

UTJECAJ LAKTACIJE NA MOBILIZACIJU ^{85}Sr I ^{45}Ca IZ SKELETA

B. MOMČILOVIĆ, A. DURAKOVIĆ I KRISTA KOSTIAL

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Jugoslavenske akademije
znanosti i umjetnosti, Zagreb*

(Priljeno 22. VI 1971)

Istraživali smo utjecaj trajanja laktacije na mobilizaciju radioaktivnog stroncija i kalcija iz skeleta štakora nakon jednokratne intraperitonealne aplikacije $0.5 \mu\text{Ci } ^{85}\text{Sr}$ i $0.3 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}$ jednoj grupi četiri mjeseca starih ženki prije početka nošenja (dublja inkorporacija), drugoj na dan koćenja (pliča inkorporacija) i trećoj u pet različitih perioda laktacije (površinska inkorporacija). Virginalne kontrole i dojilje s leglima od po šest mladih žrtvovane su u pokusima pliče i dublje inkorporacije trećeg, dvanaestog i dvadesetog dana laktacije, a u pokusima površinske inkorporacije 48 sati nakon aplikacije izotopa izvršene na dan koćenja, te petog, desetog, petnaestog i dvadesetog dana laktacije. Aktivnost ^{85}Sr u otopljenim mineraliziranim uzorcima skeleta određena je u scintilacijskom brojaču, a ^{45}Ca u GM brojaču s prozorom. Rezultati pokazuju da je mobilizacija radioaktivnog ^{85}Sr i ^{45}Ca iz skeleta upravo razmjerna trajanju laktacije, a obrnuto razmjerna vremenu proteklom od njihove primjene, s tim da je moguća i iz dubljih slojeva kosti.

Tokom laktacije nastaju u organizmu majke značajne promjene u metabolizmu minerala. U probavnom traktu se na primjer povećava apsorpcija kalcija i stroncija (1), dok se u kostima smanjuje količina skeletnim minerala. Do smanjenja količine minerala u kostima može doći zbog sniženja brzine akrecije kalcija u kost (2) ili zbog mobilizacije minerala koji su već bili u skeletu (3, 4).

Problem mobilizacije minerala iz skeleta naročito je važan s radio-toksikološkog stajališta, jer je poznato da se jedan od najotrovnijih radionuklida, stroncij-90, zbog svoje sličnosti s kalcijem ugrađuje u skelet. Iz skeleta može stroncij-90 u toku laktacije preći mlijekom u dijete čiji je organizam naročito osjetljiv na djelovanje ionizirajućeg zračenja.

Svrha je našeg rada bila da odredimo vrijeme u kojem u toku laktacije prelazi najviše kalcija i stroncija iz skeleta dojilja u mladunčad, kao i odrediti iz kojih slojeva kosti ti minerali izlaze. Ranija istraživa-

nja o djelovanju laktacije na kost izvršena su pod takvim eksperimentalnim uvjetima – različito vrijeme i način označavanja skeletnih minerala – pa se takvi podaci ne mogu u potpunosti dobiti (5–12). Mi smo primjenom radioaktivnog kalcija i stroncija u različitim vremenskim intervalima pokušali označiti tri različito duboka sloja kosti štakora i onda pratiti prijelaz tih radionuklida u mladunčad u raznim fazama laktacije.

MATERIJAL I METODE

U pokus su uzete ženke bijeloga štakora stare četiri mjeseca, približno jednake težine (220 g), uzgojene u Institutu za medicinska istraživanja. Životinje su hranjene običnom hranom za laboratorijske štakore (proizvod Serum-zavod Kalinovica, Zagreb) i napajane običnom vodom po volji.

Životinje su bile podijeljene u tri grupe, od kojih je prva injicirana na dan stavljanja u rasplod (dublja inkorporacija), druga na dan koćenja (plića inkorporacija), a treća je podijeljena u pet podgrupa koje su sukcesivno injicirane: prva na dan okoćenja a slijedeće redom petog, desetog, petnaestog i dvadesetog dana laktacije (površinska inkorporacija).

Svakoj odrasloj životinji jednokratno je intraperitonealno injicirano $0.5 \mu\text{Ci } ^{85}\text{Sr}$ i $0.3 \mu\text{Ci } ^{45}\text{Ca}$ u 1 ml destilirane vode.

Virginalne kontrole i dojilje iste dobi s leglima od po šest mladih žrtvovane su trećeg, dvanaestog i dvadesetog dana laktacije u pokusima pliće i dublje inkorporacije. U pokusima površinske inkorporacije životinje su žrtvovane 48 sati nakon primjene izotopa, tj. u prvoj podgrupi drugog dana laktacije i dalje redom sedmog, dvanaestog, sedamnaestog i dvadeset i drugog dana laktacije.

Radioaktivnost ^{85}Sr u otopljenim uzorcima mineraliziranih skeleta kontrola, dojilja i legala određena je u scintilacijskom brojaču s kristalom NaJ (T1) tipa Well. Kalcij-45 odredili smo nakon precipitacije kalcija kao oksalata (13) u GM brojaču s prozorom.

Rezultati su izraženi u postocima injicirane doze kao aritmetička sredina svake grupe sa standardnom pogreškom. Značajnost razlika izračunali smo t-testom.

REZULTATI

Skeletne retencije ^{85}Sr i ^{45}Ca virginalnih životinja, dojilja i legala prikazane su na tablici 1 za dublju inkorporaciju, tablici 2 za pliću inkorporaciju i tablici 3 za površinsku inkorporaciju. Razlike u postotku retencije ^{85}Sr i ^{45}Ca posljedica su diskriminacionih faktora prema stronciju vrlo vjerojatno na nivou bioloških membrana (bubrega i mliječne žlijezde) (14) jer se smatra da skelet, barem u malim količinama, ne razlikuje kalcij od stroncija (15, 16).

1. Retencija ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih na dan stavljanja u rasplod u različitim intervalima nakon aplikacije (dublja inkorporacija)

Tablica 1

Utjecaj laktacije u trajanju od tri, dvanaest i dvadeset dana na skeletnu retenciju ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih prije početka graviditeta (dublja inkorporacija)

Grupa	Broj životinja	Skeletna retencija	
		^{85}Sr	^{45}Ca
% doze 3 dana nakon koćenja			
Kontrole	12	34.74 ± 1.58	54.40 ± 1.85
Dojilje	13	30.18 ± 1.44	46.83 ± 1.17
Legla	13	0.42 ± 0.04	1.07 ± 0.06
% doze 12 dana nakon koćenja			
Kontrole	11	31.89 ± 1.23	45.56 ± 1.52
Dojilje	12	33.21 ± 1.93	44.18 ± 2.25
Legla	12	1.46 ± 0.11	3.37 ± 0.20
% doze 20 dana nakon koćenja			
Kontrole	13	31.48 ± 1.02	45.51 ± 1.46
Dojilje	14	24.40 ± 1.50	35.37 ± 1.76
Legla	14	2.17 ± 0.05	6.28 ± 0.32

U pokusima dublje inkorporacije radioaktivnih izotopa kalcija i stroncija u skelet nakon jednokratne intraperitonealne injekcije prije početka graviditeta nije ustanovljeno statistički značajno sniženje retencije primijenjenih izotopa ni trećeg ni dvanaestog dana laktacije. Statistički značajne razlike opažaju se na kraju laktacije kako za stroncij ($P > 0.001$) tako i za kalcij ($P > 0.001$) (vidi tablicu 1). Unatoč niskim vrijednostima retencije radioaktivnog stroncija i kalcija u mladim životinjama, porast tih radioizotopa u leglu kontinuiran je u toku svih triju pokusnih perioda.

2. Retencija ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih na dan koćenja u različitim intervalima nakon aplikacije (plića inkorporacija)

Iz prikazanih podataka na tablici 2 vidi se da već treći dan nakon koćenja postoji značajno sniženje retencije ^{45}Ca u skeletu dojilja ($P < 0.001$) i tendencija ka sniženju retencije ^{85}Sr ($P < 0.05$). Retencija radioaktivnog ^{45}Ca u skeletima mladih životinja dvostruko je viša od one

Tablica 2

Utjecaj laktacije u trajanju od tri, dvanaest i dvadeset dana na skeletnu retenciju ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih na dan koćenja (pliča inkorporacija)

Grupa	Broj životinja	Skeletna retencija	
		^{85}Sr	^{45}Ca
% doze 3 dana nakon koćenja			
Kontrole	10	43.63 ± 1.51	71.30 ± 1.63
Dojilje	10	36.64 ± 2.58	55.34 ± 2.62
Legla	10	4.81 ± 0.64	11.12 ± 1.08
% doze 12 dana nakon koćenja			
Kontrole	8	39.91 ± 1.80	61.24 ± 1.54
Dojilje	12	23.63 ± 0.85	33.54 ± 1.66
Legla	12	9.19 ± 0.54	20.66 ± 1.13
% doze 20 dana nakon koćenja			
Kontrole	9	34.07 ± 1.40	60.21 ± 1.50
Dojilje	18	21.58 ± 0.70	31.08 ± 1.00
Legla	18	9.33 ± 0.60	22.56 ± 1.28

^{85}Sr , što je u skladu s poznatim faktorima diskriminacije prema stronciju u mliječnoj žlijezdi (17, 18). Pad retencija obaju radionuklida još je jače naglašen dvanaestog dana nakon početka laktacije ($P < 0.001$ za oba radioizotopa). Retencija ^{85}Sr i ^{45}Ca dvostruko je povišena u mladim životinjama u odnosu na treći dan i dvostruko je viša za kalcij nego za stroncij. Na kraju laktacije skeletna retencija dojilja statistički je jednaka razini dvanaestog dana (za ^{85}Sr $P > 0.1$, za ^{45}Ca $P < 0.1$), a isto je takav nalaz i u mladima ($P < 0.1$ za oba radioizotopa).

3. Retencija ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih na dan koćenja, te petog, desetog, petnaestog i dvadesetog dana laktacije (površinska inkorporacija)

Period laktacije u ovoj grupi pokusa bio je podijeljen u pet intervala od po pet dana. Radioaktivni izotopi primijenjeni su u početku svakog od tih intervala kontrolama i dojiljama, koje su zatim žrtvovane nakon 48 sati. Iz rezultata prikazanih na tablici 3 vidi se da je maksimalni efekt sniženja retencije ^{85}Sr i ^{45}Ca kod dojilja izražen na kraju laktacijskog perioda, tj. od sedamnaestog do dvadeset drugog dana laktacije. Retencija radioaktivnog ^{85}Sr i ^{45}Ca u mladim štakorima kontinuirano je rasla do četvrtog eksperimentalnog intervala, kad je dosegla svoju maksimalnu razinu, na kojoj je približno ostala do kraja laktacije.

Tablica 3

Utjecaj laktacije u trajanju od 48 sati na skeletnu retenciju ^{85}Sr i ^{45}Ca primijenjenih u raznim razdobljima laktacije (površinska inkorporacija)

Grupa	Broj životinja	Skeletna retencija	
		^{85}Sr	^{45}Ca
% doze 48 sati nakon primjene na dan koćenja			
Kontrole	6	54.93 ± 3.24	74.33 ± 2.73
Dojilje	6	39.31 ± 1.61	42.26 ± 2.39
Legla	6	9.76 ± 1.12	18.49 ± 1.90
% doze 48 sati nakon primjene petog dana laktacije			
Kontrole	6	60.32 ± 1.93	73.13 ± 1.98
Dojilje	6	35.05 ± 2.29	40.17 ± 3.23
Legla	6	25.20 ± 2.72	47.70 ± 4.58
% doze 48 sati nakon primjene desetog dana laktacije			
Kontrole	6	62.07 ± 3.03	73.06 ± 2.89
Dojilje	6	33.72 ± 3.84	35.94 ± 3.20
Legla	6	40.28 ± 2.32	58.45 ± 3.45
% doze 48 sati nakon primjene petnaestog dana laktacije			
Kontrole	7	64.94 ± 3.79	79.41 ± 3.45
Dojilje	7	24.39 ± 2.00	22.97 ± 1.39
Legla	7	49.13 ± 2.75	73.94 ± 4.04
% doze 48 sati nakon primjene dvadesetog dana laktacije			
Kontrole	7	61.43 ± 1.64	79.56 ± 3.49
Dojilje	7	20.72 ± 1.68	26.60 ± 2.67
Legla	7	31.89 ± 2.58	65.48 ± 3.70

Možemo pretpostaviti da mladi u drugoj fazi laktacije kod pliće inkorporacije ne povišuju retenciju jer je raspoloživi izotop iz označenog sloja kosti iscrpljen, dok je neznatna mobilizacija moguća iz difuzno označenih slojeva kosti. To su uglavnom žarišta pregradnje u kompaktnoj kosti – tzv. »hot spots« (23) – jer je spongiozna kost već znatno reducirana. Mladi kod dublje inkorporacije u prvoj fazi laktacije imaju

relativno najvišu stopu porasta retencije, ali su to vrlo malene količine koje se mogu mobilizirati normalnim procesima metabolizma kosti iz difuzno označenih slojeva. Pretpostavljamo da u drugoj fazi laktacije porast retencije u mladima nije adekvatan mobilizaciji izotopa iz skeleta došlo zbog promijenjenih uvjeta apsorpcije u gastrointestinalnom traktu mladih, nastalih primanjem krute hrane pored majčinog mlijeka. Tu pretpostavku potvrđuju i rezultati površinske inkorporacije, gdje u zadnjem periodu ne dolazi do porasta dotle konstantne akumulacije izotopa u skelete mladih, iako je u dojljama tendencija pada skeletnih retencija i dalje stalno prisutna.

Naši rezultati usporedivi su sa slično zamišljenim pokusima drugih autora. *Duraković* i *Kostial* (8) su opazili da se nakon dvanaest dana laktacije kod izotopa primijenjenog na dan stavljanja u rasplod ne mobilizira kalcij i stroncij iz skeleta došlo. Pod istim uvjetima primjene ustanovili su da se nakon dvadeset dana laktacije u skelete mladih mobilizira 2.5% ^{85}Sr i 6% ^{45}Ca (11) s čime se dobro podudaraju i naši sadašnji rezultati.

DISKUSIJA

Ranija i jača mobilizacija radioizotopa iz skeleta došlo nakon pliće nego nakon dublje inkorporacije u skladu je s postavkom da se izotop koji je zadnji inkorporiran u skelet prvi iz njega mobilizira (19). Koncentracija izotopa nakon jednokratne primjene najjača je u krajevima cjevastih kostiju (20), gdje prevladava spongiozna koštana tvar koja se u toku laktacije smanjuje (4, 9). Kako kost raste apozicijom, aplikacijom izotopa u dva različita vremena dobili smo dva označena sloja u spongioznoj tvari koji se mobiliziraju ili u prvoj fazi laktacije – kao što je slučaj kod pliće inkorporacije, – ili u drugoj fazi laktacije – što je slučaj kod dublje inkorporacije, – zbog resorpcije koja je išla od površnijih prema dubljim slojevima kosti.

Pad retencije izotopa u skeletima došlo kod površinske inkorporacije u prvom je redu posljedica prijelaza istih u mlijeko, a znatno manje posljedica mobilizacije iz skeleta jer u razdoblju od 48 sati tek završava inicijalna inkorporacija u skelet (6, 21). Ta prednost potreba mladunčadi za mineralima u odnosu na skelet indirektno je potvrđena i kinetskom analizom metabolizma kalcija u laktaciji, kojom je – pomoću radioaktivnog kalcija i stroncija – utvrđena smanjena brzina akrecije kalcija u skelet uz povećanu brzinu resorpcije i povećan izmjenjiv prostor za kalcij (2, 22).

Rezultati *Bronnera* (5) u uvjetima aplikacije radioaktivnog kalcija prije početka gestacije nešto su veći i iznose 10–15%.

Naši rezultati u pogledu pliće inkorporacije gotovo su isti kao i rezultati grupe njemačkih autora (6). Kako su oni izmjerili retencije u ske-

letima dojilja samo trećeg i dvadesetog dana laktacije, promakla im je činjenica uočena u našim pokusima da je već dvanaestog dana laktacije u uvjetima jednokratne aplikacije osteotropnih radionuklida na dan partusa njihova mobilizacija uglavnom završena. Njihov zaključak o konstantnoj i progresivnoj mobilizaciji osteotropnog radionuklida u laktaciji mogao bi se dokazati jedino pokusom u kojem bi cijela kost bila označena, a ne samo jedan sloj, kao što je to slučaj kod jednokratne aplikacije.

Naši pokusi površinske inkorporacije bili su izvršeni u sličnim eksperimentalnim uvjetima kao i oni koje su objavili isti autori radeći sa ^{90}Sr (10) i slažu se kako u nalazu sličnog pada retencija kod dojilja, tako i u nalazima maksimalne akumulacije radioaktivnog stroncija u mladim štakorima pred kraj perioda sisanja. Činjenica je, doduše, da su u našim pokusima intervali u kojima se istraživao pad retencija kalcija i stroncija u dojiljama i akumulacija u mladima bili podijeljeni u pet faza laktacije, dok su u pokusima *Kollmera* i *Kriegela* (10) bila praćena samo tri perioda laktacije, te smo zbog toga mogli primijetiti tendenciju ka sniženju retencije kalcija i stroncija u mladim štakora pred kraj laktacije, tj. između petnaestog i dvadeset drugog dana.

Naše rezultate teško je usporediti s rezultatima *Rönbacka* i sur. (12) jer su promjene metabolizma ^{85}Sr u laktaciji određivali u drugim intervalima. Možemo reći da je smjer kretanja ^{85}Sr u laktaciji jednak onom opaženom u našim pokusima.

ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja o djelovanju laktacije na kost izvršena su pod vrlo različitim uvjetima označavanja skeletnih minerala. Uslijed toga je bilo teško odrediti iz kojeg se dijela skeleta mobiliziraju minerali u pojedinim razdobljima laktacije.

Na temelju pokusa, u kojima smo zasebno označili tri različito duboka sloja kosti, možemo zaključiti da se za potrebe mladunčadi primarno koriste minerali iz najpovršnijeg tj. izmjenjivog dijela skeletnih minerala. Iz plićih dijelova kosti minerali se koriste u prvom dijelu laktacije, što vjerojatno označuje mobilizaciju minerala iz spongioznih dijelova kosti. Iz dubljih dijelova kosti minerali se koriste tek u kasnoj fazi laktacije, što vjerojatno predstavlja mobilizaciju minerala iz kompaktnih dijelova kosti.

Kasna faza laktacije predstavlja razdoblje kada najviše minerala prelazi iz organizma majke u mladunčad. Zato je ta faza laktacije s radiotoksikološkog stajališta najopasniji period za prelaz radiostroncija iz majke u mladunčad.

Literatura

1. Kostial, K., Gruden, N., Duraković, A.: Calc. Tiss. Res., 4 (1969) 13.
2. Blanuša, M., Harmut, M., Momčilović, B., Kostial, K.: Rad će biti tiskan u Calc. Tiss. Res. koncem 1971.
3. Bauer, W., Aub, J. C., Albright, F.: J. Exptl. Med., 42 (1929) 145.
4. Warnock, C. M., Duckworth, J.: Biochem. J., 38 (1944) 220.
5. Bronner, F.: Science, 132 (1960) 472.
6. Kollmer, W. E., Kriegel, H.: Nature, 200 (1963a) 187.
7. Kollmer, W. E., Kriegel, H.: Intern. J. Radiat. Biol., 7 (1963b) 333.
8. Duraković, A., Kostial, K.: Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta, 1 (1965) 150.
9. Kollmer, W. E., Kriegel, H.: Intern. J. Radiat. Biol., 9 (1965a) 369.
10. Kollmer, W. E., Kriegel, H.: Nature, 205 (1965b) 196.
11. Duraković, A., Kostial, K.: Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta, 3 (1967) 262.
12. Rönnback, C., Nelson, A., Nilson, A.: Acta Radiologica, 7 (1968) 330.
13. Comar, C. L.: Radioisotopes in Biology and Agriculture, McGraw Hill Book Co., New York, 1955, str. 218.
14. Comar, C. L., Wassermann, R. H., Nold, M. M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 92 (1956) 859.
15. Bauer, G. C. H., Carlsson, A., Lindquist, B.: Acta Physiol. Scand., 35 (1955) 56.
16. Spencer, H., Laszlo, D., Brothers, M.: J. Clin. Invest., 36 (1957) 680.
17. Twardock, A. R., Comar, C. L.: Am. J. Physiol., 201 (1961) 645.
18. Wassermann, R. H., Lengemann, F. W., Comar, C. L.: J. Dairy Sci., 41 (1958) 812.
19. Pecher, C., Pecher, J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 46 (1941) 91.
20. Comar, C. L., Lotz, W. E., Boyd, G. A.: Am. J. Anat., 90 (1952) 113.
21. Norris, W. P., Kiesielecki, W.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 13 (1948) 164.
22. Blanuša, M., Momčilović, B., Harmut, M., Duraković, A., Kostial, K.: Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta, 5 (1969) 393.
23. Aub, J. C.: Therapy of Radioelement poisoning, Argonne National Laboratory - 5584, Lemont, Illinois, 1956, str. 2.

*Summary*INFLUENCE OF LACTATION ON ^{85}Sr AND ^{45}Ca MOBILIZATION
FROM THE SKELETON

The purpose of our work was to find out from which part of mother's bone calcium and strontium are mobilized during the lactation period. We also wanted to estimate the time of maximal transfer of these minerals from mother to newborns.

The experiments were performed on three groups of four month-old albino rats which received radioactive isotopes of calcium (^{45}Ca) and strontium (^{85}Sr) by a single intraperitoneal injection at various time intervals so as to enable the labeling of different parts of the mother's skeleton. The first group received radioactive isotopes before the gestation period, the second at the onset of lactation, while the third group received them during the lactation period.

The fraction of radioactive isotopes retained in the skeleton was estimated on 3rd, 12th and 20th day of lactation in the first and second group of rats and 48 hours after the radioactive application in the third group of animals.

Our results indicate that the minerals transferred to the litter are mobilized mainly from the superficial or exchangeable parts of the mother's skeleton. A small fraction of minerals originates from deeper layers of the bone. The transfer of minerals from mother to newborns is highest during the second part of the lactation period. The fraction of calcium mobilized to the litter is about twice as high as that of strontium.

*Institute for Medical Research and
Occupational Health, Yugoslav Academy
of Sciences and Arts Zagreb*

*Received for publication
June 22, 1971*