УДК 616.71-007

Захаров И.С., Ушакова Г.А., Колпинский Г.И., Вавин Г.В.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЁРОВ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В КОМПЛЕКСНОМ ПРОГНОЗИРОВАНИИ РЕЗОРБТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ КОСТНОЙ ТКАНИ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНЫМ ОСТЕОПОРОЗОМ

ГБОУ ВПО Кемеровская государственная медицинская академия, г. Кемерово

Резюме. *Целью представленной работы явилось определение роли маркёров оксидативного стресса в прогнозировании резорбтивных процессов костной ткани, ассоциированных с постменопаузальными остеопоротическими изменениями. В исследовании приняли участие 195 женщин постменопаузального периода. Результаты исследования продемонстрировали значимую роль дисбаланса между прооксидантной и антиоксидантной системами в развитии резорбтивных процессов костной ткани. Была создана модель прогнозирования вероятности остеопоротических изменений у женщин постменопаузального периода, которая может явиться дополнительным компонентом в комплексной оценке риска развития постменопаузального остеопороза.*

Ключевые слова. *Оксидативный стресс, резорбция костной ткани, постменопаузальный остеопороз.*

Zakharov I.S., Ushakova G.A., Kolpinskiy G.I., Vavin G.V.

USE MARKERS OXIDATIVE STRESS IN THE COMPREHENSIVE PREDICTION OF BONE RESORPTIVE TISSUE ASSOCIATED WITH POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS

Summary. *The aim of the present work was to determine the role of oxidative stress markers in the prediction of bone resorptive processes associated with postmenopausal osteoporotic changes. The study involved 195 postmenopausal women. Results of the study demonstrated a significant role imbalance between prooxidant and antioxidant systems in the development process of bone resorption. It established a model predicting the probability of osteoporotic changes in postmenopausal women, which could be an additional component in a comprehensive assessment of the risk of postmenopausal osteoporosis.*

Keywords. *Oxidative stress, bone resorption, postmenopausal osteoporosis.*

Введение. Постменопаузальный остеопороз является многофакторым заболеванием, в патогенетической концепции которого одно из ведущих мест занимает снижение уровня эстрогенов, возникающее после наступления менопаузы [6]. На фоне гипоэстрогении в организме происходят метаболические нарушения в различных системах, включая и костную. В течение репродуктивного периода у женщин наблюдается равновесие между костеобразованием и резорбтивными процессами. Однако после наступления менопаузы возникает смещение в сторону потери костной массы. В то же время, гипоэстрогенное состояние является не единственным звеном в механизме развития постменопаузального остеопороза.

Процесс резорбции кости зависит от активности остеокластов. Имеются работы, показывающие важное значение так называемых активных форм кислорода в стимулировании активности последних [5, 9, 10]. С увеличением возраста отмечается повышение концентрации проксидантных и снижение активности антиоксидантных агентов.

Среди прооксидантов ключевую роль играет конечный продукт перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА). К антиокислительным соединениям относятся ферментные (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза) и неферментные низкомолекулярные антиоксиданты (ретинолы, токоферолы, аскорбиновая кислота, флавоноиды) [2]. Избыточное накопление прооксидантных веществ, наряду со снижением эндогенных антиоксидантов, приводит к так называемому окислительному (оксидативному) стрессу и формированию патологических процессов. В связи с этим, вызывает интерес изучение роли маркёров оксидативного стресса в комплексном прогнозировании резорбции костной ткани, ассоциированной с постменопаузальным остеопорозом.

Цель исследования. Определить роль маркёров оксидативного стресса в прогнозировании резорбтивных процессов костной ткани, ассоциированных с постменопаузальным остеопорозом.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 195 женщин, которым проводилась двухэнергетическая рентгеновская абсорбциометрия (ДРА). Критериями включения явились: возраст 50 лет и старше, наличие естественной наступившей менопаузы, а так же согласие женщины на проведение двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, лабораторных тестов и обработку персональных данных. Критерии исключения были следующими: хирургическая менопауза; заболевания, приводящие к развитию вторичного остеопороза; курение; использование гормональной контрацепции, менопаузальной гормональной терапии и лекарственных средств, приводящих к развитию остеопоротических изменений; отсутствие согласия женщины на проведение исследования. Средний возраст лиц, вошедших в исследование, составил 65,5±10,2 лет.

Для изучения минеральной плотности костной ткани применялся костный денситометр Lunar-DPX-NT (GE Healthcare, Великобритания). Сканированию подвергались I–IV поясничные позвонки и шейка бедренной кости. Интерпретация результатов проводилась с использованием Т–критерия. Т–критерий (Т–score) соответствует количеству стандартных отклонений от средних значений минеральной плотности кости людей 20–30 летнего возраста. Если Т–критерий, располагается в диапазоне от −1 до −2,4 – говорят об остеопении, если −2,5 и ниже – об остеопорозе [11]. Верификация первичного (постменопаузального) остеопороза и исключение вторичного осуществлялось на основании клинических и анамнестических данных. После проведения двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии было выделено три когорты: лица с нормальными показателями МПК, женщины с остеопенией и пациентки, имеющие остеопороз. Все когортные группы были сопоставимы по возрасту, и длительности постменопаузального периода.

Помимо оценки МПК у обследованных определялся уровень дезоксипиридинолина мочи (DPD), отражающий интенсивность резорбтивных процессов костной ткани [4, 7], а также маркёры оксидативного стресса: малоновый диальдегид (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Дезоксипиридинолин мочи определялся на анализаторе IMMULITE® 2000 путём иммуноферментного анализа с использованием набора Pyrilinks-D. Оценивалась моча, собранная до 10 часов утра. Единицы измерения дезоксипиридинолина – нмоль DPD/ммоль креатинина.

Концентрация МДА в плазме крови исследовалась методом спектрофотометрии, основанным на оценке продукта реакции с тиобарбитуровой кислотой в кислой среде в присутствии ионов Fe^{2+} [1]. Единицы измерения МДА – мкмоль/л.

Активность СОД и каталазы эритроцитов оценивалась методом спектрофотометрии [3]. Расчёт проводили по формулам: активность СОД и каталазы (в %) = $((E_к – E_о) / E_к) \cdot 100$, где $E_о$ и $E_к$ – экстинции соответственно опытной и контрольной проб.

Исследование было одобрено этическим комитетом ГБОУ ВПО КемГМА Минздрава России. Статистическая обработка проводилась с применением программ StatSoft Statistica 6.1 и IBM SPSS Statistics 21. Нормальность распределения показателей определялась методом Колмогорова–Смирнова. Качественные признаки описывались с использованием процентных долей и стандартных ошибок долей. Количественные показатели описывались с помощью медианы и квартилей. Для определения статистической значимости различий между количественными признаками двух групп применялся U-критерий Манна-Уитни.

Создание прогностической модели проводилось стандартным методом бинарной логистической регрессии. Суждение о качестве созданной модели выносилось на основании величины площади под ROC–кривой (AUC, area under curve) с использованием ROC–анализа [8]. Для формирования модели применялось регрессивное уравнение: $y=a+b_1 \cdot X_1+b_2 \cdot X_2+\ldots+b_i \cdot X_i$, где y – зависимая переменная, принимающая два значения: 0 – Т-критерий выше –2,5; 1 – Т-критерий от –2,5 и ниже; a – константа; b_i – коэффициенты регрессии; X_i – переменные. Вычисление вероятности прогноза осуществлялось по формуле: $P=1/(1+e^{-y})$, где P – прогностическая вероятность, e – экспонента, приближенное значение которой равно 2,718. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение. После проведения рентгеновской остеоденситометрии распределение обследованных в зависимости от уровня минеральной плотности кости имело следующий характер: нормальные показатели МПК были определены у 24,6±3,1%, остеопения – у 45,7±3,6% и остеопороз у 29,7±3,3% обследованных.

У женщин, разделённых в зависимости от уровня минеральной плотности кости на три группы, проводилась оценка показателей МДА плазмы крови, СОД и каталазы эритроцитов (табл. 1).

Таблица 1

Показатели МДА, СОД и каталазы в зависимости от уровня МПК

Показатель	**I группа (нормальные показатели МПК) n=48**	**II группа (остеопения) n=89**	**III группа (остеопороз) n=58**
МДА, мкмоль/л	5,95 [5,2; 7,2]	8,1 [7,5; 8,8] (p_1=0,001)	9,35 [8,7; 11,7] (p_2 = 0,001)
СОД эритроцитов, %	39,95 [36,8; 42,3]	35,5 [33,7; 36,8] (p_1=0,001)	32,15 [29,9; 34,8] (p_2 = 0,001)
Каталаза эритроцитов, %	67,9 [64,55; 72,05]	64,5 [62,3; 66,2] (p_1=0,001)	55,65 [53,5; 59,4] (p_2 = 0,001)

p_1 – уровень статистической значимости различий между I и II группами
p_2 – уровень статистической значимости различий между II и III группами

Увеличение концентрации МДА способствует повышению активности остеокластов и приводит к усилению резорбции костной ткани. Об этом свидетельствуют показатели дезоксипиридинолина мочи: при нормальных значениях МПК DPD соответствовал 6,8 [4,85; 7,4], при остеопении – 7,5 [6,4; 8,4], при остеопорозе – 12,2 [9,3; 14,2] нмоль DPD/ммоль креатинина (p=0,001). Из приведённой таблицы видно, что статистически значимое повышение концентрации МДА, снижение активности СОД и каталазы наблюдается уже при начальных проявлениях потери костной массы (остеопении) и усугубляется при остеопорозе.

В результате полученных данных была разработана прогностическая модель оценки риска развития остеопоротических изменений с использованием маркёров окислительного стресса. На первом этапе были рассчитаны регрессионные коэффициенты (табл. 2).

Таблица 2

Регрессионные коэффициенты, с оценкой их значимости

Показатель	**B (коэффициент регрессии)**	**Стандартная ошибка**	**Wald (статистика Вальда)**	**p (уровень значимости)**
МДА	1,019	0,226	20,304	0,001
СОД	– 0,340	0,092	13,614	0,001
Каталаза	– 0,051	0,019	7,229	0,007
Константа	5,036	3,919	1,652	0,199

На основании приведённых данных видно, что чем ниже показатели активности СОД и каталазы и, чем выше концентрация МДА, тем более вероятен риск развития остеопоротических изменений.

Согласно статистике Вальда, в представленной модели наибольшая прогностическая значимость соответствует малоновому диальдегиду (Wald=20,304; p=0,001), затем по значи-

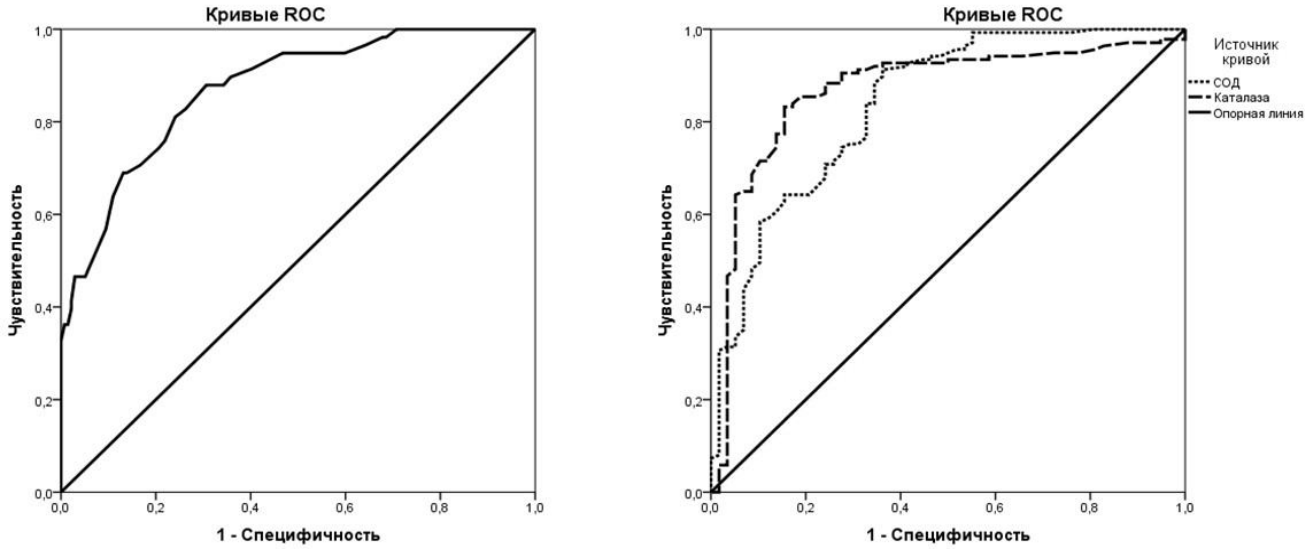
мости следует показатель активности супероксиддисмутазы (Wald=13,614; p=0,001) и каталазы (Wald=7,229; p=0,007).

После вычисления регрессионных коэффициентов было создано уравнение:

$$P\ (Y=1/\ X1,\ X2,\ X3) = \frac{1}{1+e^{-(5{,}036 + 1{,}019 \cdot X1 - 0{,}340 \cdot X2 - 0{,}051 \cdot X3)}}$$

где P – прогностическая вероятность развития постменопаузальных остеопоротических изменений; X_1, X_2 и X_3 – соответственно показатели концентрации МДА и активности СОД и каталазы.

Для изучения качества созданной модели проводилась оценка площадей под ROC–кривыми, AUC (рис. 1).



А Б

Рис. 1. ROC–кривые, сформированные для МДА (А), СОД и каталазы (Б).

Площади под ROC–кривыми оцениваемых предикторов имели следующие значения: для МДА AUC составила 0,871 [0,819; 0,924], для СОД AUC=0,839 [0,776; 0,902], для каталазы AUC=0,869 [0,809; 0,928]. Приведённые данные свидетельствуют о достаточно высоком качестве сформированной прогностической модели. При пороге классификации 0,35 чувствительность созданной модели составила 0,810 (81,0%), специфичность – 0,854 (85,4%).

Полученные результаты подтверждают роль дисбаланса между прооксидантной и антиоксидантной системами в активации резорбтивных процессов костной ткани, приводящих к развитию остеопоротических изменений у женщин постменопаузального периода.

Заключение. Проведённое исследование показало значимую роль маркёров оксидативного стресса в развитии резорбтивных процессов костной ткани. Разработанная модель дает возможность оценивать вероятность возникновения остеопоротических изменений у женщин постменопаузального периода и может служить дополнительным компонентом в комплексном прогнозировании развития постменопаузального остеопороза.

Литература:

1. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41–43.
2. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко. – Москва: «Медицина»; 1989. – 368 с.
3. Галактионова Л.П. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки / Л.П. Галактионова, А.В. Молчанов, С.А Ельчанинова. // Клин. лабораторная диагностика. – 1998. – № 6. – С. 10–14.

4. Захаров И.С. Биохимические маркёры в диагностике нарушений ремоделирования костной ткани при остеопорозе / И.С. Захаров, Г.И. Колпинский, Г.А. Ушакова, Г.В. Вавин // Вестник Авиценны. – 2013. – №4 (57). – С. 119–123.
5. Захаров И.С. Роль оксидативного стресса в формировании постменопаузального остеопороза / И.С. Захаров, Г.И. Колпинский, Г.А. Ушакова, Г.В. Вавин // Гинекология. – 2014. – № 1. – С. 41–43.
6. Медицина климактерия / Под ред. В.П. Сметник // Ярославль: ООО «Издательство Литера»; 2006. – 848 с.
7. Endres D.B. Biochemical markers of bone metabolism // J. Clin. Ligand Assay. – 1998. – V. 21. – No 2. – P. 89–256.
8. Hanley J.A., McNeil B.J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve / J.A. Hanley, B.J. McNeil // Radiology. – 1982. – V. 143. – No 1. – P. 29–36.
9. Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation / S. Srinivasan et al. // Ann N Y Acad Sci. – 2010 March. – V. 1192. – No 1. – P. 245–252.
10. The association between oxidative stress and bone mineral density according to menopausal status of Korean women / Y.J. Lee et al. // Obstetrics and Gynecology Science. – 2015. – V. 58. – No 1. – P. 46–52.
11. These are the Official Positions of the ISCD as updated in 2013. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.iscd.org/official-positions/2013-iscd-official-positions-adult (accessed April 24, 2014).