmelicka 7

Kierownik: prof. dr hab. T. Tomaszewski

*Wykonano badania poziomu manganu w zębach i żuchwie szczurów po chirurgicznym usunięciu jajników oraz po zastosowaniu estrogenowej terapii zastępczej u operowanych zwierząt. Niedobór estrogenów u samic po owariektomii spowodował obniżenie się zawartości manganu w analizowanych próbkach, a podawanie 17β-estradiolu szczurom z usuniętymi jajnikami zapobiegało utracie manganu zarówno z zębów, jak i z żuchwy.*

WSTĘP

Podstawową rolę w utrzymaniu odpowiedniej masy kostnej i stabilizacji obrotu kostnego u kobiet pełnią estrogeny. W okresie menopauzy oraz po operacyjnym usunięciu jajników (owariektomii) obniża się poziom tych hormonów, dochodzi do zmian osteoporotycznych w tkance kostnej i do rozwoju osteoporozy inwolucyjnej I typu. Etiopatogeneza tej choroby metabolicznej związana jest z zaburzeniem równowagi przebudowy kości – przewagą procesów resorpcyjnych nad osteogenezą.

Na poziomie komórkowym przejawia się to hamowaniem aktywności komórek kościogubnych (osteoklastów) oraz stymulacji komórek kościotwórczych (osteoblastów), które są pośrednio odpowiedzialne za ograniczenie sekrecji cytokin wpływających na wzrost obrotu kostnego (interleukin: Il-1 *alfa*, Il-1 *beta*, Il-6) oraz TNF [11].

Proces remodelacji tkanki kostnej, który zachodzi w ciągu całego życia osobniczego oraz szybkość obrotu kostnego wyjaśnia receptorowy mechanizm działania estrogenów. Receptory estrogenowe: ERα i ERβ uczestniczą również w procesie mineralizacji nowotworzących się komórek kostnych [17, 19]. Receptory te zidentyfikowano początkowo u zwierząt doświadczalnych, później u ludzi w tkance kostnej i zębach.

Stwierdzono, że znajdują się one w miążdze zębów lub/i na pograniczu miążgowo-zębinowym [5].

Zmiany osteoporotyczne w kościach wynikające z niedoboru estrogenów mają również bezpośredni wpływ na trwałość zębów [2]. Utrata masy kostnej może stwarzać ryzyko takich samych zmian w żuchwie i ma związek z utratą zębów u kobiet po menopauzie [6]. Zmiany złożonego mechanizmu działania estrogenów na kości w tym okresie, powodują zaburzenia w ich mineralizacji, które z kolei znajdują odzwierciedlenie w procesach resorpcja/osteogeneza [20]. Doświadczenie przeprowadzone z udziałem małp *Cynomolgus* poddanych zabiegowi owariektomii, pozwala częściowo wyjaśnić procesy fizjologiczne zachodzące w kości z udziałem biopierwiastków [20].

Część mineralna zębów, stanowiąca 70% ich masy zbudowana jest głównie z hydroksyapatytów zawierających w swoich zamkniętych strukturach jony mikropierwiastków, m.in.: Mn, Cu, Zn, Fe, B. Są one magazynowane w przypadku nadmiaru lub uwalniane do przestrzeni pozakomórkowych w okresie ich niedoboru w organizmie lub w czasie zaburzeń gospodarki mineralnej ustroju [3]. Niektóre pierwiastki śladowe (w tym mangan) mają istotne znaczenie w metabolizmie kości jako kofaktory specyficznych enzymów. Są niezbędne do optymalnego rozwoju macierzy kostnej i prawidłowej mineralizacji kości [16]. Mangan poza tym uczestniczy w syntezie glikoprotein i proteoglikanów, ważnych dla tworzenia zwartej struktury tkanki zębowej [10].

Celem pracy było prześledzenie, na modelu doświadczalnym, zmian zawartości manganu w zębach i żuchwie szczurów w stanie niedoboru estrogenów po owariektomii oraz po zastosowaniu u operowanych samic estradiolowej terapii zastępczej.

#### MATERIAŁ I METODYKA

Doświadczenie przeprowadzono na samicach szczurów rasy *Wistar*. Szczury uznane zostały za najodpowiedniejszy model zwierzęcy do obserwacji zmian osteoporotycznych po owariektomii. Zmiany metaboliczne zachodzące w tkance kostnej w warunkach niedoboru estrogenów są podobne u szczurów i u ludzi [1].

Samice szczurów o masie 250–300g poddano 2-tygodniowej adaptacji do warunków eksperymentalnych. Zapewniono im stałość warunków zewnętrznych i standardową dietę. Zwierzęta podzielono na 7 grup doświadczalnych liczących po 10 osobników w każdej.

1. CL – grupa kontrolna szczurów, zwierząt zdrowych
2. SH – grupa szczurów traumatyzowana zabiegiem operacyjnym (sham)
3. OV – grupa szczurów po usunięciu jajników (owariektomii)
4. OVO – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano *oleum pro iniectioe*, w celu zbadania wpływu podłoża oleistego badanego leku
5. OVH<sub>1</sub> – grupa zwierząt po usunięciu jajników, którym podawano 17 $\beta$ -estradiol w dawce 1,25  $\mu$ g (dawka dla jednego osobnika) dwa razy w tygodniu
6. OVH<sub>2</sub> – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano 17 $\beta$ -estradiol w dawce 12,5  $\mu$ g (dawka dla jednego osobnika) dwa razy w tygodniu
7. OVH<sub>3</sub> – grupa szczurów po usunięciu jajników, którym podawano 17 $\beta$ -estradiol w dawce 125,0  $\mu$ g (dawka dla jednego osobnika) dwa razy w tygodniu.

Samicom szczurów, u których wykonano zabieg usunięcia jajników, zastosowano przedoperacyjną osłonę antybiotykową. Czas trwania eksperymentu wynosił 7 tygodni. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta usypiano, dekapitowano i preparowano kości żuchwy, a następnie zęby sieczne. Zęby te uznano za najlepszy materiał doświadczalny, gdyż zachodzi w nich stała odnowa

tkanek twardych, posiadają one szeroki kanał korzeniowy i dużą masę miazgi, co zapewnia dobrą wymianę jonową. Miazga bowiem bierze udział w odżywianiu twardych tkanek zęba [7].

Kości żuchwy i zęby po dokładnym umyciu w wodzie destylowanej, wysuszeniu i zważeniu z dokładnością do 0,0001 g, poddano mineralizacji „na sucho” w temp. 450°C. Proces spopielenia przyspieszono za pomocą stężonego kwasu azotowego (HNO<sub>3</sub> 65% – Suprapur, firmy Merck), a popioły rozpuszczono w 15% wodnym roztworze kwasu chlorowodorowego (roztwór wykonano z 30% HCl – Suprapur, firmy Merck) i przeniesiono ilościowo do kolb miarowych o poj. 15 cm<sup>3</sup> przy użyciu wody dejonizowanej.

Oznaczenie zawartości manganu wykonano metodą płomieniową absorpcyjnej spektrometrii atomowej w aparacie firmy Pye Unicam, typ SP 192, stosując następujące parametry (14):

- długość fali analitycznej 279,5 nm
- prąd lampy 10 mA
- szerokość szczeliny 0,4 nm
- przepływ acetylenu 0,8 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>
- przepływ powietrza 5,0 dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>
- wysokość palnika 10 cm.

Wyniki poddano analizie statystycznej. Istotność różnic pomiędzy grupami wyznaczono na podstawie przedziałów ufności (NIR) wyznaczonych z analizy wariancji (ANOVA). Zawartość manganu w analizowanym materiale przedstawiono w tabelach, gdzie podano średnie arytmetyczne (M) i odchylenia standardowe (SD) dla poszczególnych grup doświadczalnych szczurów. Istotność różnic między grupami oznaczono kolejnymi literami alfabetu. Średnie różnią się istotnie statystycznie jeśli nie są oznaczone tą samą literą.

## WYNIKI

Poziom manganu w zębach i żuchwie szczurów przedstawiono w tabeli I i II.

W zębach zwierząt grupy kontrolnej (CL) stwierdzono średnio 36,95 µg manganu w 1 g tkanki, a w grupie (SH) zwierząt traumatyzowanych zabiegiem chirurgicznym 34,54 µg/g. Po owariektomii (OV) poziom manganu w siekaczach obniżył się do 28,49 µg/g a w grupie (OVO) wyniósł 29,78 µg/g. W obydwu przypadkach, w stosunku do grupy CL i SH, różnice były statystycznie istotne. W grupach doświadczalnych (OVH<sub>1</sub>-OVH<sub>3</sub>) gdzie szczurom po owariektomii podawano 17β-estradiol w dawkach kolejno: 1,25 µg, 12,5 µg, 125,0 µg (dawki na jednego osobnika) 2 razy w tygodniu, zawartość manganu w zębach zwierząt tych grup wahała się od 31,77 µg do 33,0 µg/g tkanki (wartości średnie). W porównaniu do poziomu tego mikroelementu w zębach szczurów po owariektomii, były to różnice statystycznie istotne.

Poziom manganu w kości żuchwy szczurów grupy kontrolnej (CL) wynosił średnio 21,22 µg/g tkanki, a w grupie zwierząt traumatyzowanych zabiegiem chirurgicznym (SH) – średnio 20,13 µg. Zawartości te nie różniły się istotnie. Po owariektomii (OV) zawartość manganu w żuchwie obniżyła się do 14,78 µg/g i do 15,98 µg/g w grupie (OVO).

Po zastosowaniu tzw. hormonalnej terapii zastępczej w grupach OVH<sub>1</sub>-OVH<sub>3</sub> poziomy manganu w kości żuchwy były niższe od zawartości tego mikroelementu w grupie kontrolnej (CL) i wynosiły kolejno 17,01 µg/g, 18,83 µg/g i 19,12 µg/g tkanki (wartości średnie). W stosunku do grupy po owariektomii (OV), różnice były statystycznie istotne.

Tabela I. Poziom manganu w zębach szczurów w badanych grupach ( $\mu\text{g/g}$ ).  
The level of manganese in rat teeth of the examined groups ( $\mu\text{g/g}$ ).

Badana grupa	Liczba zwierząt	Średnia M	Odch. Stand. SD	p*
CL	10	36,95	1,59	d
SH	10	34,54	1,17	c
OV	10	28,49	2,34	a
OVO	10	29,78	1,08	a
OVH <sub>1</sub>	10	31,77	2,62	b
OVH <sub>2</sub>	10	32,73	1,16	b
OVH <sub>3</sub>	10	33,00	1,27	b

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

Tabela II. Poziom manganu w żuchwie szczurów w badanych grupach ( $\mu\text{g/g}$ ).  
The level of manganese in rat mandible of the examined groups ( $\mu\text{g/g}$ ).

Badana grupa	Liczba zwierząt	Średnia M	Odch. Stand. SD	p*
CL	10	21,22	1,78	e
SH	10	20,13	0,68	de
OV	10	14,78	1,79	a
OVO	10	15,98	1,55	b
OVH <sub>1</sub>	10	17,01	0,47	b
OVH <sub>2</sub>	10	18,83	1,72	c
OVH <sub>3</sub>	10	19,12	0,16	cd

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

## DYSKUSJA

Pierwiastki śladowe, w tym również mangan, są niezbędne do prawidłowego rozwoju tkanki kostnej. Chociaż nie są głównymi składnikami budulcowymi kości i zębów, to jednak odgrywają ważną rolę w ich metabolizmie. Stwierdzono, że znaczenie manganu w tym procesie jest duże, ale do końca nie wyjaśnione.

Mangan wchodzi w skład złożonych struktur kryształów hydroksyapatytów [3]. Obecność tego mikroelementu stwierdzono w próbkach zębiny otrzymanych z zębów stałych, w których jego zawartość korelowała (dodatnio) z jonami Cu, Co i Ni [8]. Mangan wywiera również wpływ na biosyntezę proteoglikanów, które dzięki swojemu ujemnemu ładunkowi elektrycznemu, wiążą kryształy hydroksyapatytu z kolagenem. Obniżony poziom tego pierwiastka powoduje jakościowe zmiany w cząsteczkach białkowo-cukrowych [10].

Podobnie do jonów cynku, mangan może być modulatorem fosfatazy alkalicznej w ośrodkach przebudowy kostnej. W obecności jonów Mg może przejmować ich stymulującą rolę na ten enzym lub łącznie z jonami cynku wywierać podobne działanie zastępując w tym procesie jony magnezu. Nie może jednak zastępować funkcji cynku i magnezu jednocześnie [9].

Niska zawartość manganu i miedzi (dieta z niedoborom tych mikroelementów) stosowana przez dłuższy czas, może powodować także wolniejszą osteogenezę oraz spadek aktywności osteoklastów [17].

Wyniki z przeprowadzonego doświadczenia pozwalają stwierdzić, że niedobór estrogenów po owariektomii, powodujący obniżenie się poziomu manganu w zębach i żuchwie, może przyczynić się do ich demineralizacji. Związek niedoboru manganu w tkance kostnej z osteoporozą u ludzi potwierdziły również badania *Okano* [13].

Suplementacja manganu szczurom po owariektomii efektywnie hamowała utratę ich masy kostnej [15]. Oprócz wpływu na gospodarkę mineralną ustroju, brak estrogenów może zaburzać w badanych tkankach twardego narządu żucia również inne procesy metabolizmu kostnego.

Zastosowanie estrogenowej terapii zastępczej przez *Goldsteina* i wsp. [4] zapobiegało demineralizacji zębów i ich utracie, a w przeprowadzonym doświadczeniu podawanie  $17\beta$ -estradiolu szczurom po owariektomii ograniczyło utratę manganu zarówno z zębów jak i z żuchwy. Udowodniony korzystny wpływ hormonalnej terapii zastępczej na proces przebudowy kości [18], można więc rozszerzyć i powiązać z narządem żucia.

#### WNIOSKI

1. Niedobór estrogenów występujący po usunięciu jajników powoduje obniżenie się poziomu manganu w zębach i żuchwie samic szczurów.
2. Zastosowanie  $17\beta$ -estradiolu w hormonalnej terapii zastępczej u zwierząt po owariektomii, zapobiega utracie badanego pierwiastka z zębów oraz żuchwy i tym samym zmniejsza możliwość demineralizacji analizowanych struktur.

M. Rahnama, J. Błoniarz, S. Zaręba, W. Świątkowski

#### STUDY ON THE INFLUENCE OF ESTROGENS DEFICIENCY ON THE MANGANESE LEVEL IN THE TEETH AND MANDIBLE OF THE RATS AFTER OVARIECTOMY

#### Summary

Deficiency of the estrogens occurring after menopause or ovariectomy leads to osteopenia and osteoporosis. It was confirmed by noninvasive examinations of bones – skeleton, maxilla mandible and teeth. Demineralization of the hard tissues were connected with loss of calcium and phosphorus, however the role of microelements is not completely known (for example role of Mn).

The aim of the study was an attempt of explanation of manganese behavior in the structure of hard tissues of masticatory system when the level of estrogens was decreased. Experiment was realized on *Wistar* female rats. They were divided into seven following groups: CL – control, SH – sham operated, OV – after ovariectomy, OVO – ovariectomized which administered “*oleum pro injectione*”, OVH1 – OVH3 – ovariectomized which administered  $17\beta$ -estradiol in three doses: 1.25  $\mu\text{g}$ , 12.5  $\mu\text{g}$ , 125.0  $\mu\text{g}$  (dose on the rat) twice a week.

After ovariectomy the level of manganese in teeth as well as in mandible decreased in compared with control group. Differences were statistically significant. Administration of  $17\beta$ -estradiol of ovariectomized female rats caused increase of manganese content inconsiderable. These results may suggest that ovarian estrogens play an important role in mineralization of bones and teeth and in prophylaxis of postmenopausal osteoporosis.

## PIŚMIENNICTWO

1. Barlet J.P., Coxam V., Davicco M.J., Gaumet N.: Animal models of post-menopausal osteoporosis. *Reprod. Nutr. Dev.* 1994, 34, 221–236.
2. Birkenfeld L., Yemini M., Kase N.G., Birkenfeld A.: Menopause-related oral alveolar bone resorption: a review of relatively unexplored consequences of estrogen deficiency. *Menopause* 1999, 6, 129–133.
3. Golden D.C., Ming D.W.: Nutrient-substituted hydroxyapatites: synthesis and characterization. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 1993, 63, 657–664.
4. Goldstein F., Colditz G.A., Stampfer M.J.: Postmenopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *J. Am. Dent. Assoc.* 1996, 127, 370–377.
5. Hietala E.L., Larmas M., Salo T.: Localization of estrogen – receptor related antigen in human odontoblasts. *J. Dent. Res.* 1998, 77, 1384–1387.
6. Krall E.A., Garcia R.I., Dawson-Hughes B.: Increased risk of tooth loss in related to bone loss at the whole body, hip, and spine. *Calcif. Tissue Int.* 1996, 59, 433–437.
7. Królikowska-Prasał I., Czerny K., Majewska T.: *Ząb. Rozwój i morfologia*. Wydawnictwo s.c. „Cyto”, Lublin 1995.
8. Lappalainen R., Knuuttila M.: Atomic absorption spectrometric evidence of relationships between some cationic elements in human dentine. *Arch. Oral Biol.* 1982, 27, 827–830.
9. Leone F.A., Ciancaglini P., Pizauro J.M., Rezende A.A.: Rat osseous plate alkaline phosphatase: mechanism of action of manganese ions. *Biometals* 1995, 8, 86–91.
10. Liu A.C., Heinrichs B.S., Leach R.M. Jr.: Influence of manganese deficiency on the characteristics of proteoglycans of avian epiphyseal growth plate cartilage. *Poult. Sci.* 1994, 73, 663–669.
11. Marcinowska-Suchowierska E.: *Osteoporoza – diagnostyka, profilaktyka i leczenie*. PZWL, Warszawa 1999.
12. Ogawa S., Fujita M., Ishii Y. et al.: Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  pathways. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 21372–21379.
13. Okano T.: Effects of essential trace elements on bone turnover – in relation to the osteoporosis. *Nippon Rinsho* 1996, 54, 148–154.
14. Pinta M.: *Absorpcyjna spektrometria atomowa, zastosowanie w analizie chemicznej*. PWN, Warszawa 1997.
15. Rico H., Gomez-Raso N., Revilla M. et al.: Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2000, 90, 97–101.
16. Saltman P., Strause L.G.: The role of trace minerals in osteoporosis. *J. Am. Coll. Nutr.* 1993, 12, 384–389.
17. Strause L., Saltman P.D., Glowacki J.: The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats. *Calcif. Tissue Int.* 1987, 41, 145–150.
18. Vedi S., Purdie D.W., Ballard P., Bord S. et al.: Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long – term, high – dose estrogen therapy. *Osteoporos. Int.* 1999, 10, 52–58.
19. Vidal O., Kindblom L.G., Ohlsson C.: Expression and localization of estrogen receptor – beta in murine and human bone. *J. Bone Miner. Res.* 1999, 14, 923–929.
20. Yamada G., Nakamura S., Fukazaki K. et al.: Dysregulation of trace element composition in ovariectomized cynomolgus monkey bones. *Cell. Mol. Biol. (Noisy – le – grand)* 1998, 44, 1205–1213.