

В.Я. БЕРЕЗОВСЬКИЙ, І.Г. ЛІТОВКА, О.С. КОСТЮЧЕНКО

ФІЗІОЛОГІЧНА РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ТА ПОСТДЕПРИВАЦІЙНОГО ПЕРІОДУ

Исследовали влияние временного (28 сут) ограничения рациона питания (по калорийности и объему на 40%) и последующего периода восстановления на процессы физиологической регенерации костной ткани молодых и взрослых крыс. Эксперименты выполнены в осенне-зимний период на 64 крысах-самцах 3 и 9 месяцев. Наблюдали снижение темпов remodelирования костной ткани у молодых крыс при ограничении рациона питания. У взрослых крыс этот процесс отличался большей стабильностью.

* * *

Зменшення калорійності раціону харчування - найвідоміший спосіб зниження інтенсивності енергетичного метаболізму і подовження тривалості життя [2, 3, 4]. Усі тканини організму в залежності від властивої для них метаболічної активності виявляють неоднакову чутливість до обмеження енергетичної цінності їжі. Кісткова тканина (КТ) ссавців динамічно активна, у ній постійно відбуваються два протилежно спрямовані процеси – руйнування і формування. Співвідношення цих процесів залежить від факторів середовища, харчування, фізичних навантажень та віку. У класичних експериментах МакКея спостерігали підвищену крихкість стегнових кісток у щурів при обмеженні калорійності та маси їжі на 30-40% [6]. Інші дослідники при 4-місячному обмеженні калорійності раціону на 40% спостерігали зниження синтезу колагену сполучної тканини та прискорення його руйнування у молодих щурів [7]. При критичному обмеженні раціону у дорослих щурів знижується маса, щільність кістки, вміст кальцію, пригнічується синтез паратиреоїдного гормону (ПТГ) та кальцитоніну (КЦТ), прискорюється старіння КТ порівняно з інтактними тваринами [5]. Незбалансоване харчування, а саме дефіцит у раціоні білків, жирів, вуглеводів, вітамінів, мінеральних компонентів та мікроелементів може призводити до розвитку остеопенії, а в подальшому - до остеопорозу.

Разом з тим вікові особливості впливу аліментарної депривації та наступного періоду відновлення повноцінного харчового раціону на процеси остеосинтезу та резорбції залишаються нез'ясованими.

Мета цієї роботи дослідити вплив тимчасового обмеження раціону харчування та його наступного відновлення на процеси фізіологічної регенерації КТ у щурів віком 3 та 9 місяців.

МЕТОДИКА

Досліди виконано в осінньо-зимовий період на 64 щурах-самцях лінії Вістар. На момент початку експерименту вік тварин становив 3 та 9 місяців. Тварин розподілили по групах таким чином: I, IV – контрольні щури 3-х та 9-ти міс. відповідно, які перебували за умов віварію 28 діб; II та V – 3- і 9-міс. щури знаходилися у режимі 28-добової аліментарної депривації; III і VI - 3- та 9-міс. щурам створювали режим 28-добової аліментарної депривації з наступним відновленням повноцінного харчового раціону протягом наступних 28 діб. Аліментарну депривацію створювали режимом обмеження калорійності кормів на 40% відносно повноцінного раціону (20 г та 25 г корму на добу для тварин 3-х і 9-ти міс. відповідно). Тобто, вміст всіх інгредієнтів, що входили до раціону, було знижено на 40 %, у тому числі необхідних для побудови скелету мінеральних компонентів. Тварини всіх груп мали вільний доступ до води.

Досліди проводили з виконанням міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин.

Матеріалом для досліджень слугувала сироватка крові, яку одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Біохімічні показники фізіологічної регенерації КТ визначали за допомогою спектрофотометричних та імуноферментних методів. У сироватці крові визначали показники формування КТ: концентрацію інсуліноподібного фактору росту-I (ІФР-I, фірма IDS, США), концентрацію гормону росту (ГР, фірма SPIbio, США), активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1, Лахема, Чехія) за стандартними наборами реактивів; показники резорбції КТ – загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентну кислоту фосфатазу (ТРКФ, Лахема, Чехія), концентрацію глікозаміногліканів (ГАГ) за методом Кляцкіна [1],

концентрацію паратиреоїдного гормону (ПТГ, фірма Immutopics, США) та лептину (фірма DRG, США) визначали за стандартними наборами реактивів.

Цифрові дані обробляли з використанням пакету програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2003. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами дані стосовно впливу на гуморальні чинники метаболізму КТ показали незначне (18,6%) зниження концентрації гормону росту у 3-міс. щурів з 28-добовим обмеженням раціону (II гр.). Концентрація мелатоніну у сироватці крові тварин II групи вірогідно зростала на 21,5% (табл.1). Концентрація лептину у сироватці крові вірогідно знижувалася на 32,8 % ($P<0,05$) за таких умов. Рівень ІФР-I у сироватці крові залишався без змін. Концентрація ПТГ вірогідно знижувалася на 67,5% ($P<0,05$) і продовжувала знижуватися (77,4% порівняно з контрольними даними, $P<0,05$) навіть після відновлення повноцінного віварного раціону протягом наступних 28 діб.

Таблиця 1. Вміст гормонів, відповідальних за метаболізм кісткової тканини, у сироватці крові молодих щурів

Показники	Контроль 28 діб	Аліментарна депривація 28 діб	$\Delta, \%$	Аліментарна депривація 28 діб + віварний раціон 28 діб	$\Delta, \%$
Лептин, нг/мл	0,58 \pm 0,07	0,39 \pm 0,04*	-32,8	0,81 \pm 0,1	+39,7
Мелатонин, пг/мл	23,67 \pm 0,734	28,77 \pm 1,983*	+21,5	24,51 \pm 0,672	+3,5
Інсуліноподібний фактор росту-I, нг/мл	978,75 \pm 29,60	1113,32 \pm 110,38	+13,7	2042,75 \pm 131,26	+108,7
Гормон росту, нг/мл	4,28 \pm 2,151	3,48 \pm 1,320	-18,6	4,31 \pm 1,088	+0,7
Паратиреоїдний гормон, пг/мл	105,35 \pm 17,971	34,27 \pm 5,749*	-67,5	23,82 \pm 4,241*	-77,4

* – $P<0,05$ порівняно з контролем

Відновлення повноцінного віварного раціону у щурів III групи не викликало змін концентрації ГР, але виявлено тенденцію ($P>0,05$) до зростання рівня ІФР-I і лептину відносно контрольних значень.

Активність ЛФ суттєво не змінювалася у тварин II та III груп відносно контролю. Активність КФ і ТРКФ знижувалася у щурів II групи на 64,3% і 70,6% ($P<0,05$) відповідно у порівнянні з контролем, що може свідчити про зниження активності остеокластів, та відповідного уповільнення всього процесу ремоделювання КТ. Відновлення повноцінного раціону у щурів III групи сприяло певному підвищенню активності цих показників, однак активність КФ залишалася зниженою на 42,1% відносно контролю, а ТРКФ – на 47,9% ($P<0,05$) (рис.1).

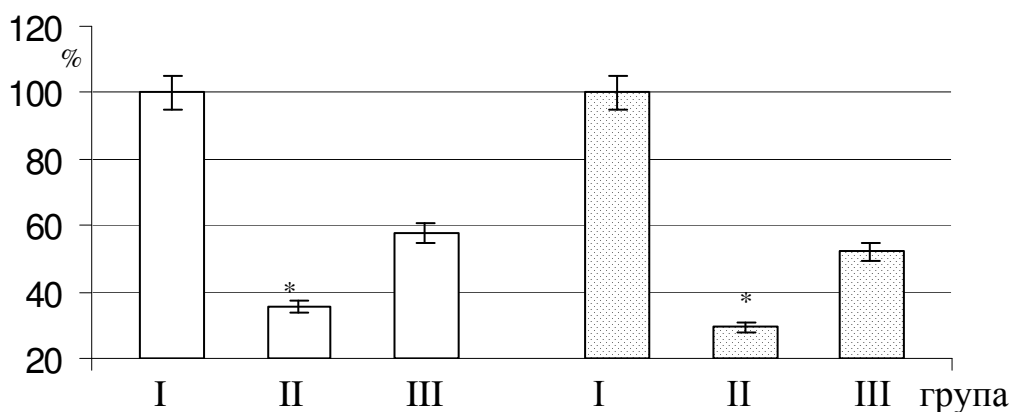


Рис.1. Активність КФ і ТРКФ у сироватці крові молодих контрольних (I) та дослідних (II, III) груп щурів
* – P<0,05 порівняно з контролем

Концентрація ГАГ у сироватці крові не зазнала змін у жодній з досліджуваних груп молодих тварин. Це можна розглядати як свідчення відносної стабільності обміну протеогліканів, які забезпечують взаємодію між органічним та неорганічним компонентами КТ.

Гуморальна регуляція фізіологічної регенерації КТ виявляє лабільність до впливу обмеженого харчового раціону на організм молодої тварини. Про це свідчать різноспрямовані зміни переважної більшості вищенаведених досліджених гормонів. 28-добова аліментарна депривація уповільнювала темп ремоделювання КТ щурів. Відновлення повноцінного раціону мало незначний вплив на регуляцію та метаболізм КТ.

У дорослих 9-міс. щурів з обмеженим раціоном харчування протягом 28 діб (V гр.) концентрація мелатоніну, лептину і ПТГ у сироватці крові не змінювалася. Рівень ІФР-I у сироватці крові знизився на 42%, а ГР – на 39,7% порівняно з контрольною групою (табл.2)

Таблиця 2. Вміст гормонів, відповідальних за метаболізм кісткової тканини, у сироватці крові дорослих щурів

Показники	Контроль 28 діб	Аліментарна депривація 28 діб	Δ, %	Аліментарна депривація 28 діб + віварний раціон 28 діб	Δ, %
Лептин, нг/мл	0,42± 0,06	0,34± 0,03	-19	0,71±0,06*	+69,0
Мелатонин, пг/мл	27,58± 1,842	29,13± 19,86	+5,6	28,34±7,215	+2,8
Інсуліноподібний фактор росту-I, нг/мл	1453,83±101,47	843,0±80,94*	- 42,0	1094,05±118,56*	-24,7
Гормон росту, нг/мл	2,92± 1,281#	1,76±0,238*	- 39,7	2,42±0,474	-17,1
Паратиреоїдний гормон, пг/мл	113,77±7,215	124,20±23,044	+9,2	69,43±7,779	-39,0

* – P<0,05 порівняно з контролем

– P<0,05 порівняно з контролем 3-міс. щурами

При споживанні відновленого раціону протягом 28 діб відзначили вірогідне зниження концентрації ПТГ у сироватці крові на 39% (P<0,05). Рівень ІФР-I у щурів VI групи дещо підвищився відносно значень у тварин V групи, але залишався зниженим відносно контрольних

значень на 24,7% ($P < 0,05$). Концентрація лептину у сироватці крові щурів VI гр. підвищувалася на 68,8% відносно значень тварин IV гр. Зміни рівня ГР у сироватці крові щурів VI групи мали таку саму спрямованість, як і лептину та ІФР-I.

При порівнянні концентрації досліджуваних гормонів у молодих і дорослих щурів, можна відзначити більш високий рівень ГР (в 1,5 рази, $P < 0,05$) у молодих щурів контрольної групи (I) порівняно з дорослими тваринами IV. Більш високі концентрації ГР відзначалися у всіх досліджуваних групах молодих тварин у порівнянні з дорослими. У той же час, обмеження раціону харчування у молодих тварин призводило до значного зниження ПТГ і ще більшого його зниження при відновленні повноцінного харчування. У дорослих тварин цей показник знижувався вірогідно лише у тварин V групи.

Спрямованість змін концентрації лептину та мелатоніну була однаковою у обох вікових групах щурів. Рівень ІФР-I у молодих тварин вірогідно не змінювався. Варто відзначити лише тенденцію до підвищення у тварин II та III груп. У дорослих тварин цей показник вірогідно знижувався як після аліментарної депривації, так і при відновленні повноцінного раціону харчування. Таким чином, спрямованість зміни рівня досліджуваних показників дещо відрізняється у молодих і дорослих тварин у відповідь на зниження харчового раціону або його подальше відновлення.

Активність ЛФ у сироватці крові дорослих щурів V гр. вірогідно зросла на 57,3% і знизилася на 49,8% у тварин VI гр. відносно контрольних значень (рис.2).

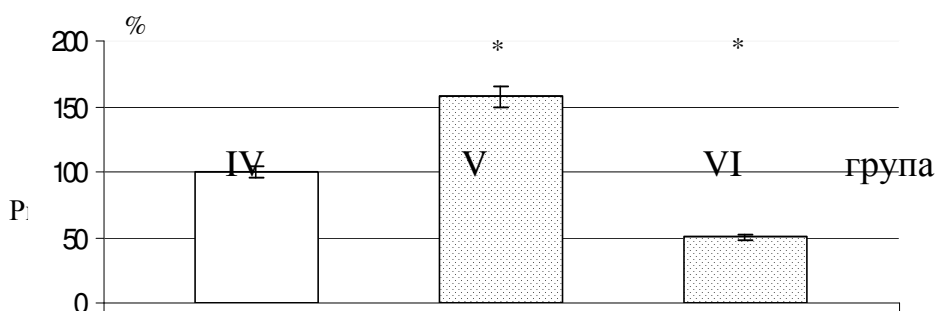


Рис.2. Активність ЛФ у сироватці крові дорослих контрольних (IV) та дослідних (V, VI) груп щурів
* – $P < 0,05$ порівняно з контролем

Активність КФ і ТРКФ у дорослих тварин обох досліджуваних груп не змінювалася. Ми відзначили лише тенденцію до зниження активності цих ферментів у тварин V та VI гр. відносно контролю. Концентрація ГАГ вірогідно зростала у сироватці крові щурів VI групи у 4,3 рази.

Підсумовуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що обмеження раціону харчування знижує темпи ремоделювання КТ у молодих щурів. На це вказує відсутність зростання активності лужної фосфатази, яка є маркером інтенсивності процесів остеосинтезу. Зниження активності лізосомальних ферментів свідчить про зменшення кількості активно діючих остеокластів, що руйнують стару тканину, створюючи умови та субстрати для її оновлення. Різноспрямовані зміни рівня гормонів у молодих тварин, що відповідають за процеси руйнування і утворення КТ, можуть вказувати на неспроможність організму компенсувати дисбаланс між потребами зростаючого організму і значну нестачу поживних речовин. Відновлення повноцінного раціону мало незначний вплив на регуляцію та метаболізм КТ за 28-добовий відновлювальний період. У дорослих щурів процес ремоделювання КТ відрізняється більшою стабільністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лабораторное дело. – 1989. – № 10. – С. 51-53.
2. Нагорный А.В. Старение и продление жизни.- М.: Советская наука, 1950. – 214 с.
3. Никитин В.Н. Экспериментальные подходы к продлению жизни // Итоги науки и техники: Общие проблемы биологии.- М., 1984.– Т.4.– С.6-43.
4. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни.- К.: Наукова думка, 1992.– 336 с.
5. Kalu D.N., Hardin R.R., Cockerham R., Yu B.P. Aging and dietary modulation of rat skeleton and parathyroid hormone // Endocrinology.– 1984.– V. 115.– P. 1239-1247.
6. McCay C.M. Reprint size // Science. - 1941. - V.94, № 2444. – 415 p.
7. Reiser K., McGee C., Rucker R., McDonald R. Effect of aging and caloric restriction on extracellular matrix biosynthesis in a model of injury repair in rats // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med.– 1995.– V.50.– P.40-47.

V.A. BEREZOVSKII , I.G. LITOVKA , A.S. KOSTJUCHENKO

BONE TISSUE PHYSIOLOGICAL REGENERATION OF RATS IN MODES OF ALIMENTARY DEPRIVATION AND POSTDEPRIVATION PERIOD

We investigate the influence of temporal (28 days) of food ration limitation (on calorie content and volume on 40%) and subsequent period of renewal on the processes of bone tissue physiological regeneration of young and adult rats. Experiments are executed in a fall-winter period on 64 rats-males 3 and 9 months. We determinate down remodeling of bone tissue for young rats at limitation of food ration. For adult male rats this process differed greater stability.

Інститут фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України

Дата поступлення: 28.08. 2008 р.