

І.Г. Літовка, О.С. Костюченко

Ремоделювання кісткової тканини у молодих і дорослих щурів за умов аліментарної депривації

Изучено влияние моделированной в течение 28 сут алиментарной депривации на процессы физиологического ремоделирования костной ткани у 3- и 9-месячных крыс-самцов линии Вистар. Исследовано 4 группы животных: I, III – контроль, II, IV – режим ограничения калорийности пищи на 40 % относительно полноценного рациона для каждой возрастной группы. Показано повышение концентрации мелатонина, гликозаминогликанов сыворотки крови и активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови и костной ткани в 1,4 и 1,2 раза соответственно при алиментарной депривации у молодых крыс. У взрослых крыс выявлено снижение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови после алиментарной депривации. Экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста -1 у животных обеих исследуемых групп практически не менялась. Сделан вывод о том, что алиментарная депривация изменяет биохимические маркеры ремоделирования костной ткани у молодых животных, в то время как у взрослых животных они были незначительными.

ВСТУП

Фізіологічний процес розвитку кісткової тканини включає три основних періоди, а саме: I – формування кісткової маси у періоді онтогенезу, II – досягнення піку кісткової маси, III – вікова інволюція структури та функції кісток. В онтогенезі кожного виду ссавців відбувається генетично зумовлений процес закладки хрящового кістяка, поступове насичення його мінеральними компонентами та формування кісткової тканини. З часом процес формування кістяка припиняється і змінюється процесом фізіологічного ремоделювання [2, 7, 13, 14].

Дослідження останніх років показали, що у періоді формування кісткової маси та інволюції особливу роль відіграють декілька факторів. Серед них слід відзначити спадковість (сімейний фактор), повноцінне харчування, руховий фенотип, екологічні впливи навколишнього середовища [6, 9–12]. Відомо, що зниження калорійності їжі подовжує тривалість життя і знижує

інтенсивність енергетичного метаболізму. Численні дослідження було проведено в основному на дорослих особинах. А як впливає аліментарна депривація на кісткову систему молодих тварин ретельно не досліджувалося.

Метою нашої роботи було зіставлення впливу обмеженого харчування на показники фізіологічної регенерації кісткової тканини у молодих і дорослих щурів.

МЕТОДИКА

Досліди проведено у весняний період протягом 28 діб на 32 щурах-самцях лінії Вистар віком 3 і 9 міс на початок експерименту. Щури контрольних груп (I і III) перебували за стандартних умов віварію. Для тварин II і IV груп було застосовано класичну модель обмеження калорійності кормів на 40 % відносно повноцінного раціону для 3-місячних тварин – 20 г, 9-місячних – 25 г [15]. Тобто вміст усіх інгредієнтів, що входили до раціону, було знижено на 40 %, у тому числі необхідних

© І.Г. Літовка, О.С. Костюченко

для побудови скелета мінеральних компонентів і вітамінів. Тварини цих груп мали вільний доступ до води. Всі маніпуляції проводили з виконанням міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин.

У щурів щотижня натщесерце реєстрували масу тіла кожної особини. Загальний стан тварин та інтенсивність метаболізму кісткової тканини контролювали за допомогою фізіологічних, біохімічних і біофізичних методів дослідження.

Матеріалом для досліджень були свіжо-видалені стегнові кістки, печінка та сироватка крові, які одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини досліджували за допомогою спектрофотометричних, імуноферментних методів і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). У сироватці крові визначали концентрацію мелатоніну за стандартними наборами реактивів (фірми “Buhlmann”, Швейцарія), у кістковій тканині та сироватці крові – показники формування кісткової тканини: активність лужної фосфатази (ЛФ; КФ 3.1.3.1, реактиви фірми “Лахема”, Чехія) та її кістковий ізофермент. Крім того вивчали показники резорбції кісткової тканини: загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ; КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентну кислоту фосфатазу (ТРКФ; реактиви фірми “Лахема”, Чехія), концентрацію глікозаміногліканів у сироватці крові за методом Кляцкіна [4].

Рівень експресії гена інсуліноподібного фактора росту-1 (ІПФР-1) визначали у гомогенаті печінки. Для цього 20 мг печінки гомогенізували у 375 мл розчину “Рибозоль-А”. По закінченні процедури проби зберігали при -70°C до проведення ПЛР.

Ген GAPDH (від англ. glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase) був маркером (внутрішній контроль рівня експресії мРНК). Для виділення РНК і видалення слідів геномної ДНК у зразках використовували набори “Рибозоль” (“AmpliSens”,

Росія) та 1 U RNase-free DNase (“Sigma”, США) відповідно. Реакцію оберненої транскрипції проводили з використанням стандартних наборів “Реверта-L-100” (“AmpliSens”, Росія). Кількість специфічної РНК представляли як добуток площі смуги на інтенсивність її світіння за допомогою програми “BioTestColor”. Рівень експресії гена розраховували як відношення кількості специфічної РНК до числа маркерної GAPDH-РНК у тому самому зразку та представляли в умовних одиницях.

Цифрові результати обробляли з використанням пакета програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excel 2003. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як показали проведені дослідження, маса тіла 3-місячних щурів контрольної групи збільшувалася протягом усього експерименту. Відносний приріст маси тіла тварин цієї групи за перший, другий, третій і четвертий тижні становив 10,7, 23,1, 11,7 і 14,1% відповідно. Загалом за 28 діб цей показник сягав 73,8 % відносно вихідних значень (рис. 1).

Маса тіла у молодих щурів II групи змінювалася дещо по-іншому. За перший тиждень вона знизилася на 3,2 % порівняно з вихідними значеннями. Протягом наступних двох тижнів відносний приріст маси тіла становив 13,4 і 10 % відповідно, за четвертий тиждень – 4,6 %.

У цілому, у тварин II групи з аліментарною депривацією відносний приріст маси тіла був значно нижчим і становив 26,4 % порівняно з вихідними значеннями. Таким чином, найбільша втрата маси спостерігається за перший тиждень періоду обмеження харчування за калорійністю та масою. Згодом поступово втрата маси тіла припиняється і відзначається її повільне

підвищення. Різниця між відносним приростом маси у контрольних 3-місячних щурів і тварин такого самого віку в умовах модельованої аліментарної депривації становила 47 %.

Щотижневі зміни маси тіла 9-місячних контрольних щурів були незначними. За перший тиждень відносний приріст маси становив 1 %, за другий і третій тижні – приблизно 3 % (щотижнево). За четвертий тиждень маса тіла збільшилася на 0,4 %. Загалом за чотири тижні відносний приріст маси тіла становив 7,5 % (див. рис. 1).

Обмеження раціону харчування у щурів IV групи супроводжувалося щотижневим зниженням маси тіла. За перший, другий, третій і четвертий тижні вона знизилася на 2,6, 1,2, 1,2, 0,14 % відповідно. За 28 діб експерименту маса тіла досліджуваних тварин знизилася на 2,8 % відносно вихідних значень.

Маса стегнових кісток тварин обох досліджуваних груп залишалася стабільною відносно контролю. Таким чином, під час часткового обмеження раціону не спостерігали прямої кореляції між зменшенням загальної маси тіла та масою кісткової тканини у досліджуваних тварин усіх груп.

У деяких тварин, що ростуть протягом всього життя, кісткова тканина постійно змінюється за формою, збільшується в

довжині та діаметрі. Основні клітини кісткової тканини, остеобласти та остеокласти, одночасно є на зовнішній і внутрішній поверхнях кістки. Це забезпечує можливість як періостального, так і ендостального росту кісткової тканини. У ранньому віці збільшення маси та розмірів кістки поєднується з її формуванням. Усі ці процеси відбуваються одночасно, визначаючи форму та розмір кожної кістки. У період росту і розвитку скелета формування здійснюється інтенсивніше, ніж резорбція. Обидва процеси на ранніх етапах постнатального онтогенезу мають набагато більші швидкості, ніж у дорослому віці, коли відбувається лише заміна застарілих елементів, тобто здійснюється процес ремоделювання. У скелеті, який досяг максимальної маси і тільки ремоделюється, формування і руйнування зазвичай врівноважені [11]. Швидкість резорбції починає переважати в період вікової інволюції, коли істотно змінюється гуморальна регуляція проліферації та нервова регуляція рухової активності. Проте фактори навколишнього середовища, а саме: незбалансоване харчування, змінене газове середовище, зменшення рухової активності призводять до суттєвих змін стану кісткової тканини. Водночас варто зазначити, що

закономірна втрата елементів кісткової тканини, після досягнення її максимуму у молодому віці – це універсальне явище життя, властиве всім хребетним незалежно від стадії філогенетичного розвитку.

Результати біохімічних досліджень показників ремоделювання кісткової тканини показали вірогідне збільшення у 1,2 раза у сироватці крові щурів II групи концентрації мелатоніну відносно контрольних значень після 28-добової аліментарної депривації (рис. 2). Це свідчить,

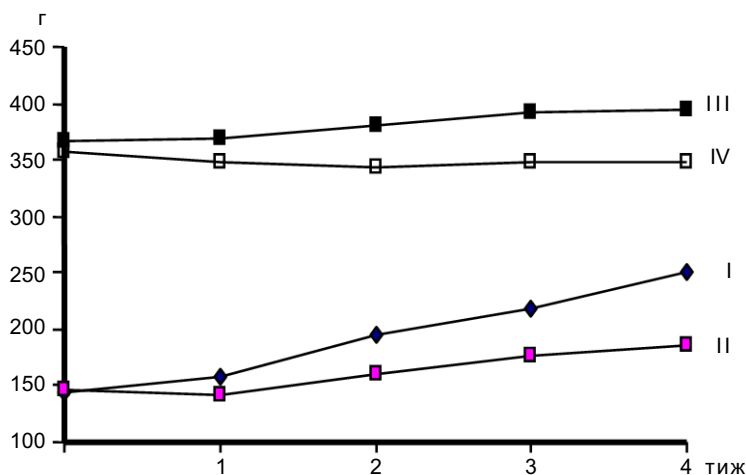


Рис. 1. Зміни маси тіла контрольних (I, III) і дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

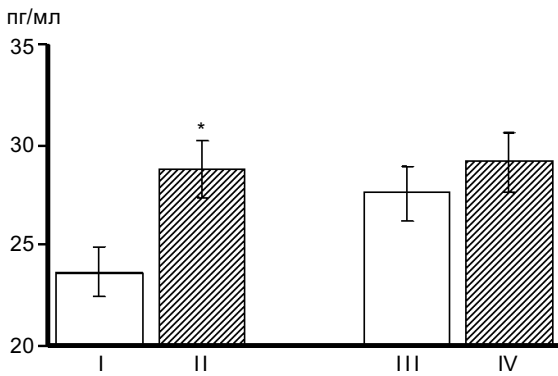


Рис. 2. Зміни вмісту мелатоніну у сироватці крові контрольних (I, III) і дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

що аліментарна депривація активує секрецію мелатоніну у молодих тварин і тим самим змінює швидкість процесів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини.

У спеціальній літературі існують відомості про наявність прямої кореляції між вмістом мелатоніну, гормону росту та ІПФР-I [16–18]. Проте у проведених нами дослідженнях не виявлено підвищення вмісту ІПФР-I у гомогенаті печінки молодих і дорослих щурів.

Активність ЛФ, яка характеризує діяльність остеобластів у сироватці крові молодих щурів при аліментарній депривації вірогідно підвищувалася на 20 %, а в кістковій тканині – на 40 % порівняно з вихідними значеннями (рис. 3).

Активність КФ, яка відображає діяльність остеокластів у сироватці крові та кіст-

ковій тканині у щурів II групи, не змінювалася порівняно з контрольними значеннями. Активність ТРКФ також залишалася стабільною.

Коефіцієнт ЛФ/КФ та ЛФ/ТРКФ у сироватці крові контрольних молодих щурів дорівнює 3,96 та 6,05 відповідно. При моделюванні аліментарної депривації у тварин II групи він збільшився до 5,14, а ЛФ/ТРКФ – до 8,22, що було у 1,3 і 1,4 раза відповідно вищим від контрольних значень. У кістковій тканині коефіцієнт ЛФ/КФ у цих тварин був нижчим у 6 разів порівняно з контролем. Якщо у контрольних молодих щурів коефіцієнт ЛФ/КФ дорівнював 82,3, то при обмеженні раціону харчування він значно знижувався і становив 14,3. Тобто у молодих тварин спостерігається істотне розбалансування процесів формування та руйнування кісткової тканини.

У проведених експериментах ми спостерігали вірогідне підвищення концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові щурів II групи в 2,4 раза (рис. 4). Відомо, що глікозаміноглікани беруть активну участь у фіксації кристалів гідроксиапатиту в органічний матрикс кісткової тканини, що забезпечує високі біомеханічні властивості кістяка.

Таким чином, у молодих щурів з обмеженим раціоном виявлено високу реактивність, особливо за активністю лужної фосфатази у кістковій тканині, концентрацією мелатоніну, глікозаміногліканів у сироватці крові.

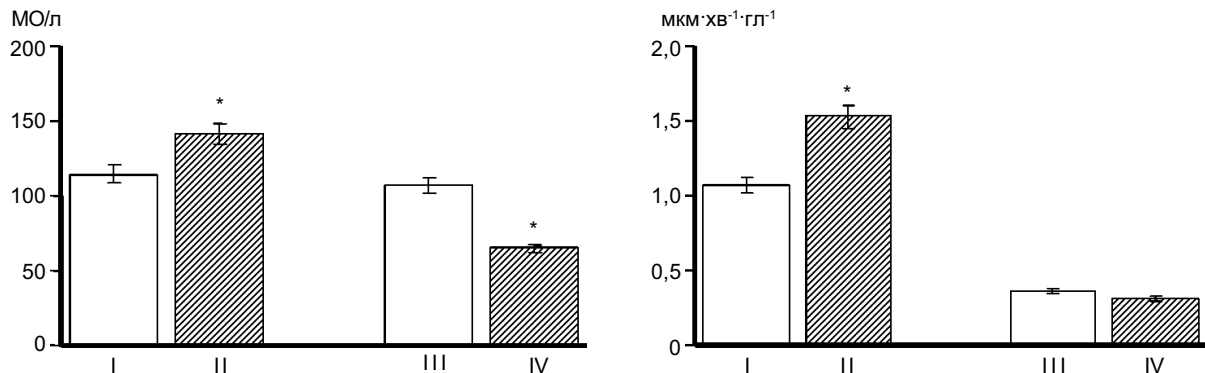


Рис. 3. Зміни активності лужної фосфатази у сироватці крові (а) і кістковій тканині (б) контрольних (I, III) та дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

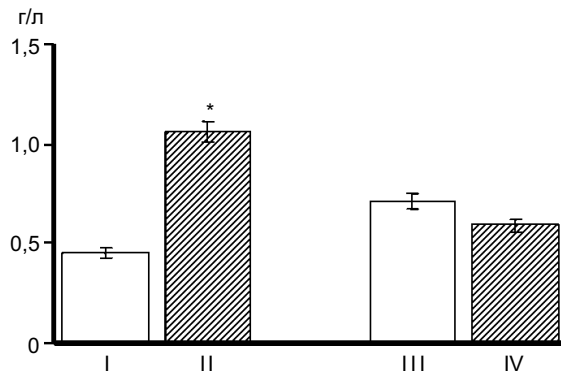


Рис. 4. Зміни концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові контрольних (I, III) та дослідних (II, IV) щурів різного віку: 3 і 9 міс відповідно

У дорослих 9-місячних щурів, незважаючи на досить тривале обмеження раціону, концентрація мелатоніну в сироватці крові, так само як експресія гена ПФР-1 залишалася стабільною.

Активність ЛФ у сироватці крові вірогідно зменшилася в 1,7 раза, у той час як у кістковій тканині вона мала лише тенденцію до зниження (див. рис. 3). Активність КФ в сироватці крові та кістковій тканині, а також ТРКФ у сироватці крові не змінювалися відносно контрольних значень. Співвідношення ЛФ/КФ у сироватці крові контрольних і дослідних дорослих щурів становило 4,83 і 2,68 відповідно, а ЛФ/ТРКФ – 6,05 і 3,9 відповідно. У кістковій тканині коефіцієнт ЛФ/КФ для контрольних щурів становив 40, а для досліджуваних – 31. Концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові дорослих щурів мала тенденцію до зниження відносно контрольних значень.

Слід відмітити незначне зниження темпу фізіологічної регенерації кісткової тканини у дорослих тварин. Тобто в умовах обмеження калорійності раціону у дорослих щурів виявляється висока збалансованість процесів руйнування та формування кісткової тканини.

Одержані результати відповідають класичному погляду на провідну роль сполучної тканини у фізіологічній регенерації кісткової тканини [3]. В умовах обмеженого харчування перевага активності про-

цесів руйнування більш виражена у молодих щурів. У дорослих тварин, вірогідно, навіть за таких умов зберігається сталий баланс між формуванням і резорбцією кістки.

Такої самої думки дотримуються і автори, які вважають, що в ранньому онтогенезі під час росту і збільшення маси скелета (моделювання) превалює остеогенез. У період дозрівання скелета процеси руйнування і формування врівноважуються. Остеобласти відіграють надзвичайно важливу роль не лише у формуванні та підтримці стану скелета, а і у регуляції активності остеокластів. Вони мають рецептори до первинних стимуляторів кісткової резорбції – паратиреоїдного гормону, різноманітних факторів росту. Отримуючи відповідний сигнал, остеобласти звільняють розчинний медіатор, який індукує руйнування кістки остеокластами. Тільки після цього остеобласт отримує можливість виконання своїх фізіологічних функцій – утворення кістки. При цьому маса у дорослому віці відновленої за допомогою остеобластів кісткової тканини і маса зруйнованої остеокластами кісткової тканини приблизно однакові [1, 8].

Таким чином, аліментарна депривація змінює темпи фізіологічного ремоделювання кісткової тканини молодих щурів. Про це свідчить підвищення концентрації мелатоніну, глікозаміногліканів та активності ЛФ у сироватці крові. У дорослих щурів спостерігали незначне зниження темпу ремоделювання кісткової тканини, що пов'язано з більш сталою регуляцією остеорезорбції та остеогенезу, енергетичного метаболізму і маси тіла.

I.G. Litovka, A.S. Kostjuchenko

THE BONE TISSUE PHYSIOLOGICAL REGENERATION OF YOUNG AND ADULT RATS IN THE DESIGNED ALIMENTARY DEPRIVATION CONDITIONS

We studied the influencing of designed during 28 days alimentary deprivation on the bone tissue physiological re-

modeling processes for 3- and 9-monthly Wistar rats-males (n=32). 4 groups of animals are probed: I, III – control, II, IV is the mode of calorie limitation (40% in relation to a valuable ration for every age group). It is shown, that alimentary deprivation increase the concentration of melatonin, glycosaminoglycans in blood serum and activity of alkaline phosphatase in serum and bone tissue in 1,4 and 1,2 time accordingly at for young rats. For adult rats the reliable decline of activity of alkaline phosphatase is exposed in the blood serum after alimentary deprivation. Expression of gene of insulinlike growth factor-I for animals of both probed groups did not change practically. We conclude, that alimentary deprivation change the biochemical markers of bone tissue physiological remodeling for young animals, while the changes of physiological regeneration rates were insignificant for adult animals.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В., Емельянов В.Г. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани. – СПб: Ольга, 1998. – 68 с.
2. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М: Наука, 1982. – 270 с.
3. Богомолец О.О. Вибрані твори. – К.: Наук. думка, 1969. – 422 с.
4. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – №10. – С.51–53.
5. Корнилов Н.В., Аврунин А.С. Адаптационные процессы в органах скелета. – СПб.: МОВ-САРАВ, 2001. – 269 с.
6. Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини у низько- і високоактивних шурів в умовах 45-добової гіпокінезії та впливу дозованої кисневої деривації // Косм. наука і технологія. – 2003. – 9, №1. – С.92–95.
7. Оганов В.С. Гипокинезия – фактор риска остеопороза // Остеопороз и остеопатии. – 1998. – №1. – С.13–17.
8. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия. В 2-х томах. – М: Медицина, 2001. – Т.2, Ч.П. – 680 с.
9. Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Питание и остеопороз // Жен. здоровье. – 2000. – № 3. – С. 36–39.
10. Подрушняк Е.П. Остеопороз – проблема века. – Симферополь: Одиссей, 1997. – 216 с.
11. Прохончуков А.А., Жижина Н.А., Тигранян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии. – В кн.: Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1984. – 49. – 200 с.
12. Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз: Пер. с англ. – М. – С-Пб.: ЗАО Изд-во БИНОМ, Невский диалект, 2000. – 560 с.
13. Compston J.E. Sex steroids and bone // Physiol. Rev. – 2001. – 81, №1. – P. 419–447.
14. Eliakim A., Raisz L.G., Brasel J.A., Cooper D.M. Evidence of increased bone formation following a brief endurance – type training intervention in adolescents males // J.Bone Miner. Res. – 1997. – 12, №10. – P.1708–1713.
15. McCay C.M. Reprint size // Science. – 1941. – 94, № 2444. – 415 p.
16. Ohlsson C., Bengtsson B., Isaksson Olle G. Growth Hormone and Bone // Endocrine Reviews. – 1998. – 19, № 1. – P. 55–79.
17. Ostrowska Z., Kos-Kudla B., Nowak M. et al. The relationship between bone metabolism, melatonin and other hormones in sham-operated and pinealectomized rats // Endocrin. Regul. – 2003. – 37, № 4. – P. 163–174.
18. Ostrowska Z., Wolkowska-Pokrywa K., Kos-Kudla B. et al. Melatonin and bone status // Pol. Merkur. Lekarski. – 2006. – 21, № 124. – P. 389–93.

*In-t фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: litir@biph.kiev.ua*