

Vliv jaterní regenerace na metabolismus kostí dospělých samců potkanů kmene Wistar

K. DOUBKOVÁ¹, I. GRADOŠOVÁ¹, K. ŠVEJKOVSKÁ¹, P. ŽIVNÝ¹,
H. ŽIVNÁ², E. ČERMÁKOVÁ³, V. PALIČKA¹

¹Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN, Univerzita Karlova, Hradec Králové,

²Vivárium a Radioizotopové laboratoře, LF, Univerzita Karlova, Hradec Králové,

³Oddělení výpočetní techniky, LF, Univerzita Karlova, Hradec Králové

SOUHRN

Doubková K., Gradošová I., Švejkovská K., Živný P., Živná H., Čermáková E., Palička V.: **Vliv jaterní regenerace na metabolismus kostí dospělých samců potkanů kmene Wistar**

Cíl práce: Cílem této práce bylo zjistit, zda regenerace jater (po provedení 70% hepatektomie) ovlivňuje metabolismus kostní tkáně u zdravých dospělých samců potkanů kmene Wistar.

Materiál a metody: Potkani byli rozděleni do 5 skupin po 8 zvířatech. První skupinu (KO) tvořila kontrolní zvířata bez břišní operace. Zvířatům ve druhé (24LAP) a třetí (24PH) skupině byla provedena laparotomie, resp. 70% hepatektomie a byla vykrvena 24h po zákroku. Zvířatům ve čtvrté (72LAP) a páté skupině (72PH) byla provedena laparotomie, resp. 70% hepatektomie a byla vykrvena 72h po zákroku. V získaném séru byly metodou ELISA stanoveny koncentrace markerů kostní tvorby: aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) a osteokalcin (OC), dále marker kostní resorpce: karboxylterminální telopeptid kolagenu I (CTx).

Výsledek: Ve skupinách 24PH a 72PH byla v porovnání s kontrolou naměřena nesignifikantně snížená hladina PINP, u skupiny 72PH byla ve srovnání se skupinou 72LAP signifikantně zvýšená hladina CTx. Laparotomie neměla na koncentraci markerů u žádné ze sledovaných skupin vliv.

Závěr: Výsledky tohoto experimentu naznačují, že po provedení 70% hepatektomie dochází ke zvýšené resorpci kostní tkáně. Změny hodnot markerů kostní tvorby jsou nesignifikantní.

Klíčová slova: jaterní regenerace, parciální hepatektomie, kostní markery

SUMMARY

Doubková K., Gradošová I., Švejkovská K., Živný P., Živná H., Čermáková E., Palička V.: **Effect of liver regeneration on bone metabolism in adult male Wistar rats**

Objective: The study aimed at determining whether liver regeneration (after 70% partial hepatectomy) influences bone metabolism in healthy adult male Wistar rats.

Material and methods: Rats were distributed into 5 groups of 8 animals each. The first group were controls with no abdominal surgery. Animals in the second (24LAP) and third (24PH) groups underwent laparotomy and 70% partial hepatectomy, respectively, and were sacrificed 24 hours after the procedure. Animals in groups four (72LAP) and five (72PH) underwent laparotomy and 70% partial hepatectomy, respectively, and sacrificed 72 hours after the procedure. ELISA was used to determine the bone formation markers pro-collagen type I N-terminal propeptide (PINP) and osteocalcin and the bone resorption marker C-terminal telopeptide of type I collagen (CTx) in the obtained serum.

Results: The 24PH and 72PH groups had nonsignificantly decreased PINP levels as compared with controls; the 72PH group had a significantly increased CTx level as compared with 72LAP group. Laparotomy had no effect on marker concentration in any of the groups.

Conclusion: The results suggest increased bone resorption following 70% partial hepatectomy. Changes in bone formation markers are not significant.

Keywords: liver regeneration, partial hepatectomy, bone markers

Osteologický bulletin 2013;18(2):48–52

Adresa: Ing. Kristýna Doubková, Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF UK a FN v Hradci Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, e-mail: doubkova.kristyna@gmail.com

Došlo do redakce: 26. 11. 2012

Přijato k tisku: 28. 6. 2013

Úvod

Játra hrají významnou úlohu v mnoha metabolických pochodech organismu. Jsou odpovědná za metabolismus, syntézu, ukládání i opětovnou redistribuci cukrů, tuků, bílkovin i některých vitamínů. Produkují velké množství sérových proteinů včetně mnoha enzymů a kofaktorů [1]. V reakci na poškození či parciální hepatektomii (PH) disponují játra velkou regenerační schopností. Jasně to ukázali již v roce 1931 Higgins a Anderson na potkanech. Poté, co jim chirurgicky odstranili dvě třetiny jater, sledovali, jak rychle se odejmutá tkáň obnoví. Celý regenerační proces trval přibližně jeden týden [2]. Obnova jater probíhá dvěma různými způsoby. Prvním je klasický vývoj z kmenových a progenitorových buněk, kdy jsou hepatocyty i jiné typy jaterních buněk vytvářeny z buněk kostní dřeně [3,4]. Druhý je potom spíše hyperplastický proces, během něhož dochází k replikaci téměř všech zbylých zralých a funkčních buněk [5]. Parciální hepatektomie či poškození jater spouští simultánně několik signálních cest. Díky nim, přibližně 95 % jaterních buněk, které byly předtím v klidovém stavu (fázi G0), přechází přes fázi G1 do S-fáze buněčného cyklu. To vede ke zvýšené syntéze DNA a následnému dělení buněk. U potkanů se podíl nově vzniklé DNA začíná zvyšovat asi 12 hodin po parciální hepatektomii. Vrchol syntézy nastává přibližně 24 hodin po PH. (U neparenchymálních buněk je to o něco později.) Většina tkáně je obnovena do 3 dnů po zákroku, celá jaterní hmota potom do pěti až sedmi dnů [6] (*obr. 1*).

Kost je metabolicky velmi aktivní orgán podléhající neustálé přestavbě. Starší kostní tkáň je aktivitou osteoklastů odbourávána a resorbována, aktivované osteoblasty syntetizují kostní matrix, která je následně mineralizována [7]. Na

různé podněty reaguje kostní metabolismus velmi pružně a rychle. Například na změny sérových koncentrací PTH či vápníku odpovídá v řádu minut a hodin [8,9].

Pro monitorování kostního metabolismu jsou využívány především ukazatele obratu organické složky kosti, jako je aminoterminální propeptid prokolagenu typu I (PINP), osteokalcin (OC) a C terminální telopeptid kolagenu I (CTX).

Aminoterminální propeptid prokolagenu typu I vzniká odštěpením N-terminální části prokolagenu během přeměny prokolagenu na kolagen. Ač není zcela specifický pro kost, přesto se ve studiích na potkanech ukázal jako vhodný marker k posouzení kostní novotvorby. Jeho koncentrace v séru dobře koreluje s expresí genů, spojených s tvorbou kosti a následnou změnou kostní hustoty [10,11,12,13].

Osteokalcin je druhý nejhojnější protein kostní matrix. Některé studie jej považují nejen za marker kostní tvorby, ale také resorpce. Jelikož je vázán v kostní matrix, může být uvolňován do cirkulace i během odbourávání kosti [14].

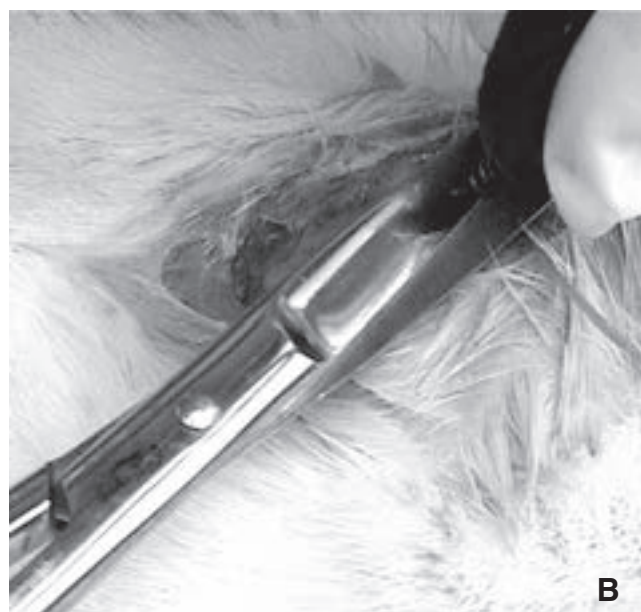
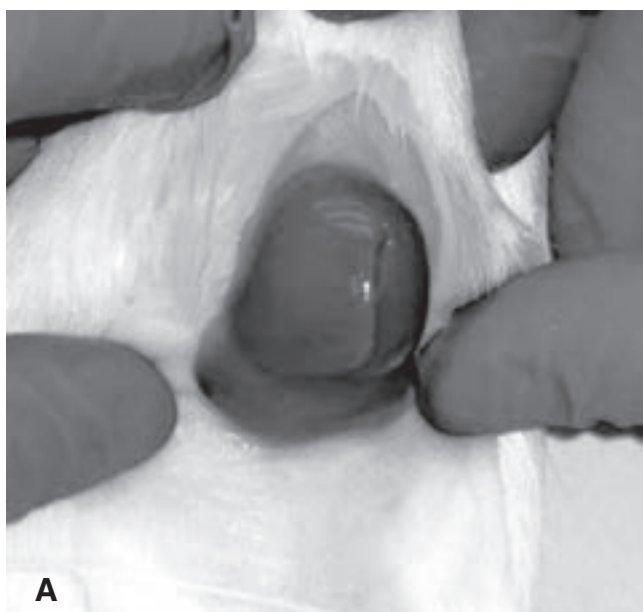
C-terminální telopeptid kolagenu I je krátký aminokyselinový řetězec, pocházející z nehelikálního konce molekuly kolagenu. Během degradace kolagenu je uvolňován z kostní hmoty, a je tedy možné považovat jej za marker kostní resorpce [15,16].

Kostní tkáň je ovlivňována mnoha faktory, mezi které patří již zmíněné změny v sérových koncentracích vápníku a PTH, podávání glukokortikoidů [17] a dalších typů léků [18,19], dále např. imobilizace či malabsorpce [20,21]. Cílem této práce bylo zjistit, do jaké míry je kost ovlivněna také masivní regenerací jater po provedení 70% hepatektomie. Účast na regeneraci poškozených tkání, např. svalů, mozku a především jater, byla totiž dosud v literatuře připi-

Obr. 1

Provedení parciální hepatektomie u potkana kmene Wistar.

Po provedení laparotomie se tlakem vybaví jaterní laloky (A), provede se podvaz, odstranění laloků nad podvazem (B), sešítí operační rány po vrstvách



sována pouze buňkám kostní dřeni [22,23,24]. Tímto experimentem byla otevřena otázka, zda se těchto regeneračních procesů neúčastní také jiné složky kostní tkáně.

Materiál a metody

Protokol pokusu byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání LF UK v Hradci Králové. K pokusu byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (Biotest, s. r. o., Konárovice, ČR). Chováni byli ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (LF UK HK), umístění po 4 v plastových klecích za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30–70 %). Krmení byli standardní laboratorní dietou (ST-1, VELAS, a. s., Lysá nad Labem, ČR) a pitnou vodou *ad libitum*.

Potkani byli rozděleni do pěti skupin po osmi zvířatech. První skupinu (KO) tvořila kontrolní zvířata bez břišní operace. Zvířatům ve druhé skupině (24LAP) byla provedena laparotomie a byla usmrcena 24h po zákroku. Ve třetí skupině (24PH) byla zvířatům provedena 70% hepatektomie a byla usmrcena 24h po zákroku. Zvířatům ve čtvrté (72LAP) a páté skupině (72PH) byla provedena laparotomie, resp. 70% hepatektomie a byla usmrcena 72h po zákroku. Usmrcení bylo provedeno odběrem krve z bifurkace břišní aorty. Operační zákroky i usmrcení všech potkanů proběhlo v éterové anestezii.

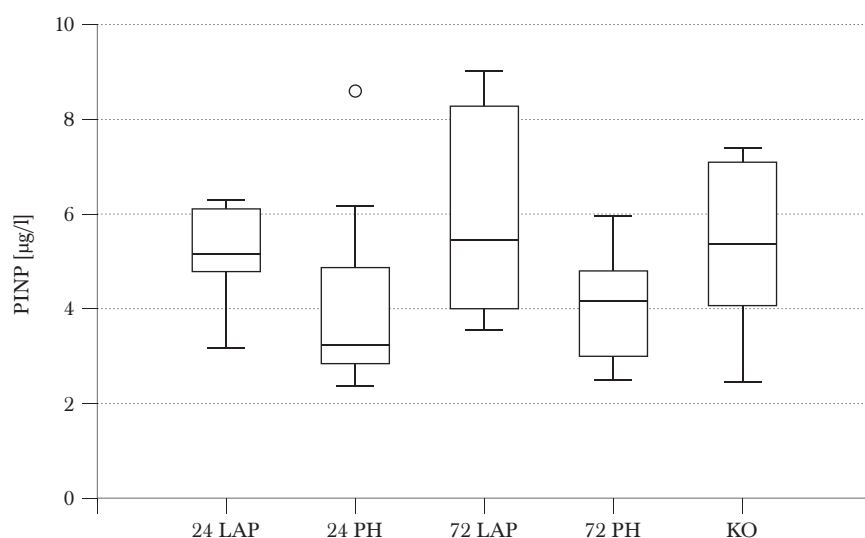
Z odebrané krve bylo získáno krevní sérum. V něm byly metodou ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) stanoveny koncentrace markerů kostního obratu: aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP, $\mu\text{g/l}$, Immunodiagnostic Systems Ltd.) a MID-osteokalcinu (OC, $\mu\text{g/l}$, Immunodiagnostic Systems Ltd.) jako ukazatelů kostní tvorby a karboxyterminálního oktapeptidu kolagenu I (CTX, $\mu\text{g/l}$, Immunodiagnostic Systems Ltd.) jako markeru kostní resorpce.

Statistická analýza naměřených hodnot kostních markerů byla provedena pomocí programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA) Kruskal Wallisovou neparametrickou ANOVOU a následným mnohonásobným porovnáním s použitím Bonferroniho korekce. Výsledky byly vyjádřeny jako medián, 25. a 75. percentil. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Graf 1

Porovnání sérové koncentrace markeru kostní tvorby aminoterminálního propeptidu prokolagenu typu I (PINP) mezi jednotlivými skupinami zvířat.

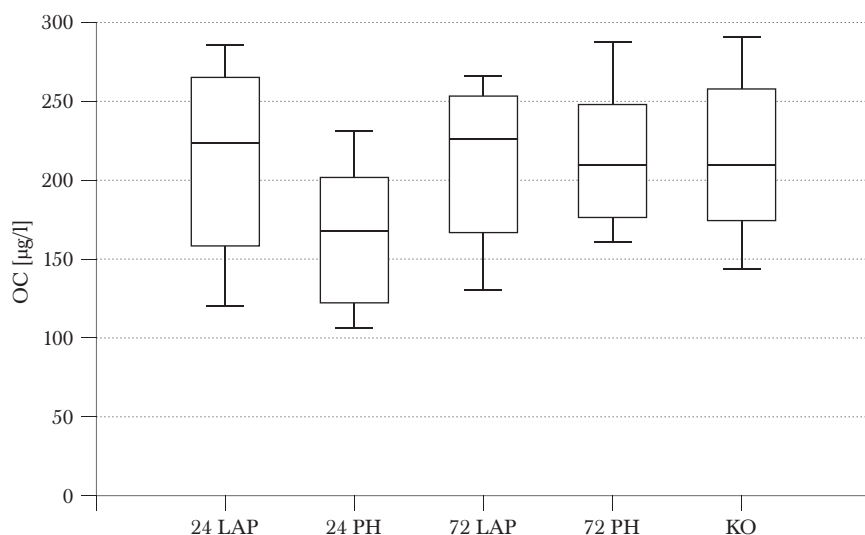
24LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 24h po zákroku;
24PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 24h po zákroku;
72LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 72h po zákroku;
72PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 72h po zákroku;
KO – kontrolní skupina bez břišní operace



Graf 2

Porovnání sérové koncentrace markeru kostního obratu osteokalcinu (OC) mezi jednotlivými skupinami zvířat.

24LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 24h po zákroku;
24PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 24h po zákroku;
72LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 72h po zákroku;
72PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 72h po zákroku;
KO – kontrolní skupina bez břišní operace



Výsledky

Při porovnání hladin PINP ve skupinách po chirurgickém zákroku a v kontrolní skupině se koncentrace tohoto markeru statisticky významně nelišila. Nicméně jak skupina 24PH, tak i skupina 72PH vykazovala nesignifikanční pokles hladin PINP ve srovnání s kontrolní skupinou (KO) a skupinami po laparotomii (24LAP a 72LAP) (graf 1).

Také koncentrace OC byla ve skupině 24PH nesignifikančně snížena vůči skupině KO. Skupina 72PH se ve srovnání s kontrolní skupinou a skupinou 72LAP takřka nezměnila. Ani u dalších měřených skupin nebyla zjištěna signifikantní změna hladin OC (graf 2).

Ve skupině 72PH byla vůči skupině 72LAP statisticky významně zvýšena koncentrace CTx. Při srovnání skupiny 72PH s kontrolní skupinou se hladina CTx zvýšila nesignifikančně. Ve skupinách KO, 24LAP a 24PH se koncentrace markeru téměř nelišila (graf 3).

Diskuze

Cílem této práce bylo stanovit, do jaké míry je kost ovlivněna masivní jaterní regenerací. Na zdravých potkanech kmene Wistar byla provedena 70% hepatektomie nebo laparotomie. Laparotomie nezměnila hladinu žádného ze sledovaných markerů kostního obratu. U potkanů po parciální hepatektomii, těžkém operačním traumatu s nutností významné regenerace, byly změny v koncentraci kostních markerů nalezeny, avšak většinou pouze nesignifikanční.

Hladina markeru kostní tvorby PINP byla nesignifikančně snížena po 24 i 72 hodinách. Zdá se tedy, že po parciální hepatektomii je tvorba nové kostní tkáně modifikována tak,

aby nebránila, či lépe podpořila jaterní regeneraci. Tvorba prokolagenu v osteoblastech může být částečně utlumena. Zároveň je ale možné, že prokolagen nutný pro tvorbu kosti je spotřebován při regeneraci jater.

Koncentrace CTx, markeru kostní resorpce, byla zvýšena, ale až ve skupině usmrčené po 72 hodinách. Potkan je schopen velice rychle (za tři dny) obnovit většinu své jaterní tkáně [6]. Je tedy možné, že pro nedostatek jiného stavebního materiálu dojde také k resorpci kostní hmoty.

Osteokalcin, který je většinou považován za marker kostní tvorby, byl shodně s PINP nesignifikančně snížen po 24 hodinách. Avšak ve skupině usmrčené po 72 hodinách jeho hladina opět odpovídala kontrolní skupině. Podle Ivaska et al. je OC markerem nejen kostní tvorby, ale i resorpce. Je totiž vázán na hydroxyapatit kostní matrix, a může tedy být uvolňován do cirkulace také během odbourávání kosti. Pokud je kostní tkáň 72 hodinách po PH odbourávána, jak ukazují zvýšené koncentrace CTx, mohlo by to vést také k opětovnému zvýšení OC.

Závěr

Samcům potkanů kmene Wistar byla provedena laparotomie či 70% hepatektomie a následně (po 24 a 72 hodinách) stanoveny markery kostního obratu. Laparotomie neměla na koncentraci markerů žádný vliv. U potkanů po parciální hepatektomii byla naměřena nesignifikančně snížená hladina markeru kostní tvorby PINP a po 72 hodinách ve srovnání se skupinou 72LAP signifikantně zvýšená hladina markeru kostní resorpce CTx.

Výsledky získané v tomto experimentu naznačují, že po provedení 70% hepatektomie dochází ke zvýšené resorpci kostní tkáně. K potvrzení našich výsledků bude nutno další studium této problematiky.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MZO 00179906.

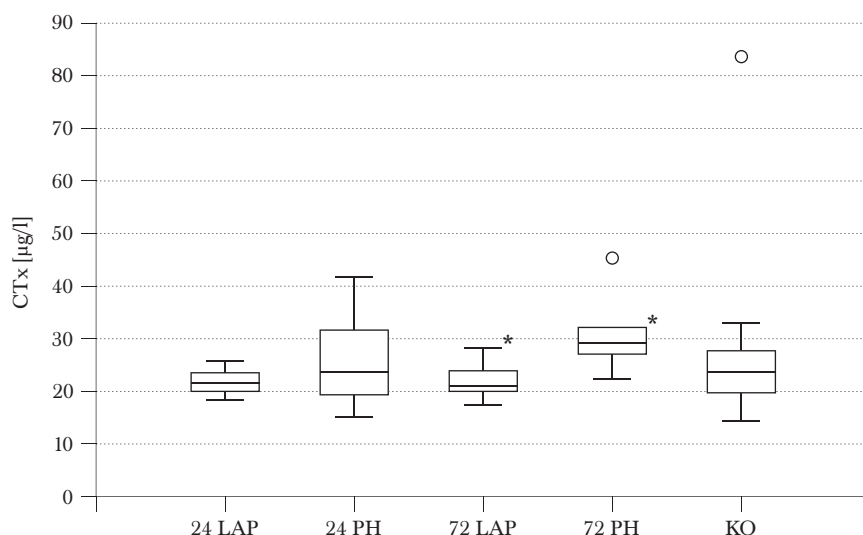
Literatura

1. Zakim D, Boyer TD. Hepatology: A textbook of liver disease. 4th ed. Philadelphia, Saunders 2003; pp 31–48.
2. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch Pathol 1931;12:186–202.
3. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 1999;284:1168–1170.
4. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 2000;6:1229–1234.
5. Taub R. Liver regeneration: From myth to mechanism. Nature 2004;5:836–847.
6. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: autoradiography with thymidine-H. Cancer Res 1962;22:842–849.
7. Palička V, Živný P, Friedecký B. Patobiochemie kostního metabolismu a možnosti sledování metabolického obratu kostní tkáně. Prakt Gyn 2003;2:6–7.

Graf 3

Porovnání sérové koncentrace markeru kostní resorpce karboxyterminálního telopeptidu kolagenu I (CTx) mezi jednotlivými skupinami zvířat.

24LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 24h po zákroku;
24PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 24h po zákroku;
72LAP – skupina po laparotomii, PINP měřen 72h po zákroku;
72PH – skupina po parciální hepatektomii, PINP měřen 72h po zákroku;
KO – kontrolní skupina bez břišní operace; *p < 0,05



8. Zikan V, Stepan J. Marker of bone resorption in acute response to exogenous or endogenous parathyroid hormone. *Biomarker Insights* 2008;3:19–24.
9. Zikan V, Stepan J. Plasma type I collagen cross linked C telopeptide: a sensitive marker of acute effects of salmon calcitonin on bone resorption. *Clin Chim Acta* 2002;316:63–69.
10. Hale LV, Galvin RJ, Risteli J, Ma YL, Harvey AK, Yang X, Cain RL, Zeng Q, Frolik CA, Sato M, Schmidt AL, Geiser AG. PINP: A serum biomarker of bone formation in the rat. *Bone* 2007;40:1103–1109.
11. Merry AH, Harwood R, Wooley DE, Grant ME, Jackson DS. Identification and partial characterisation of the non collagenous amino- and carboxy terminal extension peptides of cartilage procollagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71:83–90.
12. Rissanen JP, Suominen MI, Peng Z, Morko J, Rasi S, Risteli J, Halleen JM. Short term changes in serum PINP predict long term changes in trabecular bone in the rat ovariectomy model. *Calcif Tissue Int* 2008;82(2):155–161.
13. Seidel MJ. Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005;26(4):97–122.
14. Ivaska KK, Hentunen TA, Vääräniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Väänänen KK. Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Biol Chem* 2004;279(18):18361–18369.
15. Hassager C, Jensen LT, Podenphant J, Thomsen K, Christiansen C. The carboxy terminal pyridinoline cross linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: The effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy. *Calcif Tissue Int* 1994;54:30–33.
16. Risteli J, Elomaa I, Niemi S, Novamo A, Risteli L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross linked carboxy terminal telopeptide of type I collagen: A new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993;39:635–640.
17. den Uyl D, Bultink IE, Lems WF. Glucocorticoid induced osteoporosis. *Clin Exp Rheumatol* 2011;5, Suppl 68:93–98.
18. Gradošová I, Švejková K, Živná H, Živný P, Čermáková E, Tichý A, Palička V. Vliv metoprololu na kostní tkáň u dospělých samců potkanů kmene Wistar. *Osteologický bulletin* 2011;1:3–7.
19. Zikan V, Stepan J. Marked reduction of bone turnover by alendronate attenuates the acute response of bone resorption marker to endogenous parathyroid hormone. *Bone* 2009;44:634–638.
20. Liu Ch, Baylink DJ, Wergedal JE. Immobilization and its effect on bone repletion in calcium deficient rats fed a high calcium diet. *Metab Bone Dis Relat Res* 1978;1(3):269–276.
21. Sanchez MI, Mohaidle A, Baistrocchi A, Matoso D, Vazquez H, Gonzalez A, Mazure R, Maffei E, Ferrari G, Smecuol E, Crivelli A, de Paula JA, Gomez JC, Pedreira S, Maurino E, Bai JC. Risk of fracture in celiac disease: gender, dietary compliance, or both? *World J Gastroenterol* 2011;17(25):3035–3042.
22. Hideaki F, Tetsuro H, Shoshiro O, Kentaro Y, Hisaya A, Takahisa F, Masaya N, Yoshio Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of hepatology* 2002;36:653–659.
23. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A et al. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528–1530.
24. Ono K, Takii T, Onozaki K, Ikawa M, Okabe M, Sawada M. Migration of exogenous immature hematopoietic cells into adult mouse brain parenchyma under GFP expressing bone marrow chimera. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262(3):610–614.