

УДК: 611.711 / 616.8 - 009.2: 001.53

© Сак А.Є., 2009

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ ЛАКТАТДЕГІДРОГЕНАЗИ І ЇЇ ІЗОФОРМ В КЛІТКАХ МІЖХРЕБЦЕВОГО ДИСКА ПРИ РІЗНИХ ЗА ТРИВАЛІСТЮ ДИНАМІЧНИХ НАВАНТАЖЕНЬ

Сак А.Є.

Луганський державний медичний університет; Харківська державна академія фізичної культури

Сак А.Є. Зміни активності лактатдегідрогенази та її ізоформ у клітках міжхребцевого диска при різних за тривалістю динамічних навантажень // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, № 3. – С. 71-75.

Методами гістохімії проведений аналіз змін активності лактатдегідрогенази та її ізоформ у клітках міжхребцевих дисків шурів лінії Вістар після 20- та 90-добової експериментальної бігу. Зміни активності ферментів залежали від віку тварин та тривалості бігу. Загальним напрямком було зниження у клітках міжхребцевого диска активності ЛДГ₁ та ЛДГ₂ ізоформ лактатдегідрогенази, але підвищення активності ЛДГ₃ та ЛДГ₄ ізоформ. Виявлені вікові особливості зміни активності ферментів пропонують використовувати як гістохімічний тест для об'єктивної оцінки ступеня пошкоджувальної дії тривалого бігу на волокнистий хрящ диска.

Ключові слова: міжхребцевий диск, лактатдегідрогеназа, вік, експеримент, біг.

Сак А.Є. Изменения активности лактатдегидрогеназы и ее изоформ в клетках межпозвонкового диска при разных по продолжительности динамических нагрузках // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, № 3. – С. 71-75.

Методами гістохімії проведено аналіз змін активності лактатдегідрогенази та її ізоформ у клітках міжпозвонкових дисків крыс лінії Вістар в умовах 20- та 90-денної експериментальної гіперкінезії. Изменения активности ферментов зависели от возраста животного и длительности бега. Общей направленностью было снижение в клетках межпозвонкового диска активности ЛДГ₁ и ЛДГ₂ изоформ лактатдегидрогеназы, но повышение активности ЛДГ₃ и ЛДГ₄ изоформ. Выявленные возрастные особенности изменения активности ферментов предлагается использовать как гистохимический тест для объективной оценки степени повреждающего действия длительного бега на волокнистый хрящ диска.

Ключевые слова: межпозвонковый диск, лактатдегидрогеназа, возраст, эксперимент, бег.

Sak A.E. Changes of activity of laktatdegidrogenaza and its isophorms in the cells of intervertebral disk in the various conditions of the protracted dynamic loadings // Український морфологічний альманах. – 2009. – Том 7, № 3. – С. 71-75.

By the methods of histochemistry the analysis of changes of activity of laktatdegidrogenaza and its isophorms in the cells of intervertebral disks of rats of Vistar line in the conditions of experimental hyperkinesia is carried out. Changes of activity of laktatdegidrogenaza depended on the age of the animal and duration of running. The general trend was the decline in the cells of intervertebral disk of activity the LDG₁ and LDG₂ isophorms of laktat degidrogenaza but the increasing activity of the LDG₃ and LDG₄ isophorms. It is suggested to use the exposed age-dependent features of change activity of enzymes as a histochemycal test for the objective estimation of degree of damaging action of protracted running loadings on a fibrocartilage of the disk.

Key words: intervertebral disk, laktatdegidrogenaza, age, experiment, running.

Перше десятиліття XXI століття (2000-2010 років) ВОЗ оголосила декадою проблем кістки і суглоба ("The Bone and Joint Decade") [20]. Це пояснюється високою соціальною значущістю ураження кістково-суглобової системи, особливо великих суглобів і хребта [16]. У основі клінічних проявів болю в спині в більшості випадків лежить ураження міжхребцевих (МХ) дисків [11]. Такі випадки зареєстровані в спорті при неадекватному фізичному навантаженні [10,18]. Тому з'ясування адаптаційних можливостей хряща при фізичних навантаженнях є актуальним завданням [12].

Показовою моделлю для вивчення процесів анаеробного й аеробного обміну при різних режимах рухової активності є лактатдегідрогеназна реакція. Є окремі повідомлення про активність цієї реакції в сироватці крові спортсменів [13]. Цінність гістохімічних досліджень – в їх здатності локалізувати біохімічну реакцію і оцінити активність реакції в структурах клітки.

Мета дослідження – методами гістохімії з'ясувати зміну активності лактатдегідрогенази (ЛДГ) і її ізоферментів в клітках МХ дисків при тривалих динамічних навантаженнях у віковому аспекті.

Матеріал і методи дослідження. Для експериментальних досліджень використано 90 шурів-самців лінії Вістар трьох вікових груп: 1, 3 і 12 місяців, відповідних статевонезрілому, пубертатному і старому вікам [8]. Стільки ж тварин було в контролі.

Тварини тренувалися бігом в горизонтальному тредбані з використанням електронного лічильника для визначення довжини пробігу. Шури I групи пробігли протягом 20 днів 10560 м, а II групи - протягом 90 днів – 17280 м.

Для кожного шура дослідженої серії розрахована максимальна швидкість бігу і для всіх вікових груп вибрана однакова швидкість руху стрічки тредбана 40 м/хв. Така швидкість дозволила використовувати в досліді тривалий біг. Тва-

рини контрольної групи знаходилися в звичайних умовах виварію.

Експеримент проводився в осінньо-зимовий сезон. Робота з лабораторними тваринами проводилася відповідно до вимог «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних і інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986 р.), директивою Ради Європейського співтовариства від 24.11.1986 р. і розпорядженням МЗ УРСР N 32 від 22.02.1988 р. [19].

Дослідження проведені з використанням методів макро-мікроскопії, гістології (гематоксін-еозин) і гістохімії.

Гістохімічні реакції поставлені на ферменти, що відображають стан анаеробних систем енергозабезпечення в клітках: лактатдегідрогенази (ЛДГ) (К.Ф.1.1.1.27), її ізоферментів. ЛДГ – фермент анаеробного гліколізу, що каталізує перетворення пірувату на лактат [2,7]. Методом спектрофотометрії зазвичай визначається активність ЛДГ і п'яти її ізоформ. Гістохімічними методами виявлено чотири ізоферменти ЛДГ: ЛДГ₁, ЛДГ₂, ЛДГ₃, ЛДГ₄. Реакції поставлені на заморожених в криостаті зрізах МХ диска, проведених паралельних підставі тіл хребців. Товщина зрізів складала 4-5 мкм. Постановка гістохімічних реакцій здійснювалася з дотриманням однотипних умов [1] і з урахуванням рекомендацій щодо обробки й оцінки результатів гістоензимологічних досліджень [7,17]. Контрольні зрізи інкубували за тих же умов без субстрата.

Кількісна оцінка активності ферментів проведена з урахуванням рекомендацій Крестінської Т.В. і Манусової І.Б. [6] на двопробеному скануючому цитофотометрі МУФ-5. Вимірювання проводилися плаг-методом з використанням зонда діаметром 200 мкм і об'єктиву 50 і при робочій довжині хвилі 546 нм. Показники екстинкції визначалися в п'яти точках цитоплазми кожної клітки, після чого розраховувалося середнє значення. До вимірювань визначалася придатність матеріалу для фотометричних робіт з реєстрацією спектру поглинання на об'єктах різної щільності.

Отриманий цифровий матеріал біометричних і цитофотометричних досліджень оброблений методом варіаційної статистики на сучасному комп'ютерному устаткуванні.

Результати дослідження і їх обговорення.

Після 20-денного бігу тварин в тредбані намічалася зміна орієнтації колагенових волокон і кліток фіброзного кільця МХ дисків. Після 90-денного бігу виявлялися зміни форми, будови і внутрішньої організації МХ дисків. На території фіброзного кільця були разволокнення пучків колагенових волокон, порушення ходу фіброзних пластинок і орієнтації кліток. У вентральних відділах фіброзного кільця з'являлися кровоносні судини, що були орієнтовані продовж фіброзних пластинок. У внутрішніх відділах фіброзного кільця виявлялися ділянки із зміненими тінкторіальними властивостями матриксу. Озна-

ки дистрофічних змін були особливо виражені в МХ дисках молодих і старих тварин.

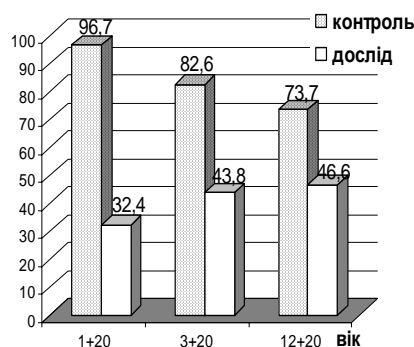
В умовах гіперкінезії змінювалася морфологія кліток фіброзного кільця і активність ферментів. Активність ЛДГ мінювалася, але ступінь змін визначався віком тварин і рівнем фізичного навантаження (мал.1).

У серії 1+20 гіперкінезії в клітках виявлялися темно-коричневі гранули диформазану, щільно розташовані навколо ядра. Клітки внутрішнього шару фіброзного кільця розташовувалися менш впорядковано, ніж у контролі, і місцями — у складі дрібних ізогенних груп. При цьому помічено зниження до 80% кількості активних кліток.

Активність ЛДГ падала в порівнянні з контролем на 66,49%.

У серії 3+20 гіперкінезії щільно розташовані гранули диформазану заповнювали велику частину цитоплазми. Активність ЛДГ знизилася на 46,97%.

У серії 12+20 гіперкінезії виявлено зміна активності ЛДГ на тлі порушення орієнтації кліток і поліморфізму гранул диформазану: серед них з'являлися великі, дрібні і пілоподібні форми. Активність ЛДГ знижувалася на 37,6%.



Мал.1. Гістограма показників активності сумарної ЛДГ в клітках фіброзного кільця після 20-денної гіперкінезії. Вік тварин: 1, 3 і 12 місяців + 20 днів бігу.

Що стосується ізоформ ЛДГ після 20-денного бігу, то їх зміни специфічні (мал. 2).

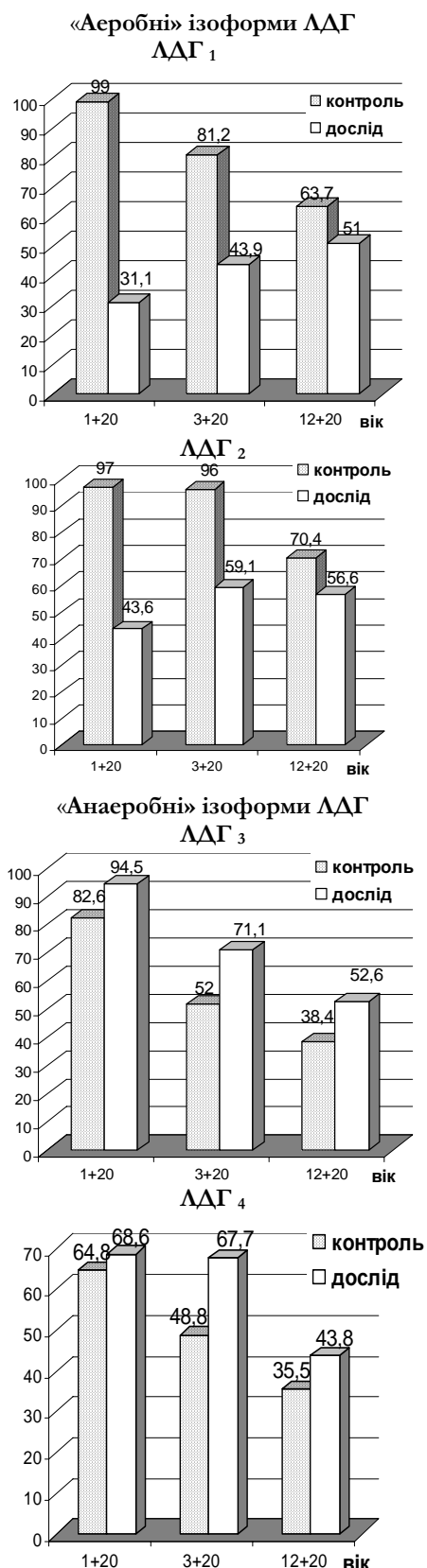
У серії 1+20 гіперкінезії активність ізоферментів ЛДГ змінювалася неоднаково. Значно падала активність ЛДГ₁ (на 68,3%) і ЛДГ₂ (на 55%). У той же час підвищувалася активність ЛДГ₃ (на 12,6%) і менше — активність ЛДГ₄ (на 5,53%).

У результаті, градієнт активності ізоферментів ЛДГ в клітках у 1-місячних щурів після 20-денного бігу складав ЛДГ₃ – ЛДГ₄ – ЛДГ₂ – ЛДГ₁.

У серії 3+20 гіперкінезії з ізоформ ЛДГ знижувалася: активність ЛДГ₁ (на 45,9%) і ЛДГ₂ (на 38,4%), тоді як активність ЛДГ₃ і ЛДГ₄ підвищувалася (на 26,9 і 27,9% відповідно).

Градієнт активності ізоферментів ЛДГ в клітках диска у 3-місячних щурів після 20-денного бігу складав ЛДГ₃ – ЛДГ₄ – ЛДГ₂ – ЛДГ₁.

У серії 12+20 гіперкінезії зміна активності ізоферментів ЛДГ виявлялася: зниженням активності ЛДГ₁ і ЛДГ₂ ізоформ (на 19,9% і 19,6% відповідно) і підвищенням активності ЛДГ₃ і ЛДГ₄ (на 26,9 і 18,9% відповідно).



Мал. 2. Гістограма показників активності ізоферментів ЛДГ в клітках фіброзного кільця диска після 20-денного бігу. Вік тварин: 1, 3 і 12 місяців + 20 днів.

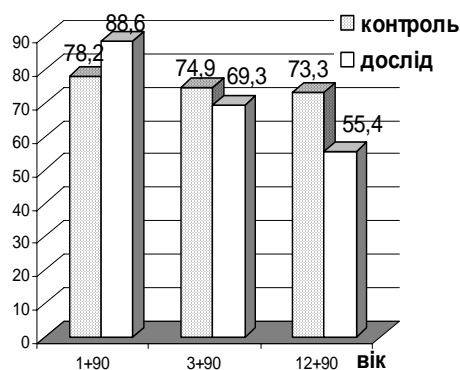
У результаті градієнт активності ЛДГ 12-місячних тварин після 20 денного бігу складав: ЛДГ₂ – ЛДГ₃ – ЛДГ₁ – ЛДГ₄.

Тривалий 90-денний біг викликав зміну активності ЛДГ, яка мала вікові відмінності. Після закінчення експерименту тварини досягли віку 4, 6 і 15 місяців. Особливістю було підвищення активності ЛДГ в МХ дисках тварин, які тренувалися в третбані з 1-місячного віку. У МХ дисках тварин старших вікових груп активність ЛДГ знижувалася (мал.3).

У серії 1+90 гіперкінезії в клітках зовнішнього шару фіброзного кільця виявлялися темно-коричневі гранули диформазану, щільно розташовані навколо ядра. Клітки внутрішнього шару фіброзного кільця розташовувалися менш упорядковано, місцями у складі дрібних ізогенних груп. Активність ЛДГ підвищувалася на 11,7%.

У серії 3+90 гіперкінезії активність ЛДГ знижувалася на 75%. У цитоплазмі з'являлися великі гранули диформазану, розсіяні серед дрібних гранул; останні переважали в ектоплазмі.

У серії 12+90 гіперкінезії активність ЛДГ знижувалася на 24,4%. Гранули диформазану щільно заповнювали ендоплазму й чітко обкреслювали контури ядра; більшість гранул відрізнялися темно-коричневим забарвленням і середніми за величиною розмірами. Розподіл у фіброзному кільці кліток, маркірованих ферментом, було нерівномірним, характерна орієнтація кліток уздовж фіброзних пластинок, властива контролю, була відсутня.



Мал. 3. Гістограма показників активності сумарної ЛДГ в клітках фіброзного кільця диска після 90-денного бігу. Вік тварин: 1, 3 і 12 місяців + 90 днів.

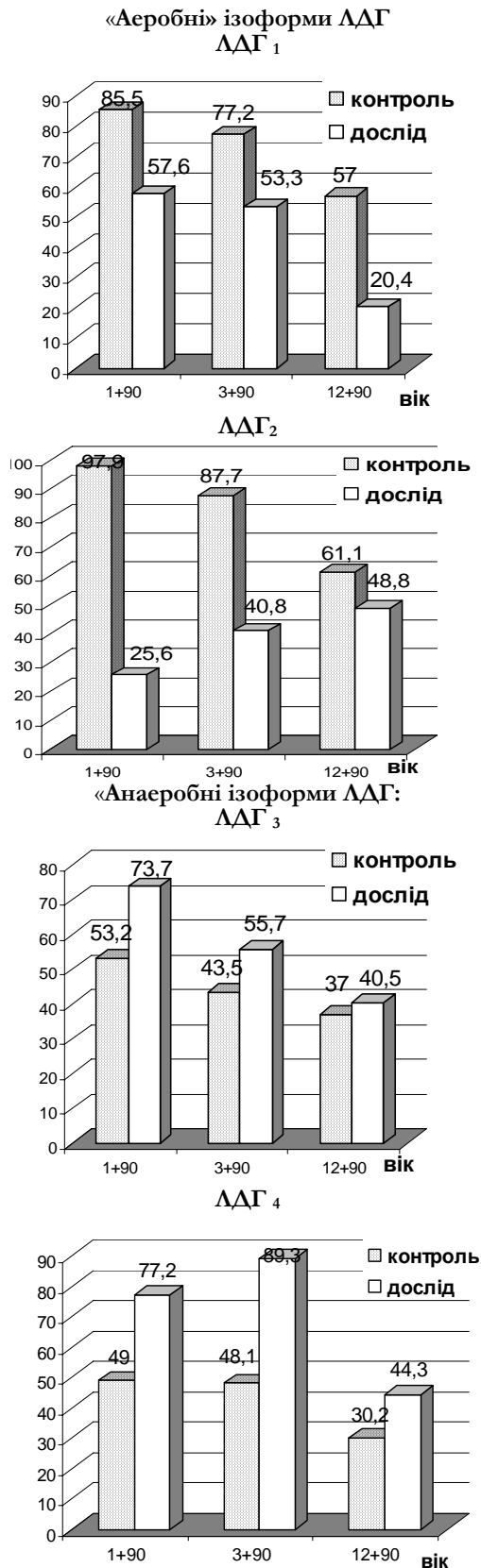
Зміни активності ізоферментів ЛДГ також мали вікові відмінності (мал.4).

У серії 1+90 гіперкінезії активність ізоферментів ЛДГ змінювалася неоднаково. Встановлено зниження активності ЛДГ₁ ізофермента (на 32,6%) і ЛДГ₂ (на 73,8%), але виявлено підвищення активності ЛДГ₃ і ЛДГ₄ ізоферментів (на 27,8 і 6,6% відповідно).

Градієнт активності ізоферментів ЛДГ (в порядку убутання) до кліток МХ дисків 1-місячних щурів після 90-денного бігу мав таку послідовність: ЛДГ₄ – ЛДГ₃ – ЛДГ₁ – ЛДГ₂.

У серії 3+90 гіперкінезії виявлено зміни активності ізоферментів ЛДГ: активність ЛДГ₁ знижувалася на 30,9%, ЛДГ₂ - на 53,5%; у той же час активність ЛДГ₃ підвищувалася на 21,9%, а ЛДГ₄ - на 46,1%.

Градієнт активності ізоферментів ЛДГ 3-місячних щурів після 90-денного бігу: ЛДГ₄ – ЛДГ₃ – ЛДГ₁ – ЛДГ₂.



Мал. 4. Гістограма показників активності ізоферментів ЛДГ в клітках фіброзного кільця після 90-денного бігу. Вік тварин: 1, 3 і 12 місяців + 90 днів бігу.

У серії 12+90 гіперкінезії зміна активності ізоферментів ЛДГ після тривалої гіперкінезії виражалася зниженням активності ЛДГ₁ (на 64,8%) і ЛДГ₂ (на

20,1%) ізоферментів і підвищенні активності ЛДГ₃ (на 8,6%) і значніше - ЛДГ₄ (на 31,8%).

У результаті графіст активності ізоферментів ЛДГ 12-місячних тварин змінювався: ЛДГ₂ – ЛДГ₄ – ЛДГ₃ – ЛДГ₁.

Отже, в умовах тривалих динамічних навантажень зниження активності ЛДГ у статевозрілих тварин супроводжується зміною співвідношення активності її ізоферментів.

У клітках МХ диска молодих тварин після 90-денного бігу чітко виявляється тенденція до зниження активності ЛДГ₁ і ЛДГ₂ ізоформ та підвищенню активності ЛДГ₃ і ЛДГ₄ ізоформ ЛДГ.

У тварин старших вікових груп в умовах гіперкінезії мало місце найбільш значне зниження активності ЛДГ. При цьому аналіз активності ізоформ виявив зниження активності ЛДГ₁, а потім ЛДГ₂ при підвищенні ЛДГ₄ і менш значно – ЛДГ₃ ізоформ. Таким чином, у тварин різних віків є схожість реакції кліток на високі динамічні навантаження, але при певній відмінності в кількісному виразі цих реакцій.

Серед ізоферментів ЛДГ ЛДГ₁ і ЛДГ₂ належать до більш "аеробним" ізоформам, ЛДГ₃ і ЛДГ₄ – до "анаеробних". Підвищення активності анаеробних ізоформ ЛДГ може бути компенсацією падіння активності сумарної ЛДГ в умовах тривалого динамічного навантаження і служити маркером зниження аеробного окислення в системі гліколізу.

Таким чином, в умовах гіперкінезії мали місце зміни активності сумарної ЛДГ, загальною спрямованістю яких було її зниження у тварин зрілого і старшого віку груп з тонкою реакцією ізоферментів на зміну структури і функції міжхребцевих дисків. Тільки у статевонезрілих тварин активність сумарної ЛДГ підвищувалася при тривалому бігу.

При цьому зниження активності сумарної ЛДГ супроводжувалося зниження активності більш "аеробних" ЛДГ₁ і ЛДГ₂ ізоформ, але підвищенням активності більш "анаеробних" ЛДГ₃ і ЛДГ₄ ізоформ ЛДГ.

При цьому зміні метаболізму вуглеводів в умовах тривалої гіперкінезії поєднуються з активацією апоптозу кліток міжхребцевого диска [5] і гіалінового хряща [4]. Активація апоптозу, — процесу природного вибраковування віджилых свій термін кліток, — свідчить про прискорення інволютивних процесів в МХ диску в умовах тривалих динамічних навантажень і розповсюдженні дистрофічного процесу.

Це підтверджує високу механосенситивність не тільки гіалінового [14], але і волокнистого хряща, на фізичне навантаження.

Оцінка активності ЛДГ, особливо її ізоферментного спектру, має високе діагностичне значення і використовується при діагностиці низки захворювань. Проте більшість досліджень заснована на біохімічному аналізі сироватки крові і дають тільки непрямі відомості про внутрішньоклітинний метаболізм в клітках тканин. Представлені гістоензимологічні дані можуть

бути використані при аналізі матеріалу біопсій, можливості отримання якого в даний час підвищуються у зв'язку з розширенням способів діагностики патології хребта [3,11].

Висновок. Гістоензимологічний і цитофотометричний методи є чутливими і точними методами визначення активності ферментів [9,15]. Фіброзне кільце МХ диска побудовано з щільної сполученої і волокнистої хрящової тканини і клітки його мають високу гліколітичну активність. Проведений аналіз активності ЛДГ показав, що динамічне навантаження сприяє біохімічним змінам активності ЛДГ в клітках дисків. Після 20-денного бігу активність сумарної ЛДГ в клітках фіброзного кільця знижувалась у тварин всіх вікових періодів при максимальному зниженні її у молодих щурів. Після 90-денного бігу активність сумарної ЛДГ була більш стійкою; значне зниження її активності виявлено тільки у старих щурів. Щодо ізоферментів ЛДГ, то зміна їх активності мала різноспрямований характер. Характерною реакцією на динамічні навантаження була зміна в клітках співвідношення активності "аеробних" і "анаеробних" ізоформ ЛДГ, що залежали від віку тварин і тривалості бігу.

У нормі в МХ диску найбільш висока активність ЛДГ₂, далі – ЛДГ₁, тобто аеробних ізоформ ЛДГ. Найменша активність – ЛДГ₄ ізоформ ЛДГ. При цьому з віком активність усіх ізоформ ЛДГ знижувалась.

Тривалі фізичні навантаження обумовлювали зниження активності саме аеробних ізоформ – ЛДГ₁ і ЛДГ₂ і особливо, більш ніж вдвоє, у молодих тварин після 20-денного бігу. 90-денний біг теж сприяв зниженню активності аеробних ізоформ і особливо ЛДГ₂, у молодих тварин. Щодо анаеробних ізоформ ЛДГ, то активність їх підвищувалась у щурів досліджених вікових груп і особливо після 90 денного бігу.

Відомо, що при зниженні активності ЛДГ розвивається метаболічний ацидоз, що сприяє порушенню тканин [9]. Пошкодження тканин МХ диска є передумовою пошкодження рухового хребцевого сегмента у цілому. Тому отримані показники активності ЛДГ і, особисто, її ізоферментів можуть служити гістохімічним тестом для об'єктивної оцінки ступеня пошкоджуючої дії тривалого бігу на волокнистий хрящ в різні вікові періоди.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на з'ясування зміни активності ферментів окислювально-відновного циклу в умовах динамічних навантажень для підвищення надійності діагностики стану міжхребцевого диска в умовах фізичних навантажень.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Автандилов Г.Г., Казанцева И.Д., Крутлова И.С. Инструкция по унификации гистологических и гистохимических методов исследования биопсийного и секционного материала.– М.: Медицина, 1978.–51 с.
2. Биохимия / Под ред. чл.-корр.РАН, проф. Е.С. Северина. – 5-е изд., – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.

3. Елифанов В.А., Елифанов А.В. Остеохондроз позвоночника (диагностика, лечение, профилактика). М., 2004. – 272 с.
4. Ковешников В.Г., Кашенко С.А. Апоптоз в костных и хрящевых клетках // Проблемы экологической та медичної генетики і клінічної імунології. – 2000. Вип. 6/32. – С. 17-32.
5. Ковешников В.Г., Сак А.Е. Ультраструктурные изменения клеток межпозвоночного диска при динамической физической нагрузке // Украинский медицинский альманах. – 2006. Т.9, №3. – С. 67-70.
6. Крестинская Т.В., Манусова И.Б. Определение активности дегидрогеназ методом цитофотометрии // Цитология. – 1989. – Т. 11, №1. – С. 128-129.
7. Лушпа Х. Основы гистохимии. Пер. с англ. – М.: Мир, 1980. – 343 с.
8. Махынко В.И., Никитин В.Н. Константа роста и функциональные периоды развития в постнатальной жизни белых крыс / Эволюция темпов индивидуального развития животных. – М.: Наука, 1977. – С. 85-99.
9. Марри Р, Греннер Д, Мейес П., Родуелл В. Биохимия человека. Т. 1. М: Мир. 1993. – С.381.
10. Платонов В.Н. Общая теория подготовки спортсменов в олимпийском спорте. – К.: Олимпийская литература, 1997.– С.220-290.
11. Попелянский Я.Ю. Ортопедическая неврология (вертеброневрология). Руководство для врачей в двух томах. Т II. Этиология, патогенез, диагностика, лечение. – Казань.: Изд. Казанск. ун-та, –1997. – 488 с.
12. Солодков А.С. Адаптация в спорте. Теоретические и прикладные аспекты // Теория и практика физической культуры и спорта. М.: 1990- №5. С. 3-5.
13. Фомин Н.А., Горохов Н.М., Тимошенко Л.В. Особенности активности ферментов сыворотки крови у спортсменов и нетренированных лиц // Теория и практика физической культуры. – 2006, №1. – С. 9-11.
14. Чертенкова С.В. Механосенситивность хряща // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2006, №3. – С.124-129.
15. Циганенко А.Я., Жуков. В.І., Мясослов В.В., Завгородній І.В. Клінічна біохімія. Підручник для студентів медичних ВНЗ. – 2-ге вид. –Х.: Факт, 2005. – 456 с.
16. Отчет о состоянии здравоохранения в мире, 2000 г. Женева, ВОЗ, 2000. Пер. с англ. – М.: Медицина, 2000. – 205 с.
17. Райдер К., Тейлор К. Изоферменты: Пер. с англ.– М.: Мир, 1983.–106 с.
18. Уилмор Д.Х., Девид Л.К. Физиология спорта и двигательная активность. Пер. с англ. / Из-во "Олимпийская литература". Киев, . – 504 с.
19. European convention for the protection of vertebral animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
20. Olmarker K. The Bone and Joint Decade 2000-2010 // Europ. Spine J. – 1998. – № 7. – P. 269-270.

Надійшла 04.04.2009 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін