

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И МИНЕРАЛИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ СВИНЕЙ В АНТЕНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

Стеценко Ирина Игоревна, доктор биологических наук, профессор кафедры «Химия» ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова»

432700, Ульяновск, пл.100-летия со дня рождения В.И. Ленина, 4; тел. 8 (8422)441009

Ключевые слова: остеогенез, антенатальное развитие, костная ткань, органический матрикс, минерализация.

В статье представлены материалы исследований по формированию ферментных систем и минерализации костной ткани свиней в период от 45 суток внутриутробного развития до его рождения. Показано, что критическим периодом развития костной ткани, характеризующимся высокой напряженностью метаболических процессов являются 45-90 сутки антенатального развития свиней.

Введение

Крепость конституции и состояние здоровья животных в значительной степени определяется химическим составом, интенсивностью и направленностью метаболических процессов в их костной системе. Исследования химического состава костной ткани, проведенные [1,2,3] показали, что содержание её компонентов не постоянно, а определяется видом кости, возрастом животного и физиологическим состоянием. И хотя процессы перестройки костной ткани происходят на протяжении всей жизни животного, особенно активное новообразование кости связано с ранним онтогенезом. Этот период характеризуется высокой интенсивностью качественных и количественных изменений как органической, так и минеральной фазы костной ткани, обеспечивающих становление кости как органа. В конечном итоге это и обуславливает более легкое нарушение обмена веществ в костной ткани в раннем периоде развития, особенно у свиней, скелет которых, вследствие более быстрого роста, наиболее чувствителен к неблагоприятным условиям [4].

В то же время исследования костной ткани свиней в антенатальный период весьма немногочисленны и в основном связаны с изучением её минеральной фазы. Однако понимание биохимических особенностей остеогенеза в период внутриутробного развития имеет большое значение как для раскрытия механизмов формирования кост-

ной системы в норме, позволяя установить «критические» периоды в развитии свиней в ходе эмбриогенеза, так и для эффективной профилактики болезней скелета животных.

Поэтому целью нашей работы было изучение динамики содержания компонентов органического матрикса и минеральной фазы костной ткани свиней в антенатальный период развития.

Объекты и методы исследований

Нами проведены исследования костной ткани плодов свиней, полученных от свиноматок крупной белой породы при скрещивании с хряком этой же породы. Супоросные свиноматки содержались на типовых рационах СК-1 при соблюдении соответствующих зоотехнических и ветеринарных требований. На 45, 60, 90 суток супоросности были проведены убои свиноматок (по 3 головы в каждый период) и на анализ взяты образцы костной ткани плодов и 10 поросят, убитых сразу после рождения. На анализ брали ткань основных типов костей, локализованных в разных частях скелета: теменной кости, грудных позвонков, локтевой и подвздошной костей. Анализ костной ткани проводили методами, описанными в справочном пособии под ред. Б.Д. Кальницкого [5].

Результаты исследований

Одним из показателей, характеризующих степень созревания костной ткани, служит содержание в ней воды. Установлены значительные колебания по количеству

Таблица 1

Содержание минеральных и органических компонентов в ткани теменной кости свиной (г/100г обезжиренной, воздушно-сухой ткани)

Показатель	Возраст (сутки)			
	45	60	90	при рождении
Зола	30,83±0,18	48,44±1,79	55,74±1,10	58,02±1,04
Кальций	3,32±0,03	11,18±0,70	7,91±0,41	10,37±0,56
Фосфор	2,76±0,33	4,66±0,50	5,92±1,19	4,67±0,70
Магний	0,26±0,03	0,50±0,03	0,36±0,02	0,42±0,01
Лимонная кислота	2,07±0,09	1,77±0,03	2,64±0,12	4,12±0,19
Общий азот	7,56±0,79	5,19±0,08	4,33±0,90	3,42±0,04
Коллаген	7,47±0,50	10,22±0,51	10,36±1,76	15,18±3,16
Азот коллагена в общем азоте %	17,78±0,70	34,17±0,28	43,27±2,18	71,62±7,42
Неколлагеновые белки	12,30±0,01	5,53±0,01	4,64±0,19	4,90±0,95
Уроновые кислоты	0,736±0,01	0,438±0,05	0,473±0,03	0,407±0,03
Гексозамины	1,48±0,01	0,920±0,08	0,540±0,04	0,540±0,05

воды в костной ткани плодов свиной, зависящие от возраста и типа костей. Однако в ткани всех исследованных костей ясно прослеживалась закономерность понижения уровня содержания воды по мере развития плодов с 68-88% до 40-63% в период от 45 до 90 сток антенатального развития. Наиболее существенная дегидратация прослеживалась за время от 60 до 90 суток развития плодов, что, по-видимому, связано с процессом физиологического созревания костной ткани и развитием первичных центров окостенения. Дегидратация костной ткани коррелировала с зольностью костей ($r = -0,75$). За период от 90 до 114 суток внутриутробного развития животных количество воды в костной ткани практически не менялось.

Степень минерализации костной ткани обычно оценивают по её зольности. Проведенные исследования (табл.1) показали, что зольность костной ткани наиболее активно возрастала за период 45-90 суток антенатального развития, а за время 90-114 суток внутриутробного онтогенеза изменялась незначительно. Г.А. Илизаров с сотр. [6], проводя электронно-микроскопическое исследование костной ткани, также установили высокую степень минерализации матрикса на ранней стадии его развития. По мере возрастания плотности костной ткани скорость минерализации снижалась. В целом, за 45-

114 суток антенатального развития плодов уровень кальция, составляющий основу минерального компонента костной ткани, увеличился в 1,5-4,5 раза (табл.1). Что касается содержания фосфора в костной ткани, то его возрастание за антенатальный период происходило более плавно, чем кальция, и за 45-114 суток эмбриогенеза повысилось в 1,5-2,2 раза. На более высокие темпы отложения кальция по сравнению с фосфором в растущей кости также указывают другие исследователи [7,8,9,10,11]. Следовательно, обнаруженные темпы в депонировании кальция и фосфора в ткань растущей кости носят характер закономерности.

Ценную информацию о состоянии кальциевого и фосфорного обмена дает отношение кальция к фосфору, которое за 45 -114 суток внутриутробного развития выросло на 49-85% отражая увеличение кристаллической части минеральной фазы и зрелости костной ткани.

Обнаружена тесная корреляция отложения кальция и магния в костную ткань плодов ($r = +0,94$).

О состоянии минеральной и органической фаз костной ткани судили по отношению кальция к общему азоту. За период 45-90 суток развития плодов этот показатель вырос в 3,8 – 5,5 раз, что, по-видимому, характеризует развитие первичных центров оксификации.

Участие лимонной кислоты в процессе минерализации на сегодняшний день не вызывает сомнений. Считают, что цитрат участвует в транспорте кальция, образует цитратный апатит, представляющий нормальный минеральный компонент костной ткани [12,13]. В наших исследованиях установлено, что за период от 5 суток внутриутробного развития и до рождения свиней содержание лимонной кислоты в костной ткани плодов повышалось, хотя этот процесс носил неравномерный характер (табл.1). В большинстве исследованных костей накопление цитрата совпадало с периодом активного депонирования минеральных элементов и, возможно, связано с повышением содержания цитрата кальция.

Известно, что органический матрикс костной ткани определяет её гомеостаз, резистентность и адаптацию к действию различных факторов. Количественной характеристикой органической фракции костной ткани служит содержание общего азота. За период исследований наблюдалось понижение содержания органической и возрастание минеральной фазы костной ткани. Коэффициент обратной корреляции между содержанием кальция и общего азота в костной ткани за антенатальный период развития свиней составил -0,73.

Основным белком органического матрикса костной ткани является коллаген, обеспечивающий её прочность, эластичность, участвующий в процессах минерализации и морфогенеза. Содержание коллагеновых белков возрастало по мере созревания костной ткани за период 45-114 суток развития плодов на 21-78%, а в теменной кости в 2 раза. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей [14].

Анализ содержания азота коллагенов в общем азоте костной ткани показывает, что за период внутриутробного развития свиней происходит повышение доли коллагеновых белков, сопровождающееся соответствующим понижением содержания других азотсодержащих компонентов матрикса.

Неколлагеновые белки органического матрикса костной ткани выполняют много-

численные функции, связанные с биосинтезом коллагена и его минерализацией. Известно, что по мере созревания костной ткани общее количество неколлагеновых белков в ней уменьшается. Эта закономерность проявилась в динамике концентрации неколлагеновых белков в нашем эксперименте. Их содержание в 100 г воздушно-сухой ткани снизилось с 12,0-13,8 г у 45-суточных плодов до 4,45-6,29 г у новорожденных поросят. Мы обнаружили отрицательную корреляцию между уровнем неколлагеновых белков в костной ткани и содержанием зольных элементов $r = -0,70$ и кальция $r = -0,85$. Возможно, обладая значительным сродством к кальцию и фосфору, эти белки играют важную роль инициаторов нуклеации, что и связано с их накоплением на ранних стадиях развития кости.

О динамике протеогликанов – белков, содержащих в качестве простетической группы гликозаминогликаны (ГАГ), мы судили на основании определения их углеводных компонентов – гексозаминов и уроновых кислот. Анализ полученных данных свидетельствует о накоплении ГАГ в костной ткани в начальный период эмбриогенеза к 45 суткам развития плода. Это отражает процесс формирования белково-полисахаридного комплекса, составляющего основу органического матрикса на ранних стадиях формирования кости [6]. Затем содержание ГАГ убывало. Прослеживалась обратная зависимость между концентрацией в кости минералов и ГАГ. Коэффициент корреляции содержания кальция и уроновых кислот составил - 0,82, а кальция и гексозаминов – 0,65. Высокая корреляция между уровнем уроновых кислот и воды ($r = +0,85$) свидетельствует от участия ГАГ в водном обмене костной ткани.

Для характеристики взаимосвязи между концентрацией коллагенов и компонентов основного вещества обычно используют коэффициент отношения гексозамин : оксипролин. Наиболее высокие значения этого коэффициента прослеживались у 45-суточных плодов, у которых он составлял 1,45-3,92. К 114 суткам внутриутробного развития этот коэффициент снижался до 0,26-0,73.

Следовательно, этот коэффициент можно использовать для характеристики зрелости костного матрикса.

Поскольку содержание ДНК в клетках одного вида животных относительно постоянно, то по этому показателю судили о числе клеток. Наши исследования показали, что за период антенатального развития количество ДНК в костной ткани значительно увеличилось. Установлена корреляция между содержанием ДНК в костной ткани и уровнем коллагена $r=+0,97$. Полученные данные, по-видимому, указывают на то, что на протяжении эмбрионального развития в костной ткани свиней возрастает число остеобластов, ведущее к повышению биосинтетической активности.

Поскольку уровень и направленность обменных процессов в костной ткани связаны с активностью присутствующих в ней ферментных систем, мы провели изучение некоторых из них. Полагают, что важную роль в минерализации костной ткани и формировании коллагеновых белков играет щелочная фосфатаза. Активность щелочной фосфатазы в ткани исследованных костей возрастала от 45 до 90 суток эмбрионального развития с 6,77-7,66 до 32,00-69,13 мкМ фосфора/мг белка/час. Наличие прямой корреляции $r=+0,92$ между содержанием зольных элементов и активностью щелочной фосфатазы в костной ткани подтверждает важную роль этого фермента в минерализации.

Активность аденозинтрифосфатазы костной ткани свиней, в известной степени отражающей уровень энергетического обмена, возрастала с 3,04-3,93 мкМ фосфора/мг белка/час у 45-суточных плодов до 10-17 мкМ фосфора/мг белка/час у новорожденных поросят, что свидетельствует о значительных энергетических затратах, связанных с оксификацией в плодный период развития свиней. С другой стороны, известно, что Са-АТФ-аза непосредственно включается в транспорт кальция [15,16]. Поэтому значительное повышение активности Са-АТФ-азы, обнаруженное у 90-суточных плодов, по-видимому, можно оценивать как увеличение трансмембранного переноса кальция

в процессе минерализации матрикса. Полученные данные согласуются с результатами опытов Торбенко В.П. [17], которая также наблюдала существенное повышение активности этого фермента в период интенсивного обызвествления кости.

Ключевой реакцией пентозофосфатного пути катаболизма глюкозы, поставляющего организму энергию в форме НАДФН и рибозо-5-фосфат, является дегидрирование глюкозо-6-фосфата, катализируемое глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой. Проведенные нами исследования показали, что активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы костной ткани возрастала в период 45-90 суток развития плодов в 1,5-2 раза. Очевидно, что обнаруженная динамика этого фермента связана с активацией биосинтетических процессов в костной ткани 90-суточных плодов, зависящих от наличия НАДФН.

Повышение активности лактатдегидрогеназы в костной ткани плодов с 0,396-0,935 до 0,817-1,644 мкМ НАД $\times 10^{-1}$ за 1 мин на 1 мг белка за время от 60 до 90 суток плодного развития совпадало с периодом наиболее активного отложения минеральных элементов в костную ткань. Следовательно, высокий уровень энергетических процессов в костной ткани необходим не только для обеспечения формирования структур органического матрикса, но и для его минерализации. Повышение суммарной активности катодных фракций ЛДГ в период 45-60 суток с сохранением их высокого уровня вплоть до 90 суток внутриутробного развития характерно для тканевой гипоксии, которая может служить метаболическим инициатором минерализации хряща [18].

Выводы

В антенатальный период развития свиней наиболее существенное увеличение зольности костей связано с периодом от 45 до 60-90 суток развития плодов. Этот процесс сопровождался дегидратацией скелета, повышением уровня щелочной фосфатазы, Са-АТФ-азы, интенсификацией гликолиза, пентозофосфатного пути, снижением уровня гексозаминов и общего азота костной ткани. Содержание в костной ткани ДНК, коллагеновых белков возрастало, а гликоза-

миногликанов уменьшалось в течение всего плодного периода развития свиней.

Библиографический список

1. Крымова, Т.Г. Определение возраста человека на основе результатов анализа элементного состава костной ткани / Т.Г. Крымова, В.В. Колкутин, А.И. Самарин // Военно-медицинский журнал. – 2008. – Том 329. – №2. – С. 20-28.
2. Накоскин, А.Н. Возрастные изменения и половые различия биохимического состава костной ткани человека: автореферат дис. ... канд. биологических наук / А.Н. Накоскин. Тюмень, 2004. - 23 с.
3. Накоскин, А.Н. Изменение состава костной ткани у людей пожилого возраста / А.Н. Накоскин // Клиническая геронтология – 2007. – Том 13. - №2. – с. 24-26.
4. Reiland, S. Osteochondrosis in the pig / S. Reiland // Stockholm, Acad Avhardling. - 1975.- 188p.
5. Кальницкий, Б.Д. Методы биохимического анализа: справочное пособие / Б.Д. Кальницкий. – Боровск, 1997. – 356 с.
6. Илизаров, Г.А. Формирование органического матрикса дистракционного ренгата кости и особенности его минерализации при удлинении голени в эксперименте / Г.А. Илизаров, В.И. Матвеевко, А.Н. Гайдамак, Ю.И. Ирьянов // Вопросы медицинской химии. – 1982.-Том 28. – № 6. – С. 27-33.
7. Шицкова, А.П. Метаболизм кальция и его роль в питании детей / А.П. Шицкова. – М.: Медицина, 1984. – 112 с.
8. Гайдамак, А.Н. Изменение состава органической матрицы твердых тканей в эмбриогенезе у цыплят / А.Н. Гайдамак, М.И. Ситник // Эволюционная биохимия и физиология. – 1986. – Том 22. - №6. – С. 586-589.
9. Накоскин, А.Н. Содержание макро- и микроэлементов в онтогенезе и в условиях репаративной регенерации кости у собак / А.Н. Накоскин, М.И. Новиков // Травматология и ортопедия России. - 2008. - №1. – С. 38-44.
10. Любина, Е.Н. Минерализация и биомеханические свойства костной ткани у поросят при использовании воднодиспергированных добавок витамина А и бета-каротина / Е.Н. Любина, Б.Д. Кальницкий// Проблемы биологии продуктивных животных. – 2011. - №4. – С. 22 –27.
11. Перестройка минерального матрикса костной ткани / А.С. Аврунин, Н.В. Корнилов, И.Д. Иоффе, В.Г. Емельянов // Морфология. – 2001. - №2. – С. 37-40.
12. Лукьяновский, В.А. Болезни костной системы животных / В.А. Лукьяновский, А.Д. Белов, И.М. Беляков. – М.: Колос, 1984. – 254с.
13. Петрович, Ю.А. Исследования обмена цитрата и карбоната костной ткани крыс при Д-авитаминозе / Ю.А. Петрович // М.: Колос, 1984. – 254с.
14. Стефурак, Ю.П. Особенности формирования коллагеновых белков костной ткани у цыплят бройлеров разных кроссов в онтогенезе: автореферат дисс. ... канд. биологических наук / Ю.П. Стефурак. – Боровск, 1991. – 25 с.
15. Карафоли, Э. Кальциевый сигнал / Э. Карафоли, Пенкистон Дж.Т. // Scientific American . – 1985. – 50с.
16. Северин, Е.С. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности / Е.С. Северин, М.Н. Кочеткова. – М.: «Наука», 1985. – 135 с.
17. Торбенко, В.П. О биохимических процессах посттравматической регуляции костной ткани в обычных условиях и при действии ионизирующей радиации / В.П. Торбенко . – Москва, 1971. – С. 183-188.
18. Shapiro, I.M. Initiation of endochondral calcification as related to changes in the redox state of hypertraphic chondrocytes / I.M. Shapiro, E.E. Colu, S. Kanuta // Science. – 1982. – V.217. - № 4563. – P.950-952