

УДК 616.71-007-008.93-092.9

Б. М. Мірчук, *д-р мед. наук*

ВПЛИВ АЛІМЕНТАРНОЇ ОСТЕОДИСТРОФІЇ НА СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

Одеський національний медичний університет

Під час ортодонтичного лікування переміщення зубів відбувається завдяки резорбції та новоутворенню кісткової тканини, які стимулюють адекватно регулюючими силами тиску та натягу. Ці сили передаються через періодонт, причому первинне стиснення зв'язки компенсується резорбцією кістки, а завдяки натягу відбувається відкладення нових шарів кісткової тканини [1]. У процесі резорбції головну роль відіграють остеокласти й інші одноядерні клітини макрофагального типу. Сукупність клітин у зоні резорбції та їх функціональну взаємодію об'єднують умовним поняттям «базова багатоклітинна одиниця (basic multicellular unit — BMU), або «блок ремоделювання» (bone remodelling unit — BRU), що запропонував на початку 1980-х років А. М. Parfitt [2]. Суттєве значення в цьому процесі має складна регуляція метаболізму кісткової тканини та кальцію в організмі.

Метаболізм кальцію в кістковій тканині (у процесі росту, розвитку, ремоделювання) та підтримування кальцієвого гомеостазу в організмі (постійна концентрація кальцію в крові на рівні 11 мг%) — поєднані процеси, а їх узгодження регулюється і контролюється на системному рівні [3].

Метою дослідження було вивчення впливу аліментарних

факторів, дефіцит кальцію, фосфору та білка на стан кісткової тканини.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальне дослідження проведено на 20 самках щурів віком 9 міс. масою 309–364 г на моделі аліментарної остеодистрофії, що відтворювалася шляхом утримання щурів на раціоні, дефіцитному за вмістом кальцію, фосфору та білка. Запропонована дієта забезпечила вживання кальцію 46 мг/щура (норма 151 мг), фосфору — 55 мг/щура (норма 122 мг), білка — 2,25 г (норма 4 г). Тварини були поділені на дві групи: I група — інтактний контроль, щурів утримували на дієті віварію (ДВ); II — основна група, щурів утримували на неповноцінній дієті (НД).

Експеримент тривав 2 міс., після чого тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг) шляхом кровопускання з серця. У щурів виділяли стегнову, велику гомілкову, плечові кістки, а також нижню щелепу й альвеолярну кістку для визначення їх щільності. Крім того, виділяли стегнову кістку для біохімічного визначення активності кислоти та лужної фосфатази (КФ і ЛФ), а також загальної протеолітичної активності (ЗПА), катепсинів і еластази [4–10].

Для визначення КФ використовували метод Vessey у модифікації А. П. Левицького та ін. [5], який базується на тому, що фосфатази відщепляють п-нітрофенол від синтетичного субстрату п-нітрофенілфосфату. Утворений п-нітрофенол у лужному середовищі має жовте забарвлення [5; 6].

Загальну протеолітичну активність визначали за методом Kunitz у модифікації А. П. Левицького, що ґрунтується на гідролізі субстрату казеїну. Після гідролізу субстрату протеазами нерозщеплений казеїн відділяється за допомогою трихлороцтової кислоти, а кількість продуктів розщеплення (вільні амінокислоти, олігопептиди) визначають колориметрично після реакції на феноли з реактивом Фоліна [4].

За основу способу визначення активності катепсинів взято метод Anson's, у якому як субстрат використовують ліофілізований гемоглобін великої рогатої худоби. Катепсини належать до групи протеолітичних ферментів карбоксильного або тіолового типу. Оптимум рН для катепсину D становить 3,5 [8; 9].

Активність еластази оцінювали за ступенем гідролізу синтетичного субстрату N-t-BOC-L-alanina-p-nitrophenyl ester (BOC) ("Sigma", USA) за методом Visser [10]. Під дією еластази від субстрату відщеплюється п-нітрофенол жов-

того забарвлення, інтенсивність якого пропорційна активності еластази.

Визначення товщини стінки діафіза та товщини компактного шару діафізної стінки проводилося за такою методикою.

На зрізі трубки діафіза, зробленому у зоні закінчення гребеня третього вертлюга, безпосередньо під бінокляром (збільшення $\times 9$) проводили вимірювання товщини стінки діафіза (відносної товщини стінки діафіза):

$$I_d = \frac{d}{R}, \quad (1)$$

де d — товщина стінки абсолютна; R — радіус трубки діафіза.

Беручи до уваги, що товщина різних ділянок трубки у більшості випадків неоднакова, необхідно одержати середнє значення d у різних ділянках. Найпростіше виміряти товщину двох протилежних ділянок d_1 і d_2 за лінією діаметра та діаметр D (рис. 1). Звідси середня відносна товщина стінки діафіза:

$$\frac{1}{2} \cdot \frac{d_1}{R} + \frac{1}{2} \cdot \frac{d_2}{R} = \frac{1}{2} \cdot \frac{d_1 + d_2}{R} = \frac{1}{2} \cdot \frac{d_1 + d_2}{\frac{D}{2}} = \frac{d_1 + d_2}{D}, \quad (2)$$

тобто $I_d = \frac{d_1 + d_2}{D}$.

У стінці діафіза на поперечному зрізі чітко виділяються два шари кісткової тканини: зовнішній — компактний без видимого збільшення порожнин, внутрішній — з численними великими порожнинами, які дотикаються, що дозволяє назвати його губчастим. Зважаючи на те, що співвідношення описаних шарів у різних експериментальних групах виявилися неоднаковими, окремо проводили вимірювання компактного шару (b_1 і b_2) (рис. 2) та розраховували відносну

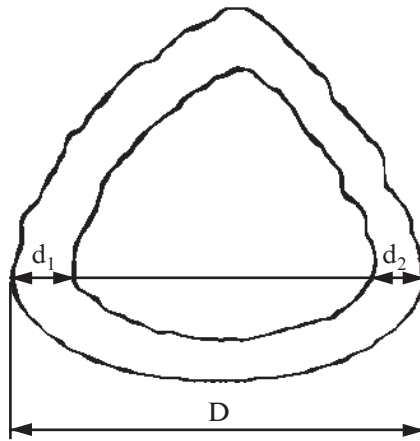


Рис. 1. Вимірювання параметрів для визначення відносної товщини стінки діафіза (I_d)

товщину компактного шару за формулою:

$$I_b = \frac{b_1 + b_2}{D}. \quad (3)$$

Дослідження щільності кісток показало зниження щільності стегнової, великогомілкової, плечової кісток, нижньої щелепи та її альвеолярного відростка (табл. 1).

Після двомісячного перебування щурів на раціоні, дефіцитному за вмістом кальцію, фосфору та білка, в усіх кістках, які вивчалися, зменшення щільності мало вірогідний характер ($P < 0,01-0,05$).

Проведення морфометричного аналізу стегнової кістки та її ділянок показало, що щільність цілісної стегнової кістки щурів, які перебували на НД, вірогідно знизилася порівняно з тваринами інтактного контролю ($P < 0,001$) (табл. 2). У той же час щільність стінки

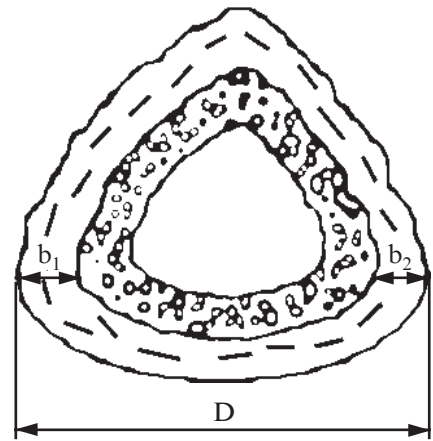


Рис. 2. Вимірювання параметрів для визначення відносної товщини компактного шару (I_b)

діафіза не змінилася, а відносна товщина стінки діафіза у щурів, які перебували на НД, вірогідно зменшилася ($P < 0,001$). Таким чином, зниження щільності цілісної стегнової кістки виникло за рахунок зменшення товщини її стінок, що може бути наслідком переважання процесів резорбції над остеогенезом, яке виникло через дефіцит кальцію та фосфатів у раціоні. Це пов'язано з тим, що для підтримки нормального рівня цих елементів у крові підсилюється гормонально зумовлена резорбція високомінералізованої кісткової тканини. Внаслідок цього у кістковій тканині збільшується кількість порожнин і значно зменшується товщина компактного шару стінки діафіза (див. табл. 2).

Отже, вищевикладене переконливо доводить, що аліментарний дефіцит незамінних компонентів негативно впли-

Таблиця 1
Щільність кісток щурів, яких утримували на дієті віварію і на неповноцінній дієті протягом 2 міс.

Кістки	ДВ	НД	t-критерій Стьюдента	Вірогідність
Стегнова	1,579±0,012	1,443±0,037	3,44	P<0,01
Стінка діафіза стегнової кістки	2,125±0,015	1,797±0,111	2,93	P<0,05
Великогомілкова	1,656±0,012	1,484±0,050	3,30	P<0,05
Плечова	1,683±0,004	1,517±0,032	4,99	P<0,01
Нижня щелепа	1,778±0,010	1,658±0,038	3,01	P<0,05
Альвеолярна кістка нижньої щелепи	1,758±0,025	1,640±0,041	2,41	P<0,05

Таблиця 2

**Стан кісткової тканини щурів
при експериментальній остеодистрофії**

Показник	Група тварин	
	Контроль (ДВ)	Основна (НД)
Щільність стегнової кістки	1,598±0,016	1,434±0,027 P<0,001
Щільність стінки діафіза	2,065±0,035	2,001±0,015 P>0,001
Відносна товщина стінки діафіза	0,412±0,027	0,270±0,022 P<0,001
Відносна товщина компактного шару	0,370±0,016	0,225±0,046 P<0,001

Примітка. P — вірогідність відмінностей щодо контролю.

ває на стан кісткової тканини, знижуючи щільність усіх кісток експериментальних тварин. У табл. 3 наведені результати дослідження основних ферментів, які відображають стан мінерального (активність КФ і ЛФ), білкового обміну (активність еластази, катепсинів і загальна протеолітична активність (ЗПА)) у кістковій тканині щурів.

Відомо, що кістка — це депо мінеральних компонентів, при недостатньому їх надходженні з їжею система гомеостазу рівня кальцію та фосфатів у крові забезпечує вивільнення цих елементів із гідроксіапатиту кісткової тканини. Руйнування гідроксіапатиту відбувається під дією

КФ остеокластів. У нашому експерименті, після 2-місячного утримання тварин на раціоні з дефіцитом кальцію та фосфору, встановлено вірогідне зниження активності КФ у кістковій тканині (P<0,05). Напевно, це є компенсаторною реакцією на аліментарний дефіцит кальцію та фосфору і пояснює зниження кількості остеокластів у результаті порушення регуляторних процесів у цих умовах.

Проведене біохімічне дослідження виявило ще один парадоксальний факт, який стосується кісткової ЛФ. Відомо, що цей фермент є маркером функціональної активності остеобластів. У нашому ж експерименті на фоні вірогідного

зниження щільності стегнової кістки очікували зниження активності остеобластів і відповідно кісткової ЛФ. Проте біохімічний аналіз показав суттєве, у 2,5 рази (P<0,05), збільшення активності ЛФ у кістковій тканині щурів, які перебували протягом 2 міс. на НД за вмістом кальцію, фосфору й амінокислот. Можливо, довготривалий дефіцит аліментарних компонентів приводить до того, що для збереження структурної та функціональної цілісності кісток включаються компенсаторні реакції у вигляді одночасного зниження функціональної активності остеокластів і підвищення активності остеобластів.

Друге пояснення виявленого нами факту збільшення активності ЛФ, можливо, полягає у тому, що джерелом цього ферменту можуть бути і лейкоцити. Можливо, при остеодистрофії відбувається значна інфільтрація кісткової тканини, що і веде до збільшення активності ЛФ.

Дисбаланс процесів мінералізації, а саме активності кісткових фосфатаз, при аліментарній остеодистрофії у щурів переконливо демонструє співвідношення ЛФ/КФ. У щурів групи контролю цей коефіцієнт становив 5,6, а у тварин з аліментарним дефіцитом кальцію, фосфору й амінокислот підвищився до 19,2.

Таким чином, проведене дослідження активності ферментів мінерального обміну у кістковій тканині щурів з остеодистрофією підтверджує порушення активності кісткових фосфатаз, які мають компенсаторний характер.

Поряд із порушенням процесів мінералізації у кістковій тканині щурів при остеодистрофії встановлено падіння ЗПА на 36,6 % (P<0,05), що свідчить про зниження інтенсивності біосинтезу колагену кісткової тканини.

Еластаза, як і катепсини кісткової тканини, бере участь у руйнуванні органічної осно-

**Вплив аліментарних факторів
на активність ферментів у кістковій тканині щурів**

Таблиця 3

Біохімічний показник	Група тварин	
	Контроль (ДВ)	Основна (НД)
Активність КФ, нкат/г	18,04±1,56	13,37±1,02 P<0,05
Активність ЛФ, нкат/г	101,8±7,4	256,4±34,9 P<0,05
ЛФ/КФ	5,6	19,2
ЗПА, нкат/г	202,1±19,8	128,8±16,2 P<0,05
Активність катепсинів, нкат/кг	685,7±32,5	841,9±63,6 P<0,05
Активність еластази, нкат/кг	5,65±0,54	7,53±0,51 P<0,05
ЗПА/еластаза	35,8	17,2

ви кістки. Як показали наші дослідження, НД спричинила вірогідне підвищення на 19 % ($P < 0,05$) активності катепсинів і на 33 % активності еластази ($P < 0,05$) у кістковій тканині щурів.

Таким чином, дослідження протеолізу кісткової тканини показало, що утримування щурів на раціоні, дефіцитному за вмістом кальцію, фосфору та білка, сприяє зниженню інтенсивності синтезу білкової матриці (за показником ЗПА) й активації ферментів, які руйнують білки кістки (за активності катепсинів і еластази).

Підсумовуючи вивчення основних показників обміну кісткової тканини у щурів при аліментарній остеодистрофії, важливо звернути увагу на зміну активності маркерних ферментів остеобластів і остеокластів, що спричинює порушення функціональної та структурної організації кісткової тка-

нини внаслідок неповноцінного харчування. За результатами проведених досліджень можна зробити висновок, що аліментарні фактори безпосередньо впливають на метаболізм кісткової тканини. При порушенні метаболізму у кістковій тканині, що спричинене дефіцитом аліментарних факторів (дефіцит кальцію, фосфору та білка), доцільно призначати стимулятори остеогенезу: адаптогени, солі цинку та кальцію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Наумович С. А. Биомеханика системы зуб-периодонт / С. А. Наумович, А. Е. Крушевский. – Мн., 2000. – 132 с.
2. Риггз Б. Л. Остеопороз: этиология, диагностика, лечение / Б. Л. Риггз, Л. Д. Мелтон. – М. : БИНОМ ; СПб. : Невский диалект, 2000. – 560 с.
3. Воложин А. И. Остеопороз / А. И. Воложин ; под ред. А. И. Воложина, В. С. Оганова. – М. : Практическая медицина, 2005. – 240 с.
4. Левицкий А. П. Пищеварительные ферменты слюнных желез : авто-

реф. дис. на соискание науч. степени д-ра биол. наук / А. П. Левицкий. – Одесса, 1974. – 53 с.

5. Левицкий А. П. Сравнительная оценка трех методов определения активности фосфатаз слюны / А. П. Левицкий, А. И. Марченко, Т. Л. Рыбак // Лабораторное дело. – 1973. – № 10. – С. 624–625.

6. Ферментативный метод оценки stanu кісткової тканини / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, І. В. Ходаков, Ю. В. Зеленіна // Одеський медичний журнал. – 2006. – № 3. – С. 17–21.

7. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза : метод. рекомендации / сост. : А. П. Левицкий [и др.]. – К. : ГФЦ МЗ Украины «Авиценна», 2005. – С. 31–38.

8. Anson M. L. The estimation of pepsin with hemoglobin / M. L. Anson, A. E. Mirsky // J. Gen. Physiol. – 1932. – Vol. 16, N 1. – P. 59–64.

9. Anson M. L. The estimation of pepsin, trypsin, pa-pain and cathepsin with hemoglobin / M. L. Anson // J. Gen. Physiol. – 1938. – Vol. 22, N 2. – P. 79–88.

10. Visser L. The use p-nitrophenyl-N-test-butyl-oxycarbonyl-l-alanine as substrate for elastase / L. Visser, E. R. Blout // Biochem. of biophys. Act. – 1972. – Vol. 268, N 1. – P. 275–280.

УДК 616.71-007-008.93-092.9

Б. М. Мірчук

ВПЛИВ АЛІМЕНТАРНОЇ ОСТЕОДИСТРОФІЇ НА СТАН КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

На моделі аліментарної остеодистрофії, що відтворювалася шляхом утримування щурів на раціоні, дефіцитному за вмістом кальцію, фосфору та білка, виділяючи стегнову, велику гомілку, плечові кістки, а також нижню щелепу й альвеолярну кістку, визначали товщину стінки діафіза та товщину компактного шару діафізної стінки, біохімічними методами вивчали активність кислотої та лужної фосфатази, загальну протеолітичну активність катепсинів і еластази.

Ключові слова: аліментарна остеодистрофія, щільність кісткової тканини, ферменти кісткової тканини.

UDC 616.71-007-008.93-092.9

В. М. Mirchuk

THE INFLUENCE OF ALIMENTARY OSTEODYSTROPHIA ON THE STATE OF BONE TISSUE

On the model of alimentary osteodystrophia, which was carried out by way of keeping rats on dietary intake deficient in the content of calcium, phosphorus and protein, there were separated femoral, tibia, humeral bones, and also lower jaw and alveolar bone, thickness of the diaphysis wall and of compact layer in the diaphysis wall, the activity of alkaline and acid phosphatase and general proteolytic activity of cathepsins and elastase was studied with the help of biochemical methods.

Key words: alimentary osteodystrophia, density of bone tissue, enzymes of bone tissue.

УДК 615.015.13;615.217.5;615.015.23

М. А. Мохорт, д-р мед. наук, проф.,

О. В. Пушишева

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ ПОХІДНИХ 7-(α -ФУРОЇЛ)-2- МОРФОЛІНО[1,3]ТІАЗОЛО[4,5-d]ПІРИДАЗИН-4(5H)-ОНУ

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»,
Київ

Порушення скоротливої активності гладком'язових клітин призводить до виникнення патологічних станів, які суп-

роводжуються спастичними реакціями та спотворенням кровопостачання різних органів і тканин. Найефективні-

шими за таких патологічних умов виявляються препарати, що належать до групи міотропних спазмолітиків. Але су-