

Mineralizacja tkanki kostnej

PIOTR KUROPKA, JAN KURYSZKO, SYLWIA MAZURKIEWICZ-ŁYCZEWSKA

Zakład Histologii i Embriologii, Katedra Anatomii i Histologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, AR Wrocław,
ul. Kożuchowska 5, 51-631 Wrocław

Kuropka P., Kuryszko J., Mazurkiewicz-Łyczewska S.

Bone mineralization

Summary

The study looked at various different authors' opinions on the process of bone mineralization. Its aim was to induce the mineralization of decalcified bones *in-vitro*. The study used dog, sheep as well as human bones which were subjected to decalcification after a preliminary analysis of their composition of elements using a scanning electron microscope equipped with an X-ray probe. Following this, re-mineralization was attempted by submersion in a replete solution of calcium phosphate and free vaporization of the water in a temperature of 35°C. This resulted in attaining crystals which were not hydroxycapatite on the bone's surface. The study indicated that simple chemical phenomena cannot be the main factor causing bone mineralization.

Keywords: bones, mineralization

Zainteresowanie zjawiskiem mineralizacji tkanki kostnej jest w obecnej chwili niewielkie. Natomiast schorzenia metaboliczne organizmu czy też aparatu ruchu wywołujące zmiany w kościach są przedmiotem licznych badań naukowych. W wyniku braku rozumienia podstawowych zjawisk mineralizacji kości proponuje się różne metody ich leczenia, które nie mają istotnego przełożenia na procesy czynnościowo-morfologiczne.

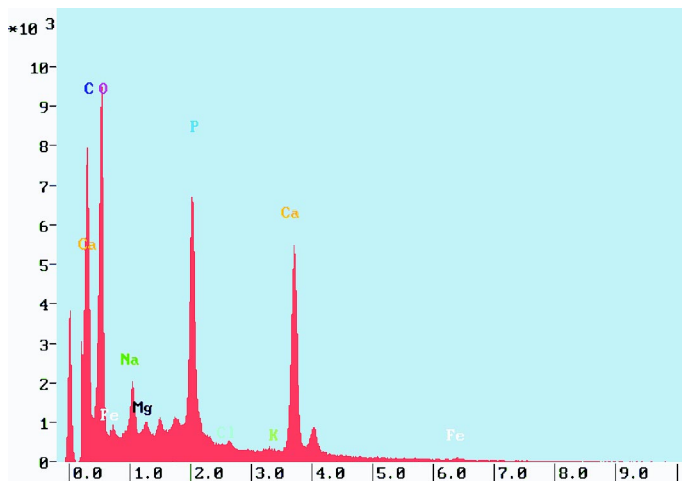
Proces mineralizacji zależy od wielu czynników hormonalnych, witamin czy też niezbędnych pierwiastków. Związane z tym nieprawidłowości w żywieniu, fizjologii wchłaniania czy wydalania dość łatwo może je zaburzyć. Według jednych autorów jest to proces fizykochemiczny (9), według innych w znacznej mierze uzależniony i kontrolowany przez komórki tkanki kostnej na drodze dwóch niezależnych działań (6, 8, 10). Pierwszym jest inicjacja procesu mineralizacji poprzez wydzielenie pęcherzyków macierzy, drugim szeroko pojęta kontrola składu macierzy międzykomórkowej (w tym płynu śródtkankowego) i wpływanie w ten sposób bezpośrednio lub pośrednio na wzrost kryształów w obszarze kontrolowanym przez grupę osteocytów, dzięki czemu stale wzrasta gęstość kości, aż do śmierci komórek, kiedy indukowany jest lokalnie proces przebudowy tkanki kostnej. Ponieważ jest on kontrolowany przez hormony i witaminy, a jego efektem jest wzrost lub spadek poziomu jonów wapnia we krwi, uważa się, że jest to główny proces związany z homeostazą tego pierwiastka w organizmie (6-8).

Fenomen mineralizacji wydaje się już poznany, pozostaje jednak nie do końca wyjaśniony zakres wpływu poszczególnych czynników na skład mineralny

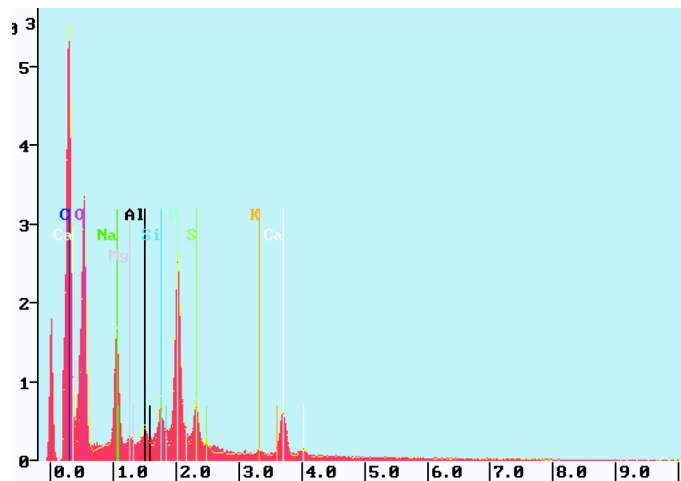
macierzy oraz jej stopień wysycenia. Do dziś nie wiadomo, czy może dochodzić w warunkach *in vivo* do „wypłukania”, a następnie do remineralizacji macierzy międzykomórkowej tkanki kostnej. Niektórzy autorzy uważają, że takie odwapnianie kości ma miejsce stale w organizmie, co w konsekwencji doprowadza do zwyrodnień, w tym do osteoporozy i osteopenii (2, 4, 7, 8, 10).

Inicjacja mineralizacji jest związana z wytworzeniem przez komórki tzw. „pęcherzyków macierzy”, które są małymi (0,1-0,2 μm), pozakomórkowymi pęcherzykami wybiórczo umieszczonymi w macierzy międzykomórkowej spotykanych w płytce wzrostu chrząstki nasadowej kości długich, rozwijającej się kości oraz kostninie (1, 3, 10). Pęcherzyki te zawierają liczne enzymy (fosfataza zasadowa, ATP-aza zasadowa oraz pirofosfataza), białka oraz lipidy, które oddziaływując między sobą doprowadzają do rozpoczęcia mineralizacji. Inicjacja mineralizacji rozpoczyna się na wewnętrznej powierzchni pęcherzyków, gdzie powstają pierwsze kryształy hydroksyapatytu w kształcie cienkich igiełek, które rosnąc powoli, zmieniają kształt pęcherzyków macierzy, aby w konsekwencji doprowadzić do ich rozerwania. Błona zewnętrzna pęcherzyków jest biologicznie aktywna, co oznacza, że ma ona zdolność do wybiórczego rozpoznania miejsca zakotwiczenia w macierzy międzykomórkowej (1, 3).

Pierwsza faza jest więc procesem złożonym interakcji pomiędzy cząsteczkami wiążącymi wapń a enzymami biorącymi udział w przemianach fosforu zlokalizowanych w okolicy błony pęcherzyków macierzy. Faza druga rozpoczyna się w momencie kontaktu



Ryc. 1. Przykładowy wykres składu pierwiastkowego kości psa przy użyciu mikrosondy rentgenowskiej



Ryc. 2. Wykres składu pierwiastków kości po odwapnieniu

nowo powstałego kryształu na płyn śródtkankowy. Staje się on wówczas jądrem krystalizacji, wokół którego na jego powierzchni rozpoczyna się wzrost kryształu poprzez wytrącanie kolejnych warstw jonów wapnia i fosforu.

Mineralizacja jest więc procesem fizykochemicznym, w znacznym stopniu uzależnionym od składu płynu śródtkankowego, w tym białek kolagenowych oraz niekolagenowych. O roli, jaką odgrywają te białka, niech świadczy fakt, że osteokalcyna, białko wydzielane przez osteoblasty w późnej fazie różnicowania, wiążąc się z wapniem na powierzchni hydroksyapatytu, hamuje wzrost kryształu, jednocześnie stając się czynnikiem chemotaktycznym dla osteoklastów (2, 5, 6).

Przedstawiony mechanizm wskazuje, że ostateczny skład oraz stopień mineralizacji jest uzależniony od komórek pozostających w tkance kostnej, będąc jednocześnie odbiciem stanu metabolicznego całego organizmu. Powracające dyskusje dotyczące metabolizmu wapnia, w których pomijane bądź też nadmiernie eksponowane są zjawiska zachodzące w kościach, doniesienia o zjawisku nadmiernej mineralizacji blaszek kostnych po śmierci komórek kostnych oraz liczne własne obserwacje skłoniły nas do przeprowadzenia licznych badań porównawczych z zakresu mineralizacji tkanki kostnej u zwierząt wraz z próbą wywołania zjawiska remineralizacji włókien kolagenowych w warunkach *in vitro*.

Materiał i metody

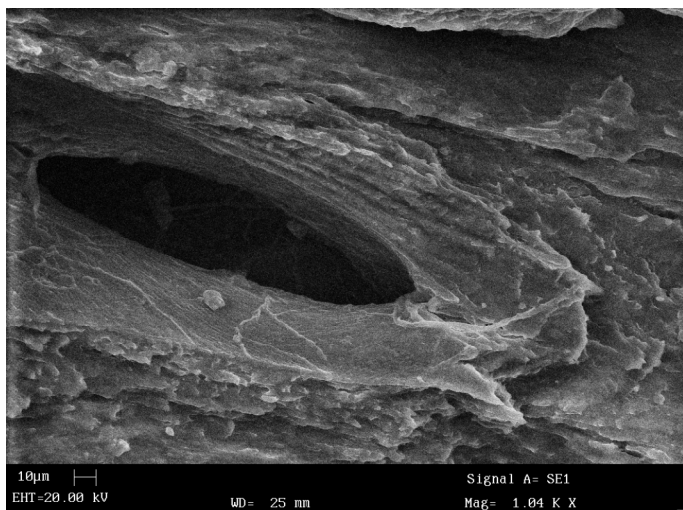
Badania wykonywano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej przy pomocy skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) Zeiss 435VP wyposażonego w mikrosondę rentgenowską. Materiał do badań (18 sztuk) pochodził z trzonów kości długich (udowej i piszczelowej) zdrowych psów, owiec oraz człowieka w różnym wieku pozostałych w Zakładzie po innych badaniach, które po wcześniejszej mikroanalizie rentgenowskiej były odwapniane w werse-

niowanie dwusodowym (EDTA), a następnie zanurzone w roz-

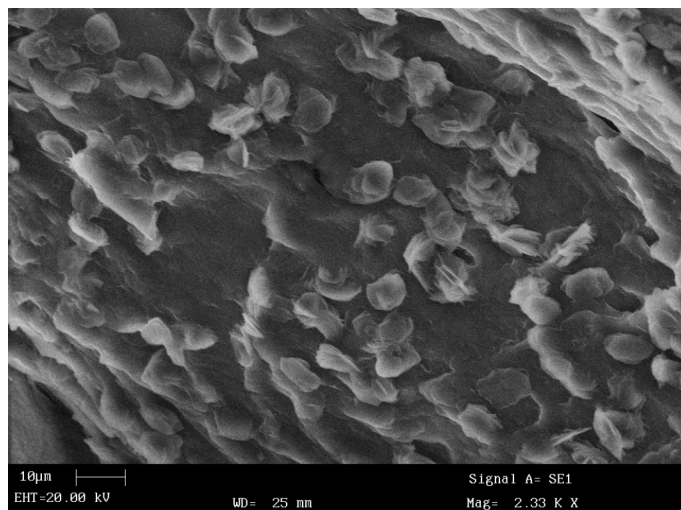
tworze nasyconym fosforanu wapnia, który był poddany powolnemu odparowywaniu wody w temperaturze 35°C. Następnie materiał był suszony w punkcie krytycznym i analizowany w SEM. Obiekty wykazujące budowę krystaliczną analizowano przy pomocy mikrosondy rentgenowskiej. Wykonany mapping pierwiastków miał na celu zobrazowanie rozkładu przede wszystkim wapnia, fosforu oraz węgla. Analizowano dodatkowo ilościowy skład pierwiastków w próbkach i określano właściwe dla gatunku stosunki wapnia do fosforu (Ca/P).

Wyniki i omówienie

Dysponując relatywnie niewielką ilością materiału o dużym zróżnicowaniu, trudno było przeprowadzić dokładne badania mineralizacji kości człowieka oraz zwierząt, analizując je pod kątem wieku, płci czy też sposobu odżywiania. Materiał od ludzi pochodził od osób w wieku 60-70 lat, od psów – 2-17 lat, a od owiec – tylko od samic w wieku 3 lat. Istotne jest, że we wszystkich próbkach obserwowane kryształy powstałe w wyniku remineralizacji zachodzącej na powierzchni odmineralizowanych włókien kolagenowych tkanki kostnej nie były hydroksyapatytami. Najczęściej były to kalcyty oraz syderyty (ryc. 3, 4). Uważamy, że syderyty powstały w największym stopniu jako artefakty, gdyż żelazo w tych warunkach musiało pochodzić ze zhemolizowanych erytrocytów. Kalcyty natomiast notowano niemal w każdym przypadku. Duże i małe kryształy tych minerałów układały się na powierzchni kości pomiędzy włóknami kolagenowymi poszczególnych blaszek kostnych. Ich rozmiary wahały się od 10 do 150 μm . Wykonany mapping nie wykazał istotnego powiązania atomów wapnia i fosforu w próbkach. Interesujący jest fakt, że również w kościach nie poddanych żadnej obróbce nie udało się stwierdzić uporządkowanego rozmieszczenia wapnia i fosforu typowego dla kryształów hydroksyapatytu. Wykonana wcześniej analiza składu pierwiastkowego wykazała, że we wszystkich przypadkach dominującymi pierwiastkami były: C, O, Ca, P oraz niewielkie ilości Mg,



Ryc. 3. Skaningogram odwapnionej kości człowieka. Widoczny fragment naczynia oraz włókna kolagenowe. SEM pow. 1000 ×



Ryc. 4. Skaningogram odwapnionej kości owcy po próbie wywołanej remineralizacji. Widoczne na powierzchni kości kalcyty powstały po wolnym odparowaniu wody z zawiesiny fosforanu wapnia. SEM 2300 ×

Zn, Na, Fe (ryc. 1). Uzyskane tą metodą relacje stosunku wapnia do fosforu (Ca/P) wykazały, że najniższym średnim wskaźnikiem charakteryzowały się kości psów – 1,3, człowieka – 1,41, a najwyższym owcy – około 1,49, przy czym w kościach człowieka występowały największe zróżnicowania, zarówno w mikroobszarach, jak i porównując kości w różnym wieku oraz płci. U zwierząt brak ww. fluktuacji może być spowodowany relatywnie krótkim czasem życia, gdyż nawet u relatywnie starego psa (17 lat) czas związany z zaistnieniem istotnych zmian w kościach może być zbyt krótki w porównaniu z człowiekiem. W kościach poddanych procesowi remineralizacji, poza obszarami występowania kalcytów, dominującym pierwiastkiem, obok węgla i tlenu pozostał fosfor, którego zawartość w kościach kilkukrotnie przewyższała zawartość wapnia (ryc. 2).

Reasumując, przeprowadzone badania metodą odparowywania wody z nasyconego roztworu fosforanu wapnia w obecności odmineralizowanej kości nie można doprowadzić do remineralizacji macierzy tkanki kostnej, co sugeruje, że proste zjawiska fizykochemiczne nie mogą być główną przyczyną fenomenu przemian wapnia w kościach. Jednocześnie nie można wykluczyć, że w tak prostym eksperymencie zabrakło kilku istotnych czynników, takich jak regulacja pH czy też wymuszony przepływ płynów spowodowany naprężeniami czynnościowymi, na jakie jest narażona kość w trakcie pełnienia swojej funkcji.

Piśmiennictwo

1. *Bonucci E.*: Electron microscope studies of the early stage of the calcification process: role of matrix vesicles. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1989, 295, 109-114.
2. *Glimcher M. J.*: The structure of mineral component of bone and the mechanism of calcification, [w:] *Coe F. L., Favus M. J.*: Disorders of bone and mineral metabolism. Raven Press, New York 1992.
3. *Harada K., Oida S., Sasaki S.*: Chondrogenesis and osteogenesis of bone marrow-derived cells by bone – inductive factor. *Bone* 1988, 9, 177-183.
4. *Kokot F., Ficek R.*: Regulacja gospodarki wapniowej. Nowe aspekty patofizjologiczne. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2000, 104, 621-630.

5. *Lindholm T. S., Nilsson O. S., Lindholm T. C.*: Extraskelletal and intraskelletal new bone formation induced by demineralized bone matrix combined with bone marrow cells. *Clin. Orthop.* 1982, 171, 251-255.
6. *Mundy R. G., Martin T. J.* (ed.): Physiology and pharmacology of bone. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1993.
7. *Murray J., Gagel R. F., Christakos S., Kleerekoper M., Shane E., Langman C., Stewart A., Whyte M.*: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism; Lippincott-Raven, Philadelphia, New York 1993.
8. *Parfitt A. M.*: Morphologic basis for bone mineral measurements: transient and steady state effects of treatment in osteoporosis. *Miner. Electrolyte Metab.* 1980, 4, 273-287.
9. *Pawlikowski M.*: Krysztaly w organizmie człowieka. Secesja. Kraków 1993.
10. *Scherft J. P., Groot C. G.*: The electron microscopic structure of the osteoblast. Ultrastructure of skeletal tissues. Bone and cartilage in health and disease. Kulwer Academic Publishers Boston-Dordrecht-London 1990.

Adres autora: dr Piotr Kuropka, ul. Koźuchowska 5, 51-631 Wrocław