

Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů

H. ŽIVNÁ¹, P. ŽIVNÝ², I. GRADOŠOVÁ², K. ŠVEJKOVSKÁ¹, S. HUBENÁ²,
O. ŽIVNÝ¹, V. PALIČKA²

¹Radioizotopové laboratoře a vivárium, UK Praha, LF v Hradci Králové,

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové, ³CCBR Czech, a. s., Pardubice

SOUHRN

Živná H., Živný P., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Živný O., Palička V.: **Akutní odraz operačního zásahu na metabolismus kostí u potkanů**

Cíl: Cílem studie bylo sledovat vliv operačního zákroku na metabolismus a fyzikální stav kostí.

Materiál a metody: Samci potkanů kmene Wistar byli náhodně rozděleni do dvou skupin po 6 zvířatech s počáteční hmotností 373 ± 6 g. Byli živeni standardní laboratorní dietou a pitnou vodou *ad libitum*. Skupina KON: intaktní; skupina OPE: potkani 18 hodin po břišní operaci – částečné hepatektomii. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty. V séru jsme stanovili triacylglycerol (mmol/l), leptin (pg/ml), glukózu (mmol/l) a inzulin (ng/ml). Poté *post mortem* jsme změřili densitu kostního minerálu (BMD; g/cm²). V homogenátu kosti (150 mg tkáň/1,5 ml fosfátového pufru) jsme stanovili markery kostního obratu: osteokalcin (OC), prokolagen I N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA (μg/l). Femury byly kontrolované zlomeny tříbodově ve středu diafýzy a v oblasti krčku femuru.

Výsledky: U potkanů nebyly prokázány rozdíly mezi kontrolní a experimentální skupinou v BMD (páteř $p = 0,623$; ocas $p = 0,120$; femur $p = 0,143$), ani v tloušťce femuru, ani mezi silami nezbytnými ke zlomení diafýzy ($p = 0,171$) i krčku femuru ($p = 0,644$). Po operačním zákroku došlo k poklesu triglyceridémie ($p < 0,001$) a k vzestupu glykémie ($p < 0,001$). V homogenátu kostí po operaci byl zvýšen osteokalcin ($p = 0,033$) a naopak snížen PINP ($p = 0,031$) a CTX ($p = 0,010$).

Závěry: Naše výsledky ukazují, že abdominální chirurgický zákrok po velmi krátkém čase není schopen ovlivnit densitu kostního minerálu a biomechanické vlastnosti kosti (odolnost k fraktuře), ale je ovlivněn kostní metabolický obrat pravděpodobně pooperační imobilitou, stresem a změnami v příjmu potravy.

Klíčová slova: kost, minerální densita, metabolický obrat, fraktura, operační zákrok, potkan

SUMMARY

Živná H., Živný P., Gradošová I., Švejkovská K., Hubená S., Živný O., Palička V.: **The influence of abdominal surgery (partial hepatectomy) on bone status in male Wistar rats**

Aim: The aim of the study was to assess the influence of abdominal surgery (partial hepatectomy) on bone metabolic turnover and bone biomechanical properties.

Methods: Male Wistar rats were divided into 2 groups (6 rats in each group, body weight 373 ± 6 g). The rats were fed with standard diet and tap water *ad libitum*. Intact rats were in the control group (KON). The other group (OPE) comprised rats 18 hours after abdominal surgery (partial hepatectomy). The rats were sacrificed by exsanguination from the abdominal aortic bifurcation. Concentrations of triglycerides (mmol/L), leptin (pg/mL), glucose (mmol/L) and insulin (ng/mL) were estimated in sera. Then *post mortem* bone mineral density (BMD) was measured with dual energy X-ray absorptiometry (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA). The proximal caudal vertebrae and femurs were extracted from the animals and broken in a controlled manner using a biomechanical testing device (Martin Kosek & Pavel Trnecká, Hradec Kralove, Czech Republic). Bone homogenate was analyzed for osteocalcin, pro-collagen type I N-terminal propeptide (PINP) and carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) by EIA (pg/mL).

Results: There were no significant differences between the KON and OPE groups in BMD (spine $p = 0,623$; tail $p = 0,120$; femur $p = 0,143$), as well as in femur size (thickness) and strength needed for femur diaphysis ($p = 0,171$) and neck fracture ($p = 0,644$). Triglyceride levels were decreased ($p < 0,001$) and glucose levels increased ($p < 0,001$) in the OPE group. Osteocalcin levels ($p = 0,033$) in bone homogenate were increased, but PINP and CTX levels were decreased ($p = 0,031$; $p = 0,010$) in the OPE group.

Conclusions: The findings suggest that abdominal surgery in extremely short time is not able to influence BMD and bone biomechanical properties. However, bone metabolic turnover is influenced, presumably by immobility, stress and changes in food consumption.

Keywords: bone, mineral density, metabolic turnover, fracture, surgery, rat

Osteologický bulletin 2011;16(4):137–140

Adresa: Doc. MUDr. Helena Živná, CSc., UK v Praze, LF v Hradci Králové, Radioizotopové laboratoře a vivárium, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové, e-mail: zivna@lfhk.cuni.cz

Došlo do redakce: 1. 11. 2011

Přijato k tisku: 30. 12. 2011

Úvod

V běžné lékařské praxi je nutné provádět chirurgické zákroky, po kterých nastává stresová reakce organismu na operační zákrok. Vliv jaterního poškození na vznik osteoporózy a na riziko fraktur je znám, jedná se ale o chronický, dlouho se vyvíjející stav, například pacienti s primární biliární cirhózou mají zvýšené riziko zlomenin [1], dále též pacienti s hemochromatózou nebo alkoholickým poškozením jater [2]. Jaterní osteodystrofie je metabolické kostní onemocnění, vyskytující se ve spojitosti s chronickým jaterním onemocněním. Dochází k vývoji stavu, kdy se jedná o kombinaci osteoporózy s osteomalácií.

Zajímalo nás, jestli i jeden akutní zásah do organismu, operace s odstraněním části jaterní tkáně, se bude odrážet ve změněném metabolismu kostní tkáně.

V kostech a zubovíně se nalézá nekolagenní bílkovina osteokalcin, která je produkována osteoblasty za přítomnosti vitamínu K. Proto bývají koncentrace osteokalcinu využívány jako ukazatel, stanovující intenzitu kostní formace aktivními osteoblasty [3]. Bylo dokonce prokázáno, že vysoké sérové koncentrace osteokalcinu relativně velmi dobře korelují s nárůstem hustoty kostního minerálu, tzv. BMD (Bone Mineral Density), stejně tak s mechanickou stimulací [4], kdy v extracelulární hmotě pod proliferujícími buňkami se

prokazuje osteokalcin, což ukazuje na aktivní kostní formaci [5].

N-terminalní propeptid kolagenu typu I (PINP) je ukazatelem intenzity metabolismu kolagenu před jeho zabudováním do kostní tkáně, čímž opět vypovídá o kostní matrix. C-terminalní crosslinking telopeptid kolagenu typu I (CTX) se naopak uvolňuje proteolytickými procesy z kolagenu typu I při jeho odbourávání, a je tedy citlivým ukazatelem kostní resorpce [6].

Položili jsme si otázku, jestli na jednorázový chirurgický výkon neodpovídá i kostní tkáň, se kterou jsou spojovány spíše představy velice pomalých odpovědí. Sledovali jsme jak změny kostní minerální hustoty a biomechanických vlastností kostí, tak i lokální ukazatele kostního metabolického obratu: osteokalcin, PINP a CTX.

Materiál a metodiky

Potkani byli chováni ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK HK). Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové (č.j. 3545/2006-30/300 a 8593/2008-30). Byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR), kteří byli rozděleni do dvou skupin po 6 zvířatech. Potkani byli umístěni v plastových klecích a chováni za standardních podmínek, živěni standardní laboratorní dietou a pitnou vodou *ad libitum*.

Skupina KON: intaktní; skupina OPE: potkani 18 hodin po břišní operaci – částečné hepatektomii. Zvířata byla usmrcena odběrem krve z bifurkace břišní aorty v celkové anestezii parami éteru ve funkční digestoři.

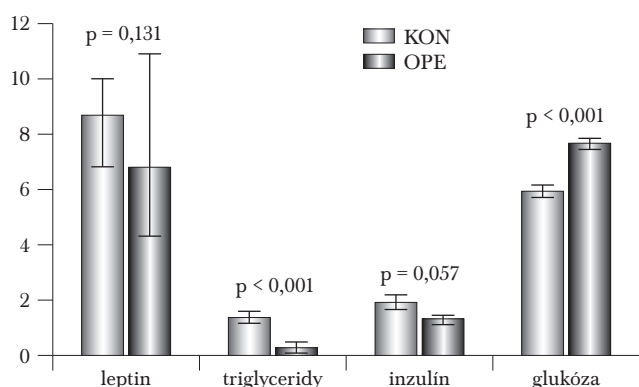
V séru byly stanoveny koncentrace triacylglycerolu (mmol/l), dále leptinu (pg/ml), glukózy (mmol/l) a inzulínu (ng/ml).

Poté *post mortem* byla u potkanů změřena BMD (g/cm²) dvouenergií absorpční spektrofotometrií v Osteocentru Fakultní nemocnice Hradec Králové. BMD v oblasti bederních a ocasních obratlů a v oblasti femuru byla počítačově vyhodnocena pomocí příslušného programu (DXA, Hologic, Waltham, MA, USA).

Následně byly vyňaty z potkanů ocasní obratle a pravé femury. S využitím homogenizačního přístroje MagNA Lyser

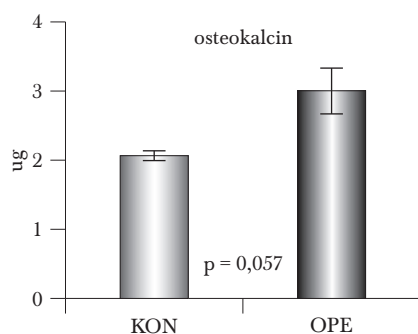
Graf 1

Sérové hodnoty leptinu (pg/ml), triglyceridů (mmol/l), inzulínu (ng/ml) a glukózy (mmol/l)



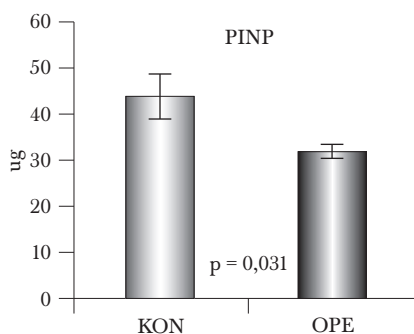
Graf 2

Koncentrace osteokalcinu v homogenátu kosti (µg/l)



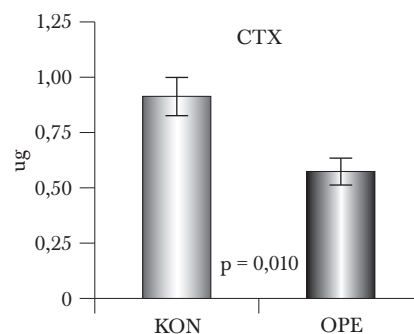
Graf 3

Koncentrace prokolagen 1 N-terminalního propeptidu v homogenátu kosti (µg/l)



Graf 4

Koncentrace karboxy-terminální kolagen crosslinks v homogenátu kosti (µg/l)



instrument (Roche Applied Science, Německo) jsme homogenizovali části ocasních obratlů (150 mg tkáně/1,5 ml fosfátového pufru). V získaném supernatantu kostního homogenátu jsme stanovili koncentrace markerů kostního obratu – osteokalcin (OC), prokolagen 1 N-terminální propeptid (PINP) a karboxy-terminální kolagen crosslinks (CTX) metodikou EIA ($\mu\text{g/l}$; Uscnlife Sciences & Technology Co., Ltd., Čína).

Femury byly kontrolovaně zlomeny v testovacím přístroji (Martin Košek & Pavel Trnečka, Hradec Králové) třibodově ve středu diafýzy a v oblasti krčku femuru tlakem na hlavici. O metodice bylo již dříve referováno [7].

Statistická analýza byla provedena s využitím software “SigmaStat 3.1” Jandel Scientific®, San Rafael, CA, USA. Metodami One Way Anova, Holm-Sidak Metod. Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ střední chyba nebo jako medián (a percentily 25%–75%), hodnoty statistické významnosti jsou uvedeny v tabulkách i grafech.

Výsledky

U potkanů nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v BMD mezi sledovanými skupinami (tab. 1).

Rozdíly v délce femuru ani jeho tloušťce ve středu diafýzy nebyly statisticky významné. Vyhodnocením síly nutné ke zlomení diafýzy i krčku femuru jsme nenalezli žádné statisticky významné rozdíly mezi sledovanými skupinami (tab. 2).

Sérové koncentrace leptinu před operačním zákrokem a po něm nebyly statisticky významné.

Po operačním zákroku došlo za 18 hodin k významnému poklesu triglyceridémie. Za 18 hodin po provedení částečné hepatektomie byl zjištěn v séru nevýznamný pokles koncentrací inzulinu, provázený statisticky významným vzestupem glykémie (graf 1).

Ke statisticky významnému vzestupu osteokalcinu v homogenátu kostní tkáně došlo za 18 hodin po operačním zákroku (graf 2).

Za 18 hodin po částečné hepatektomii jsme v homogenátu kostní tkáně zjistili statisticky významný pokles koncentrací PINP (graf 3).

V homogenátu kostní tkáně získaném za 18 hodin po provedení částečné hepatektomie jsme prokázali pokles koncentrací CTX (graf 4).

Diskuze

V úvodu jsme si položili otázku, zda na jednorázový chirurgický výkon odpovídá i kostní tkáň, se kterou jsou spojovány spíše představy velice pomalých odpovědí.

Po akutním operačním zásahu do organismu neočekáváme některé změny, které se nejspíše vyvíjejí delší čas. Přesto jsme po operačním zákroku u potkanů sledovali denzitometrické vyšetření kostí i změny biomechanických vlastností kostí. Spíše jsme očekávali diskrétní změny vybraných

ukazatelů kostního obratu, které jsme stanovili v homogenátu kostní tkáně: osteokalcin, PINP a CTX. Dali jsme přednost jejich stanovení v kostní tkáni před stanovením v séru. Předpokládáme, že budou přesněji odrážet děje v kostní tkáni než sérové hodnoty.

Po operačním zákroku potkani omezili svůj pohyb, spali schoulení a zjevení, spotřeba diety klesla přibližně na třetinu (23 g vs. 7 g diety na jednoho potkana a den). Jedná se tedy o komplexní reakci potkana na stres, jako je bolest, ztráta části jaterní tkáně, omezený příjem potravy. Tento stav netrvá déle než 24 hodin po operaci, potkan se začíná zotavovat, vymizí zjevení srsti a antalgické postavení těla. Je zahájeno stadium reparace a potkan se vrací k běžné pohybové aktivitě s příjmem plné dávky krmné diety.

Při sledování metabolických ukazatelů za 18 hodin po operaci jsme našli statisticky významný vzestup glykémie, což může být navozeno stresem [8], vyplavením kortikoidů, ale též poklesem hladin inzulinu, i když v tomto experimentu statisticky nevýznamným. Dále jsme zjistili významný pokles triglyceridémie, což nejspíše bylo v důsledku zahájení jaterní regenerace, kdy jsou tuky z periferie transportovány do jaterní tkáně [9].

Nevýznamné změny sérového leptinu svědčí o faktu, že pooperační snížení příjmu potravy není zprostředkováno leptinem, přestože údaje z literatury hovoří o jeho vlivu. Například Patterson-Buckendahl se spoluautory prokázali, že chronická imobilizace vedla k poklesu leptinu [10]. Role leptinu je ve svém vlivu na kostní tkáň nejednoznačná. Samotný leptin je schopen stimulovat osteoblasty a inhibovat osteoklasty, ale svými centrálními účinky přes sympatické neurony hypothalamu navozuje opačné děje v kostních buňkách [11]. Děje komplikuje antagonistu leptinu – neuropeptid Y, který lokálně tlumí osteoblasty a zároveň snižuje koncentrace osteokalcinu [12].

U potkanů 18 hodin po operačním zákroku jsme neprokázali rozdíly v BMD mezi sledovanými skupinami. Je zná-

Tabulka 1
DEXA u potkanů na konci pokusu (g/cm^2)

	R1 – páteř	R2 – ocas	R3 – femur
KON	$0,207 \pm 0,006$	$0,181 \pm 0,002$	$0,160 \pm 0,005$
OPE	$0,193 \pm 0,003$	$0,195 \pm 0,008$	$0,175 \pm 0,008$
Stat. význ.	$P = 0,623$	$P = 0,120$	$P = 0,143$

Tabulka 2
Délka a průměr pravého femuru (mm). Síly nutné ke zlomení diafýzy a krčku femuru (N)

	Délka (mm)	Průměr (mm) zlomení (N)	Síla 3B krčku (N)	Síla zlomení
KON	$34,24 \pm 0,32$	$3,18 \pm 0,04$	149 ± 7	129 ± 8
OPE	$34,43 \pm 0,5$	$3,16 \pm 0,08$	152 ± 10	134 ± 12
Stat. význ.	$P = 0,682$	$P = 0,266$	$P = 0,171$	$P = 0,644$

mo, že fyzická aktivita má pozitivní vliv na BMD [13], ale v našem experimentu se jednalo o krátkodobé omezení pohybu po operaci, které se nemohlo na výsledcích BMD odrazit. Burkovskaya se spoluautory prokázali vliv na BMD u myši teprve po 3 týdnech imobilizace provázené progresivní demineralizací kostí [14]. Pokles BMD u lidí byl prokázán též po cévní mozkové příhodě, ale až po roce od začátku onemocnění a koreloval s tíží počátečního stupně parézy [15].

Biomechanické vlastnosti femurů nebyly ovlivněny 18 hodin po operačním zákroku. Změny biomechanických vlastností kostí – stresové fraktury – byly nalézány i u mladých lidí, velmi fyzicky aktivních. Toto zvýšené riziko ke stresovým frakturám se týkalo spíše těch, kteří po cvičení měli vyšší pokles tělesné hmotnosti, měli nižší celkové BMD a byli signifikantně nižšího vzrůstu [16].

Z literatury je známo, že vzestup sérového osteokalcinu ukazuje na aktivitu osteoblastů a kostní novotvorbu [17], jako jsou například stavy několika dnů po fraktuře kosti [18]. Ke statisticky významnému vzestupu osteokalcinu v homogenátu kostní tkáně došlo za 18 hodin po operačním zákroku, naopak pokles osteokalcinu prokázali Patterson-Buckendahl se spoluautory po stresovém podnětu – imobilizaci [10]. Pokles osteokalcinu v pooperační fázi 24 hodin po břišní operaci u lidí našel také Napal se spoluautory [19]. Můžeme se domnívat, že diskrepance výsledků může být způsobena místem, ze kterého byl osteokalcin izolován. V našem experimentu jsme ho získali přímo z kostní tkáně, dále mohla být snížena jeho clearance ztrátou jaterní tkáně.

Je známo, že s rostoucí fyzickou aktivitou roste kostní metabolismus, tj. osteokalcin, karboxyterminální propeptid prokolagenu typu I (PICP) a karboxyterminální telopeptid kolagenu typu I (ICTP) [13]. Za 18 hodin po částečné hepatektomii jsme v homogenátu kostní tkáně zjistili statisticky významný pokles koncentrací PINP a CTX. Jestli má na tomto poklesu CTX podíl imobilizace potkanů po operaci nelze říci s jistotou, ale Tomiya se spoluautory potvrdil u potkanů, že imobilizace ocasu vede ke zvýšené exkreci CTX a kyselých fosfatáz močí, k poklesu sérového prokolagenu C – peptidu II již v časně fázi pokusu [20].

Závěr

Naše výsledky ukazují, že abdominální chirurgický zákrok po velmi krátkém čase není schopen ovlivnit denzitu kostního minerálu a biomechanické vlastnosti kosti, tedy odolnost k fraktuře, ale je ovlivněn kostní metabolický obrát pravděpodobně pooperační imobilitou, stresem a změnami v příjmu potravy.

Všechny prezentované výsledky bude nutné potvrdit na jiných chirurgických zákrocích u potkanů a vyloučit případný vliv redukované jaterní tkáně.

Nekomplikovaný chirurgický zákrok jistě nezasáhne do dalšího života lidí s osteoporózou, ale u větších operačních zákroků by se nemělo zapomínat na možnost zhoršení stavu kostí u těchto již dříve postižených pacientů.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

Literatura:

1. Wariaghli G, Mounach A, Achemlal L et al. Osteoporosis in chronic liver disease: a case-control study. *Rheumatol Int* 2010;30:893–899.
2. Isaia G, Di Stefano M, Roggia C, Ardissoni P, Rosina F. Bone disorders in cholestatic liver diseases. *Forum (Genova)* 1998;8:28–38.
3. Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol* 1998; 18:178–190.
4. Jagodzinski M, Drescher M, Zeichen J et al. Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Eur Cell Mater* 2004;7:35–41.
5. Kobayashi ET, Hashimoto F, Kobayashi Y et al. Force-induced rapid changes in cell fate at midpalatal suture cartilage of growing rats. *J Dent Res* 1999;78:1495–1504.
6. Herrmann M, Seidel MJ. The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* 2008;393:57–75.
7. Gradosova I, Zivna H, Svejkskova K et al. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 2011;66:606–610.
8. Dias JP, Couture R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 2011; doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x.
9. Blaha V, Simek J. Development of metabolic parameters in the early phases of liver regeneration. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove Suppl* 1995;38:37–55.
10. Patterson-Buckendahl P, Pohorecky LA, Kvetnansky R. Differing effects of acute and chronic stressors on plasma osteocalcin and leptin in rats. *Stress* 2007;10:163–172.
11. Włodarski K, Włodarski P. Leptin as a modulator of osteogenesis. *Ortop Traumatol Rehabil* 2009;11:1–6.
12. Igwe JC, Jiang X, Paic F et al. Neuropeptide Y is expressed by osteocytes and can inhibit osteoblastic activity. *J Cell Biochem* 2009;108:621–630.
13. Jarfelt M, Fors H, Lannering B, Bjarnason R. Bone mineral density and bone turnover in young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Endocrinol* 2006;154:303–309.
14. Burkovskaya TE, Frontasyeva MV, Gundorina SF. Kinetics of elemental content changes of bone tissue of mice during evolution under hypokinetic stress. *Biol Trace Elem Res* 1994;43–45:315–322.
15. Jørgensen L, Jacobsen BK. Functional status of the paretic arm affects the loss of bone mineral in the proximal humerus after stroke: a 1-year prospective study. *Calcif Tissue Int* 2001;68:11–15.
16. Armstrong DW 3rd, Rue JP, Wilckens JH, Frassica FJ. Stress fracture injury in young military men and women. *Bone* 2004;35:806–816.
17. Shaw DT, Rozeboom DW, Hill GM et al. Impact of supplement withdrawal and wheat middling inclusion on bone metabolism, bone strength, and the incidence of bone fractures occurring at slaughter in pigs. *J Anim Sci* 2006;84:1138–1146.
18. Ohishi T, Takahashi M, Kushida K et al. Changes of biochemical markers during fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998;118:126–130.
19. Napal J, Amado JA, Riancho JA et al. Stress decreases the serum level of osteocalcin. *Bone Miner* 1993;21:113–118.
20. Tomiya M, Fujikawa K, Ichimura S et al. Skeletal unloading induces a full-thickness patellar cartilage defect with increase of urinary collagen II CTX degradation marker in growing rats. *Bone* 2009 Feb;44:295–305.