

УДК 615.83.2:616.71-007.234

В. Я. Березовський, І. Г. Літовка, О. С. Костюченко

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ

## Дозовані біофізичні впливи стабілізують маркери ремоделювання кісткової тканини при остеопенії розвантаження

Надійшла до редакції 10.10.04

Розвантаження задніх кінцівок у 56 щурів-самців 3-місячного віку викликає негативні зміни фізіологічних і біохімічних показників ремоделювання кісткової тканини, подібні до тих, що відбуваються в умовах мікрогравітації та гіпокнезії. Дія дозованої кисневої депривації в режимах 10/10 і 10/20 повністю ліквідує негативні зсуви концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові, нормалізує активність лужної фосфатази, кислої фосфатази, тартратрезистентної кислої фосфатази та інших показників ремоделювання кісткової тканини у щурів. Періодичне вдихання газової суміші з редукованим до 10 % вмістом кисню може частково чи повністю компенсувати пригнічення ремоделювання кісткової тканини у осіб з малорухомим способом життя і недостатнім об'ємом фізичного навантаження.

Досвід останніх десятиріч показав, що незважаючи на інтенсивне використання фармакологічних методів стабілізації метаболізму кальцію у космонавтів, в умовах реального космічного польоту і тривалого впливу мікрогравітації відбувається істотна втрата кальцію [4, 5, 15], який забезпечує фізіологічний перебіг внутрішньоклітинних процесів [5, 18] та біомеханічні властивості кісток скелету [7, 14, 19]. Логічно продовжити пошуки засобів корекції остеопенії, викликані відсутністю навантаження на кістки скелету, біофізичними чинниками, здатними стимулювати метаболізм кісткової тканини при недостатності притаманних цій структурі електромеханічних стимулів енергетичного метаболізму. Одним з еквівалентів таких подразників може бути короткочасна дозована киснева депривація [2, 3, 17], здатна стимулювати секрецію нещодавно виявленого стимулятора активності остеобластів — ендотеліальної NO-синтази [13, 22].

Мета цієї роботи — дослідити зміни фізіологічних і біохімічних показників ремоделювання кісткової тканини в динаміці розвитку компенсаторно-приспосувальних реакцій у тварин з розвантаженням задніх кінцівок та періодичним впливом дозованої кисневої депривації (ДКД).

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджено 56 3-місячних щурів-самців. Вплив мікрогравітації моделювали шляхом створення безопорного положення задніх кінцівок [3]. Для стимуляції процесів ремоделювання кісткової тканини тваринам періодично подавали нормобаричну газову суміш (НГС) з редукованим від 76 до 91 мм рт. ст. парціальним тиском кисню. Експеримент тривав 28 діб. НГС подавали у трьох різних переривчастих режимах щоденно з 24-ї до 8-ї години. Розподіл тварин по п'яти групах здійснювали таким чином: I — віварний контроль, II — безопорне положення задніх кінцівок в повітрі, III — безопорне положення задніх кінцівок та дихання НГС у режимі 20/20 (20 хв НГС та 20 хв — дихання атмосферним повітрям); IV — безопорне положення задніх кінцівок щурів, які дихали НГС у режимі 10/20 (10 хв НГС та 20 хв — дихання атмосферним повітрям); V — безопорне положення задніх кінцівок щурів, які дихали НГС у режимі 10/10 (10 хв — НГС та 10 хв дихання атмосферним повітрям).

Загальна тривалість дії дозованої кисневої депривації на тварин за 28 діб експерименту для кожного з режимів наведена у таблиці.

Тривалість впливу дозованої кисневої депривації на щурів за 28 діб безопорного положення задніх кінцівок

Номер групи	Вплив режиму, хв	Тривалість циклу, хв	Тривалість впливу ДКД, хв		Кількість циклів, n
			за 1 добу	за 28 діб	
III	20/20	40	240	6720	336
IV	10/20	30	160	4480	448
V	10/10	20	240	6720	672

Дослідження процесів ремоделювання кісткової тканини здійснювали за допомогою спектрофотометричних та імуноферментних методів, які дозволяють визначати основні показники її метаболічної активності. Визначали активність остеобластів, що формують нові елементи тканини, та остеокластів, які здійснюють її резорбцію. Для цього вимірювали в сироватці крові та кістковій тканині активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1), загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) і тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ) стандартними наборами реактивів фірми «Лакхема» (Брно, Чехія), паратиреоїдний гормон (ПТГ) (Immunotopics, Inc, USA), концентрацію остеокальцину у сироватці крові (Quidel corporation, USA). Основні біохімічні механізми обміну колагену та протеогліканів у кістковій тканині аналізували, визначаючи такі показники: С-термінального пропептиду колагену I типу (Quidel corporation, USA). Концентрацію глікозаміногліканів (ГАГ) за методом Кляцкіна [6], гіалуронідазну активність (ГА), сумарну активність лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозамінідази [КФ 3.2.1.35] та гіалуронглюкуронідази [КФ 3.2.1.36] за методом П. Н. Шарасва і співробітників [16], креатиніну в крові та сечі стандартними наборами реактивів фірми «Лакхема» (Брно, Чехія), глюкуронові кислоти у кістковій тканині за методом Bitter, Menir (1962) у модифікації В. К. Леонтьєва та Ю. А. Петровича [8].

#### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У тварин, що постійно ростуть, як щури, темп приросту маси тіла відбиває загальний стан організму. Показники маси тіла у тримісячних щурів після розвантаження задніх кінцівок в атмосферному повітрі дещо відрізнялися від контрольних значень. Так, у інтактних тварин приріст маси тіла за тиждень складав близько 30 % і через 28 діб становив 124 %. У щурів з розвантаженням задніх кінцівок в атмосферному повітрі зростання маси тіла йшло повільніше і не перевищувало 15–20 %

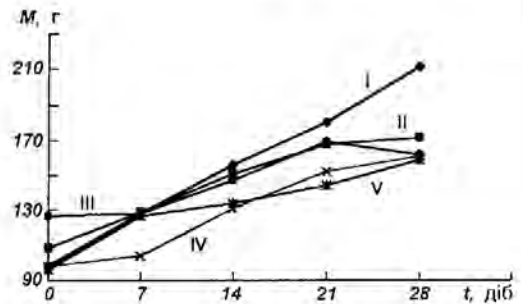


Рис. 1. Зміна маси тіла у інтактних (I) і дослідних щурів (II–V)

за тиждень. За 28 діб експерименту маса тіла тварин II групи зросла лише на 66.6 %. Ще більше уповільнювався темп приросту маси тіла у щурів з безопорним положенням задніх кінцівок, що періодично дихали НГС зі зниженим значенням  $P_{O_2}$  у різних режимах. Приріст маси тіла у щурів III групи, які у стані безопорного положення задніх кінцівок дихали НГС у режимі 20/20, у перші два тижні була однаковою: 13 % і 14.6 % відповідно, за четвертий — 25.9 %. В цілому маса тіла тварин III групи зросла на 56.9 % (рис. 1). У щурів IV групи, які дихали НГС у режимі 10/20, темп приросту маси тіла був дещо вищий. Загальне збільшення маси тіла становило 69.4 %. Маса тіла у щурів V групи (режим подачі НГС — 10/10) змінювалася нерівномірно. Темп приросту маси дорівнював 1.5 % за перший тиждень, 17—за другий, третій — 15.3 % і за четвертий тиждень знизився до 3.6 %. Загальний приріст становив 30.2 %.

Одним з класичних показників загального стану організму є маса вилкоподібної залози і відношення її до загальної маси тіла. Контроль цих показників показав, що у тримісячних щурів з розвантаженням задніх кінцівок вірогідні розбіжності відносних вагових коефіцієнтів тимуса з контролем відзначено лише для щурів IV групи, що дихали НГС зі зниженим значенням  $P_{O_2}$  у режимі 10/20 (рис. 2, а). Аналогічне сигнальне значення має і маса наднирників.

Відносні вагові коефіцієнти наднирників вірогідно збільшувалися ( $P < 0.05$ ) у щурів II, III, IV груп і мали лише тенденцію до збільшення у тварин V групи (рис. 2, б).

Кількість еритроцитів мала тенденцію до підвищення у щурів II, III, V груп, а у тварин IV групи вона вірогідно підвищувалася на 25.6 % ( $P < 0.05$ , рис. 2, в).

Концентрація гемоглобіну залишалася стабільною у щурів всіх дослідних груп.

Результати біохімічних досліджень показали, що після 28-добового розвантаження задніх кінцівок

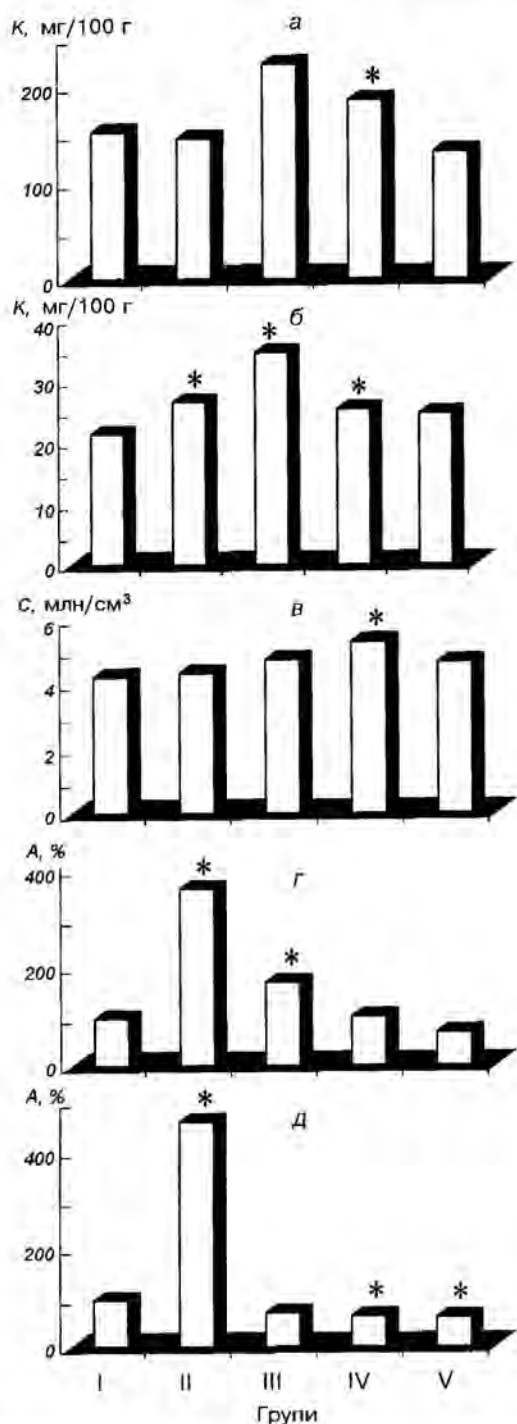


Рис. 2. Показники стану організму молодих щурів інтактної групи (I) і з розвантаженням задніх кінцівок, що дихали НГС зі зниженим  $P_{O_2}$  у різних режимах (II, III, IV, V): а, б — відносні вагові коефіцієнти (маса органу/100 г маси тіла) тимуса і наднирників відповідно, в — вміст еритроцитів у крові, г, д — активність кислотої фосфатази і тарتراتрезистентної кислотої фосфатази відповідно у сироватці крові. Зірочкою відмічено статистично вірогідні ефекти ( $P < 0.05$ )

щурів у атмосферному повітрі суттєво змінюється метаболізм ГАГ. У сироватці крові цих тварин концентрація ГАГ підвищилася на 53.3 % ( $P < 0.05$ ). Дихання НГС зі зниженим  $P_{O_2}$  у всіх трьох досліджуваних режимах повністю ліквідувало негативний вплив розвантаження задніх кінцівок за цим показником.

Активність КФ і ТРКФ у сироватці крові щурів II групи вірогідно збільшилася на 263.8 % і 361.6 % відповідно. ДКД у режимі 20/20 сприяла значному зниженню активності КФ у сироватці крові щурів III групи (рис. 2, г, д). Проте вона виявилась недостатньою для того, щоб отримані показники не відрізнялися від контрольних значень. Водночас режими 10/20 і 10/10 виявились спроможними нормалізувати цей показник. Всі три досліджувані режими подачі НГС зі зниженим  $P_{O_2}$  сприяли зниженню ТРКФ у сироватці крові тварин III, IV, V груп.

Концентрація ПТГ у сироватці крові проявляла тенденцію до підвищення у тварин всіх експериментальних груп. Вміст креатиніну в сироватці крові вірогідно зменшувався на 18—40 % у тварин II, III і V груп, тоді як у щурів IV групи підвищувався на 128.2 % ( $P < 0.05$ ). У щурів з безпорним положенням задніх кінцівок в атмосферному повітрі посилювалася екскреція креатиніну з сечею (на 87.5 %,  $P < 0.05$ ). НГС зі зниженим  $P_{O_2}$ , яку подавали щурам III, IV і V груп у різних режимах для дихання, сприяла незначному (на 12.5 %) зниженню виведення креатиніну з сечею.

У щурів III і IV груп спостерігали лише тенденцію до зниження активності ЛФ у сироватці крові. Максимальний ефект виявлено у тварин, що дихали НГС у режимі 10/10 (V група), де зниження було статистично вірогідним ( $P < 0.05$ ).

Концентрація остеокальцину у сироватці крові щурів II і III групи вірогідно підвищувалася на 50 % і 53.4 % ( $P < 0.05$ ) відповідно.

Кількість С-термінальних пропептидів колагену I типу у сироватці крові тварин II групи підвищилася на 65 % ( $P < 0.05$ ), у щурів III і IV груп вона мала тенденцію до підвищення, а у щурів V групи — до зниження відносно контрольних значень.

Активність ЛФ у кістковій тканині щурів не змінювалася у жодній з досліджуваних груп. Активність лізосомальних ферментів КФ і ГА мала тенденцію до підвищення у тварин з аксіальним розвантаженням задніх кінцівок у атмосферному повітрі. При гіпоксичному стимулюванні в режимі 10/20 активність КФ зростала на 173 % ( $P < 0.05$ ).

Отриманий фактичний матеріал дає підстави говорити про те, що відсутність навантаження на задні кінцівки щурів ініціює встановлення нового динамічного співвідношення між процесами формування та руйнування кісткової тканини. Підвищення активності КФ і ТРКФ, концентрації ГАГ, С-термінальних пропептидів колагену I типу у сироватці крові свідчать про перевагу процесів резорбції, що зумовлює розвиток деструктивних процесів у кістковій тканині зі значними втратами кальцію та погіршенням біомеханічних властивостей кісток.

Що ж відбувається при спільній дії розвантаження та ДКД? Результати наших попередніх досліджень [1, 9—12] і наведені вище дані дають підстави стверджувати таке. ДКД діє на знижений в результаті розвантаження кісткової тканини метаболізм як стимулятор, що ініціює системні та клітинні механізми адаптації. Збільшується капілярне кровопостачання, зростає кількість еритроцитів, активується циклозис [2, 4, 22, 23]. Відомо також, що короточасна нестача кисню викликає утворення в клітинах AP-білків та HIF-фактора, відомого індуктора широкого спектру генів-продуцентів ферментів енергетичного метаболізму [20, 21, 23]. Зростає активність ферментів (КФ, ТРКФ, ЛФ), змінюється стан колагену — основного органічного компонента відновлення кісткової тканини, нормалізується вміст ГАГ.

Одним із механізмів позитивної дії ДКД може бути участь у ньому універсального регулятора життєвих процесів — оксиду азоту. Відомо, що молекулярний кисень — основний субстрат NO-синтази. Незважаючи на це, прямої залежності концентрації NO від вмісту кисню в середовищі не виявлено. Вміст NO при короткотривалому диханні газовою сумішшю з 10 %  $O_2$  залишається незмінним. Але при цьому істотно зростає надходження  $Ca^{2+}$  в клітини, що активує ендотеліальну NO-синтазу. При тривалому впливі нестачі кисню транспорт  $Ca^{2+}$  припиняється, синтез NO гальмується, кровопостачання і метаболізм істотно знижуються. Все це — прояв патогенного впливу тривалої гіпоксії. Зовсім інша реакція виникає при короткотривалій дії дозованої кисневої депривації. Навіть 1-2 хв ДКД достатньо, щоб активувати ендотеліальну NO-синтазу, розкрити резервні капіляри, збільшити вміст  $Ca^{2+}$  в клітинах і активувати їхній метаболізм. Саме цього ефекту ми домагаємося при використанні різних режимів біофізичної стимуляції клітинних структур кісткової тканини, що потерпає від нестачі вагових навантажень та супутніх електрофізіологічних стимулів регенерації. Як показали проведені досліді, у багатьох випад-

ках ДКД дозволяє зберегти кісткову тканину у близькому до фізіологічної норми стані, незважаючи на 28-добову жорстку гіпокінезію.

Порівняння різних режимів впливу ДКД свідчить, що найбільш сприятливим для кісткової тканини щура є співвідношення 10/10 та 10/20. Не виключено, що і коротші цикли виявляться достатньо ефективними, тобто пошуки оптимального режиму, що компенсуватиме впливи ДКД, потребують подальших досліджень. Разом з тим одержаний матеріал дає підстави стверджувати, що ДКД спроможна за деякими показниками — повністю, а за іншим — частково компенсувати негативні впливи аксіального розвантаження та гіпокінезії в експериментах на лабораторних тваринах. Відсутність принципових розбіжностей між енергетичним метаболізмом та регуляції процесів регенерації у хребетних надає впевненості, що принцип періодичного впливу дозованої кисневої депривації може виявитися ефективним для компенсації негативних наслідків малорухомого способу життя сучасної людини та поширення проявів остеопенії та остеопору у осіб різних вікових груп.

## ВИСНОВКИ

1. Розвантаження задніх кінцівок щурів викликає негативні зміни фізіологічних і біохімічних маркерів ремоделювання кісткової тканини, аналогічно тому, що спостерігається в умовах мікрогравітації та гіпокінезії.

2. Періодичне використання дозованої кисневої депривації повністю ліквідує негативні зрушення концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові, нормалізує активність лужної фосфатази, кислої фосфатази, тартратрезистентної кислої фосфатази та інших показників ремоделювання кісткової тканини.

3. Порівняння різних технологій впливу дозованої кисневої депривації на щурів з розвантаженням задніх кінцівок дозволяє стверджувати, що найефективнішими за більшістю показників виявилися режими 10/10 та 10/20, які мають найбільшу кількість повторних змін рівня  $P_{O_2}$  у вдихуваному повітрі.

4. Періодична дія дозованої кисневої депривації може виявитися корисною для профілактики та лікування проявів патології кісткової тканини осіб, що ведуть малорухомий спосіб життя та мають недостатній обсяг фізичних навантажень.

- Луганськ; Харків, 2002.—Вип. 6 (45).—С. 19—31.
2. Березовский В. А., Дейнега В. Г. Физиологические механизмы сапозенных эффеков горного климата. — Киев: Наук. думка, 1988.—224 с.
  3. Березовський В. Я., Лахін П. В., Літовка І. Г. та ін. Моделювання експериментальної остеопенії та розробка технології її профілактики у щурів // Фізіол. журн.—2004.—50, № 5.—С. 88—91.
  4. Воложин А. И., Лемецкая Т. И. Изменение кальциевого и фосфорного обмена в костях и зубах при кислородном голодании // Патол. Физиология и эксперим. мед.—1970.—14, № 5.—С. 16—20.
  5. Григорьев А. И., Ларина И. М. Принципы организации обмена кальция // Успехи физиол. наук.—1992.—23, № 3.—С. 24—52.
  6. Кляцкин С. А., Лифшиц П. И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом у больных // Лаб. дело.—1989.—№ 9.—С. 51—53.
  7. Коржув П. А. Эволюция, гравитация, невесомость. — М.: Наука, 1971.—152 с.
  8. Леонтьев В. К., Петрович Ю. А. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии. — Омск, 1976.—93 с.
  9. Литовка И. Г. Дозированная гипоксия как фактор коррекции остеопении бездействия // Космична наука і технологія.—2002.—8, № 4.—С. 81—85.
  10. Літовка І. Г., Березовська О. П. Киснева депривація як ініціатор остеогенезу при гіпокінезії // Фізіол. журн.—2003.—49, № 2.—С. 58—65.
  11. Літовка І. Г. Ремоделювання кісткової тканини у низько-і високоактивних щурів в умовах 45-добової гіпокінезії та впливу дозованої кисневої депривації // Космична наука і технологія.—2003.—9, № 1.—С. 92—95.
  12. Літовка І. Г. Ремоделювання кісткової тканини щурів при гіпокінезії різної тривалості // Український медичний альманах.—2003.—6, № 2.—С. 171—174.
  13. Манухина Е. Б., Машина С. Ю., Власова М. А. и др. Роль свободного и депонированного оксида азота в адаптации к гипоксии сердечно-сосудистой системы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция.—2004.—3, № 11.—С. 4—11.
  14. Оганов В. С. Гипокинезия — фактор риска остеопороза // Остеопороз и остеопатия.—1998.—№ 1.—С. 13—17.
  15. Оганов В. С., Воропип Л. И., Рахманов А. С. Минеральная плотность костной ткани у космонавтов после полетов длительностью 4.5—6 месяцев на орбитальной станции «Мир» // Авиакосмическая и экологическая медицина.—1992.—№ 5/6.—С. 20—24.
  16. Шараев П. Н., Стрелков Н. С., Гунчев В. В., Сосулина Л. Л. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях // Клинич. лаб. диагностика.—1996.—№ 3.—С. 21—22.
  17. Fukuoka P., Nishimura Y., Haruna M., Suzuki Y. Effect of bed rest immobilization on metabolic turnover of bone mineral density // Gravit. Physiol.—1997.—4, N 1.—P. S 75—S 81.
  18. Kostyuk P. G. Calcium ions in nerve cell function. — New York: Oxford Univ. Press, 1992.—220 p.
  19. Morey-Holton E. R., Arnaud S. B. Skeletal responses to spaceflight // Adv. Space Biology and Medicine.—1991.—1, N 1.—P. 37—69.
  20. Premkumar D. R. Intracellular pathways linking hypoxia to activation of c-fos and AP-1 // Adv. Exp. Med. Biol.—2000.—N 475.—P. 101—109.
  21. Semenza G. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia // Cell.—2000.—88, issue 4.—P. 1474—1480.
  22. Van't Hof R. J., MacPhee J., Libouban H., et al. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase // Endocrinology.—2004.—145, N 11.—P. 5068—5074.
  23. Wykoff C. C., Pugh C. W., Maxwell P. H., Harris A. L. Identification of novel hypoxia dependent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor by m RNA differential expression profiling // Oncogene.—2000.—N 19.—P. 6297—6307.

#### DOZED BIOPHYSICAL INFLUENCES STABILIZE THE BONE REMODELING MARKERS AFTER UNLOADED INDUCED OSTEOPENIA

V. A. Berezovskii, I. G. Litovka, A. S. Kostyuchenko

The 28-day hind limb unloading for 56 young rat-males causes negative changes of physiological and biochemical markers of the bone remodeling, like in microgravitation and hypokinesia conditions. A dozed oxygen deprivation influence in modes of 10/10 and 10/20-min eliminates completely the negative shifts in the glycosaminoglycan concentrations, normalizes the activity of the alkaline phosphatase, acid phosphatase, tartrate-resistant acid phosphatase and other markers of the bone remodeling. Periodic inhalation of gas mixture with oxygen reduced to 10 % can either partially or totally compensate the oppression of bone remodeling for persons with sedentary life and insufficient volume of physical load.