

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

Вплив преадаптації на прояви гострого гіпобаричного стресу та фізіологічну регенерацію кісткової тканини

Досліджували резистентність щурів-самців до барокамерного тестування (12 тис. м над рівнем моря, швидкість 80 м/с) до та після 14 і 28-добової преадаптації у нормобаричній газовій суміші ($N_2 + O_2$, $PO_2 = 100$ мм рт.ст ± 10 мм рт.ст). Показано збільшення стійкості щурів до гострої гіпоксії у 1,7–1,8 разів після преадаптації. Аліментарна депривація (на 40 % раціону) суттєво не змінювала стійкість тварин до гіпоксії. За сукупністю біохімічних показників преадаптація в умовах нормобаричної гіпоксії (14 діб) активувала маркери фізіологічної регенерації, сприяла підвищенню концентрації лептину, паратиреоїдного гормону та гормону росту, збільшувала активність кислої і тартратрезистентної кислої фосфатази. Після 28-добового тренування більшість показників нормалізувалися за виключенням вмісту паратиреоїдного гормону і гормону росту, які вірогідно знижувалися відносно контрольних значень. Аліментарна депривація знижувала активність лужної фосфатази та концентрацію гормону росту. Одержані результати свідчать, що преадаптація в умовах дозованої нормобаричної гіпоксії позитивно впливає на стан кісткової тканини, а нестача субстратів окиснення не дає такого ефекту.

Ключові слова: преадаптація, нормобарична газова суміш, аліментарна депривація.

ВСТУП

Нормальна життєдіяльність організму потребує постійного та адекватного його потребам надходження кисню та субстратів окиснення до тканин. При адаптації до гіпоксії однаковою мірою задіяні всі функціональні системи організму. Тривале вивчення механізмів адаптації до гіпоксії зосереджували на дослідженнях систем, що забезпечують транспорт кисню до тканин. В останні роки встановлена залежність характеру адаптивних реакцій від ступеня гіпоксичного впливу, його тривалості, вихідного стану та біоритмічної діяльності організму [1–3, 6, 8]. Разом з тим деякі питання формування фізіологічних механізмів адаптації до гіпоксії, а саме стан метаболічних процесів у кістковій тканині при періодичному або тривалому дефіциті

кисню залишається недостатньо вивченим.

У дорослому організмі оновлення кісткової тканини здійснюється за допомогою ремоделювання. За нормальних умов існування співвідношення процесів остеосинтезу та остеодеструкції забезпечує тривале надійне відновлення скелету. Різноманітні порушення процесів формування кістки супроводжуються дисбалансом складових фізіологічної регенерації кісткової тканини.

Деякі автори [2–5] вказують на те, що дозоване обмеження надходження кисню до тканин ініціює адаптивну перебудову біохімічних і фізіологічних процесів, зменшує інтенсивність вільнорадикального окиснення. Аналогічний вплив відбувається при обмеженні енергетичної цінності раціону та маси їжі, що підтримують життєздатність організму [7, 14, 20]. Тому

доцільно дослідити обидва фактори, що розглядаються як ініціатори преадаптації до дії стресогенних впливів зовнішнього середовища, а саме – особливості фізіологічної регенерації кісткової тканини щурів в умовах зниження парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі та обмеження раціону харчування.

Мета нашої роботи – вивчення впливу преадаптації до нестачі кисню та аліментарної депривації на прояви гострого гіпобаричного стресу та біохімічні показники регенерації кісткової тканини дорослих щурів.

МЕТОДИКА

Досліди виконано на 44 щурах-самцях лінії Вістар віком 6 міс. Факторами преадаптації були нормобарична газова суміш (НГС, $P_{O_2} = 100$ мм рт.ст. ± 10 мм рт. ст.), яку подавали 1 год безперервно впродовж 14 і 28 діб або обмежений на 40 % за об'ємом і калорійністю раціон харчування. Як стресогенний фактор використовували гостру гіпобаричну гіпоксію – підйом на висоту, який здійснювали зі швидкістю 80 м/с. Висотний поріг визначали за критичним часом перебування щурів в умовах гіпобарії на умовній висоті 12 тис. м над рівнем моря ($P_{O_2} = 30$ мм рт.ст.). Тварин було поділено на 5 груп. Щури I групи (контроль) протягом експерименту перебували за стандартних умов віварію. Щури II та III груп щоденно протягом 14 та 28 діб відповідно дихали 1 год НГС у безперервному режимі. Для щурів IV та V груп було застосовано режим обмеження калорійності кормів на 40 % відносно повноцінного раціону (20 г корму на добу). Тобто вміст всіх інгредієнтів, що входили до раціону, було знижено на 40 %, у тому числі необхідних для побудови скелета мінеральних компонентів. Усі тварини мали вільний доступ до води.

Досліди проводили з виконанням міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин.

Матеріалом для досліджень була сироватка крові, яку одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини визначали за допомогою спектрофотометричних та імуноферментних методів. У сироватці крові визначали показники формування кісткової тканини: концентрацію інсуліноподібного фактора росту-1 («IDS», США), концентрацію гормону росту («SP1bio», США) за стандартними наборами реактивів, активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1, «Лахема», Чехія). Крім того, визначали показники резорбції кісткової тканини – загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентну кислоту фосфатазу (ТРКФ, «Лахема», Чехія), концентрацію глікозаміногліканів за методом Кляцкіна [4], паратиреоїдного гормону («Immutopics», США) та лептину («DRG», США) за стандартними наборами реактивів.

Цифрові результати обробляли з використанням пакета програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2003. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували *t* критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведені експерименти показали, що після 14 та 28 діб нормобаричних гіпоксичних тренувань тривалість перебування щурів на висоті 12 тис.м над рівнем моря збільшилася в 1,8 та 1,7 раза відповідно відносно контролю. Це свідчить про підвищення їх резистентності до гіпоксії. Після 14- та 28-добового впливу аліментарної депривації у щурів відзначали лише статистично невірогідну тенденцію до підвищення стійкості до гострої гіпоксії.

Біохімічні маркери формування та резорбції кісткової тканини відображають активні процеси її перебудови як у нормі,

так і при впливі стресогенних подразників. Так, активність лужної фосфатази у сироватці крові, яка характеризує активність формування кісткової тканини і асоціюється з активністю остеобластів, мала тенденцію до збільшення після впливу нормобаричної газової суміші протягом 14 та 28 діб (рис. 1,а). Цей показник вірогідно знижувався порівняно з контрольними значеннями в 1,3 раза у тварин IV групи, які протягом 14 діб перебували на обмеженому раціоні, і мав тенденцію до зростання після 28 діб аліментарної депривації.

КФ і ТРКФ – лізосомальні ферменти, що секретуються активно діючими остеокластами і потрапляють у значній кількості у кров'яне русло. Активність КФ підвищувалася у щурів, що протягом 14 діб перебували у газовому середовищі зі зниженим P_{O_2} або обмеженому раціоні харчування в 1,5 і 1,6 раза ($P < 0,05$) відповідно відносно контрольних значень (див.рис.1,б).

ТРКФ утворюється в органелах остеокластів, надходить у позаклітинне середовище і забезпечує резорбцію кісткової тканини. Активність ТРКФ мала тенденцію до збільшення у тварин II групи і вірогідно підвищувалася в 1,6 раза у щурів IV групи, що отримували обмежений за об'ємом і калорійністю раціон ($P < 0,05$; див. рис. 1,в).

Концентрація глікозаміногліканів не змінювалася у тварин жодної з досліджуваних груп. Зважаючи на зміни активності основних ферментів остеобластів і остеокластів, припускаємо, що при аліментарній депривації протягом 14 діб знижується остеогенез і збільшується резорбція кісткової тканини. 28-добове обмеження раціону харчування не викликало суттєвих змін у її ремоделюванні.

Відомо, що фізіологічна регенерація кісткової тканини у ссавців відбувається безперервно протягом усього життя. Вона контролюється центральними нейрогенними, системними гормонами, серед яких

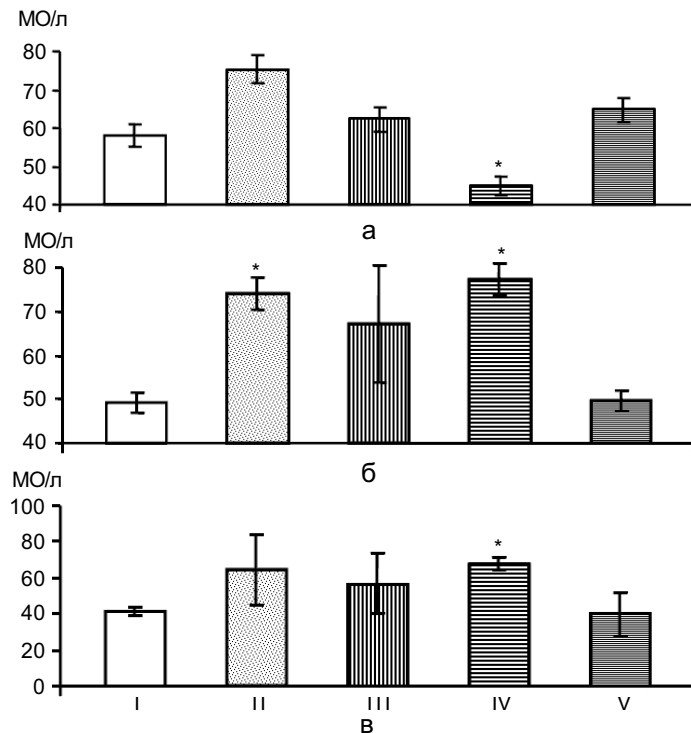


Рис. 1. Зміни активності лужної фосфатази (а), кислої фосфатази (б), тартратрезистентної кислої фосфатази (в) у сироватці крові контрольних (I) і дослідних (II, III, IV, V) щурів

найбільш дослідженими є паратиреоїдні гормони, гормони росту, а також локальні гуморальні фактори росту [10, 16, 17]. В останні роки виявлено значну кількість факторів росту та гормонів, які різноспрямовано впливають на масу та якість кісткової тканини. Серед них гормон лептин, що продукується жировою тканиною. Відомості відносно його впливу на ремоделювання кісткової тканини суперечливі. Показано, що лептин здійснює гальмівний вплив на відновлення кісткової тканини, оскільки пригнічує активність остеобластів. На різних етапах онтогенезу лептин по різному впливає на процеси ремоделювання кісткової тканини.

Дослідження останніх років свідчать, що вплив лептину може домінувати над дією місцевих факторів росту [18]. Показано, що безперервне дихання газовою сумішшю з 8 % O₂ протягом 3 год не викликало змін концентрації лептину у жировій тканині та сироватці крові молодих

щурів, у той час як у легенях вона вірогідно підвищилася [13]. За нашими результатами, концентрація лептину у сироватці крові тварин II групи, що дихали газовою сумішшю зі знизеним Po₂ протягом 14 діб збільшувалася в 3,3 раза (P<0,05) відносно контрольних значень (рис. 2,а), що узгоджується з результатами Netzer та співавт. [15], які спостерігали підвищення концентрації лептину у сироватці крові людей за умов дихання газовою сумішшю зі знизеним Po₂ (9–13 % O₂).

При подовженні терміну експозиції до 28 діб концентрація лептину мала лише тенденцію до підвищення порівняно з контролем. Це дає змогу припустити, що тварини можуть використовувати різні метаболічні варіанти підтримання гомеостазу при дії стресогенних факторів зовнішнього середовища. Вибір метаболічної стратегії адаптації стає можливим завдяки наявності кількох шляхів перебудови та їх варіацій. Головними серед них є особ-

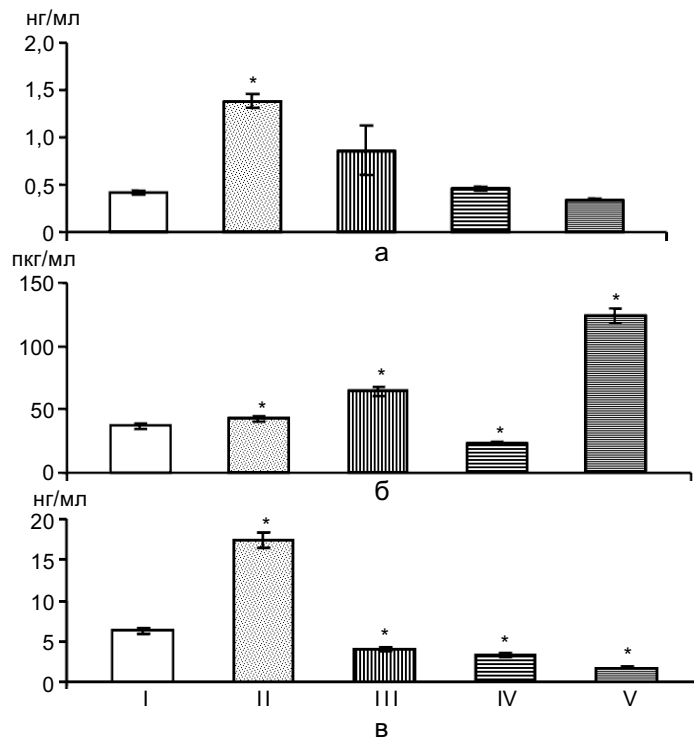


Рис. 2. Зміни концентрації лептину (а), паратиреоїдного гормону (б), гормону росту (в) у сироватці крові контрольних (I) і дослідних (II, III, IV, V) щурів

ливості генотипу організму, активність центральної нейрогуморальної і місцевих факторів регуляції та природа стресогенного впливу (інтенсивність подразника та його тривалість, послідовність подразнень). Відомо, що зниження секреції організмом лептину під час жорсткої малокалорійної дієти призводить до зниження енерговитрат: обмін речовин переходить на режим економії [9]. У наших дослідженнях помірне обмеження раціону харчування на 40 % як протягом 14, так і 28 діб не викликало суттєвих змін концентрації лептину.

Одним із найважливіших факторів кісткового метаболізму та кальцієвого гомеостазису є паратиреоїдний гормон. Головні ефекти його дії – мобілізація кальцію із кісткового депо і зменшення екскреції із сечею. Цей гормон є потенційним регулятором резорбції кісткової тканини, що *in vivo* підвищує кількість та активність остеокластів і формує «гофровану облямівку» [17].

Доведена наявність рецепторів для паратиреоїдного гормону на клітинах остеобластної лінії, але немає переконливих доказів про їх наявність на самих остеобластах. Реалізація дії гормону здійснюється через остеобласти, що відповідають за формування кісткової тканини та активацію остеокластів і процеси резорбції.

За нашими результатами нормобарична газова суміш, у залежності від тривалості дихання, здійснювала різноспрямований вплив: через 14 діб концентрація паратиреоїдного гормону вірогідно підвищувалася в 1,2 раза, а через 28 діб – знижувалася в 1,6 раза відносно контрольних значень (див. рис. 2,б). Це підкреслює важливість експериментального визначення оптимальної тривалості впливу.

Слід відмітити, що концентрація паратиреоїдного гормону у сироватці крові вірогідно підвищувалася у 1,7 і 3,4 раза відповідно у щурів IV і V груп, котрі

протягом 14 і 28 діб знаходилися на обмеженому раціоні харчування. За умов 6-місячної аліментарної депривації у щурів-самців виявлено протилежний ефект (тобто зниження концентрації паратиреоїдного гормону) [11]. Проте у щурів-самиць, що перебували в аналогічних умовах 9 тиж, цей показник не змінювався [19]. При довготривалій аліментарній депривації (понад 6 років) у самців макак-резус відзначили підвищення концентрації паратиреоїдного гормону [12].

Отже, наші результати та літературні дані свідчать, що на зміни концентрації паратиреоїдного гормону може впливати не лише обмеження раціону харчування, а і термін, стать, видова тривалість життя тварин.

Гормон росту бере участь протягом усього життя у підтримці мінеральної густини кістки та активно впливає на ремоделювання кісткової тканини. Цей гормон за допомогою активації інсуліноподібного фактора росту-1 індукує у експериментальних тварин утворення кальцитріолу, який у свою чергу підвищує інтестинальну абсорбцію кальцію та фосфату [16].

Соматотропний гормон має прямий стимулювальний вплив на остеобласти, у зв'язку з чим соматотропно-замісна терапія підвищує мінеральну щільність кістки, збільшуючи швидкість її утворення. На це вказує підвищення у сироватці крові остеокальцину – білка, який продукується остеобластами та відображає швидкість утворення кісткової тканини. На тлі дефіциту гормону росту знижується мінеральна щільність кісткової тканини.

Нами виявлено вірогідне зростання гормону росту у 2,8 раза у тварин II групи, які протягом 14 діб дихали нормобаричною газовою сумішшю. Через 28 діб цей показник знижувався відносно контрольних значень у 1,9 раза ($P < 0,05$; див. рис. 2,в). Таким чином, адаптація до нормобаричної

гіпоксії призводить до різноспрямованої зміни концентрації гормону росту у сироватці крові залежно від тривалості експозиції або передозування гіпоксичного стимулу.

При обмеженні раціону протягом 14 діб концентрація гормону росту знижувалася в 1,6 раза ($P < 0,05$), а через 28 діб – в 3,6 раза ($P < 0,05$) порівняно з контролем. При такій моделі експерименту спостерігали однотипну зміну сироваткової концентрації гормону росту, що можна пояснити подовженням терміну аліментарної депривації.

Одержані нами результати свідчать про те, що преадаптація нормобаричною газовою сумішшю підвищує резистентність дорослих щурів до впливу гострої гіпобаричної гіпоксії. Обмеження харчового раціону істотно знижує концентрацію гормону росту, проте практично не впливає на резистентність до гіпоксії, але гальмує динаміку росту маси тіла і маси кісткової тканини.

За сукупністю отриманих результатів з визначення біохімічних показників стану кісткової тканини щурів при дії стресогенних факторів зовнішнього середовища встановлена активація темпів резорбції та утворення кістки при диханні нормобаричною газовою сумішшю протягом 14 діб. На це вказує підвищення концентрації гормону росту, паратиреоїдного гормону, лептину та активності КФ і ТРКФ. Подальше перебування (28 діб) у атмосфері газової суміші зі зниженим P_{O_2} нормалізувало більшість показників, за виключенням гормону росту та паратиреоїдного гормону, які вірогідно знижувалися відносно контрольних значень.

Обмеження раціону харчування на 40 % протягом 14 діб вірогідно знижує активність лужної фосфатази, гормону росту, у той час як активність КФ, ТРКФ та концентрація паратиреоїдного гормону вірогідно зростають. Подовження терміну експозиції до 28 діб сприяє нормалізації більшості показників за винятком паратиреоїдного

гормону і гормону росту. Варто зазначити, що дозована киснева депривація позитивно впливає на процеси фізіологічної регенерації кісткової тканини щурів і підвищує стійкість тварин до дії гострої гіпоксії, а застосована нами аліментарна депривація не викликає аналогічного ефекту.

**В.А. Березовский, И.Г. Литовка,
А.С. Костюченко**

ВЛИЯНИЕ ПРЕАДАПТАЦИИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ОСТРОГО ГИПОБАРИЧЕСКОГО СТРЕССА И ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ РЕГЕНЕРАЦИЮ КОСТНОЙ ТКАНИ

Исследовали резистентность крыс-самцов к барокамерному тестированию (12 тыс. м н. у.м., скорость 80 м/с) до и после 14 и 28-суточной преадаптации в нормобарической газовой смеси ($N_2 + O_2$, $P_{O_2} = 100 \pm 10$ мм рт.ст.). Показано возрастание устойчивости крыс в 1,7–1,8 раз к острой гипоксии после преадаптации. Алиментарная депривация (40 %) существенно не изменяет устойчивость животных к гипоксии. По совокупности биохимических показателей преадаптация в условиях нормобарической гипоксии (14 сут) активизирует процесс физиологической регенерации, способствует повышению концентрации лептина, паратиреоидного гормона и гормона роста, активность кислой и тартратрезистентной кислой фосфатазы. После 28-суточной тренировки большинство показателей нормализовалось за исключением паратиреоидного гормона и гормона роста, которых достоверно снижались относительно контрольных значений. Алиментарная депривация снижает активность щелочной фосфатазы и концентрацию гормона роста. Мы предполагаем, что преадаптация в условиях дозированной нормобарической гипоксии оказывает положительное воздействие на состояние костной ткани, в то время как недостаток субстратов окисления не дает такого эффекта. Ключевые слова: преадаптация, нормобарическая газовая смесь, алиментарная депривация.

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

THE EFFECT OF PREADAPTATION ON THE ACUTE HYPOBARIC STRESS AND PHYSIOLOGICAL BONE TISSUE REGENERATION

In experiments on rats we investigated the resistance to the barochamber testing (12000 u.s.l. velocity 80 m/s) before and after training for 14 and 28 days in the normobaric gas mixture

(N₂ + O₂, P_{O₂} = 100±10 mm of Hg). It was shown that after preadaptation the resistance to acute hypobaric hypoxia increased 1,7-1,8 times. Alimentary deprivation (40%) does not essentially affect the resistance to hypoxia. Biochemical markers show that normobaric low-dosed hypoxic preadaptation (14 days) activates the physiological regeneration process, promote the increase in concentrations of leptin, parathyroid and growth hormones. Alimentary deprivation decreased an alkaline phosphatase activity and concentration of growth hormone. We suggest that normobaric hypoxic preadaptation but not alimentary limitation has definite positive influence on the bone tissue state.

Key words: preadaptation, normobaric gas mixture, alimentary deprivation.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Березовський В.А., Дейнега В.Г. Физиологические механизмы саногенных эффектов горного климата. – К.: Наук. думка, 1988. – 222 с.
- Ван Лир Э., Стикней К. Гипоксия / Пер. с англ. – М.: Медицина, 1967. – 367 с.
- Гипоксия. Адаптация, патогенез, клиника / Под общ. ред. Ю.Л. Шевченко. – СПб.: ООО «ЭЛБИ-СПб», 2000. – 384 с.
- Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 51–53.
- Колчинская А.З. Использование ступенчатой адаптации к гипоксии в медицине // Вестн. Рос. АМН. – 1997. – №5. – С.12–19.
- Литовка И.Г. Дозированная гипоксия как фактор коррекции остеопении бездействия // Косм. наука і технологія. – 2002. – 8, №4. – С.81–85.
- Нагорный А.В. Старение и продление жизни. – М.: Сов. наука, 1950. – 214 с.
- Стрелков Р.Б., Чижов А.Я. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике, лечении и реабилитации. – Екатеринбург: Урал. рабочий, 2001. – 400 с.
- Bado A., Lévassieur S., Attoub S., Kermorgant S. The stomach is a source of leptin//Nature. – 1994. – **394**, №6695. – P. 790–793.
- Fernández-Tresguerres H-G. I., Alobera-Gracia M. A., Mariano C. P., Jerez L. B. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process//Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal. – 2006, №1. – P.151–157.
- Kalu D. N., Hardin R. R., Cockerham R., Yu B. P., Norling B. Lifelong food restriction prevents senile osteoporosis and hyperparathyroidism in F344 rats//Mech. Ageing Dev. – 1984. – **26**. – P.103–112.
- Lane M.A., Reznick A.Z., Tilmont E.M. Aging and food restriction alter some indices of bone metabolism in male rhesus monkeys (Macaca mulatta)//J. Nutrit. – 1995. – **125**, №6. – P. 1600–1610.
- MeiЯner U., Hdnisch C., Цstreicher I., Knerr I. Differential Regulation of Leptin Synthesis in Rats During Short-term Hypoxia and Short-term Carbon Monoxide Inhalation//Europ. J.Endocrinol. – 2005. – **153**, №3. – P. 455–461.
- McCay C.M. Reprint size//Science. – 1941. – **94**, №2444. – 415 p.
- Netzer N.C., Chytra R., Кърper T. Low intense physical exercise in normobaric hypoxia leads to more weight loss in obese people than low intense physical exercise in normobaric sham hypoxia//Sleep Breath. – 2008. – **12**. – P.129–134.
- Ohlsson C., Bengtsson B., Isaksson Olle G. Growth Hormone and Bone// Endocrine Rev. – 1998. – **19**, №1. – P. 55–79.
- Reeve J. PTH: a future role in management of osteoporosis?//J.Bone Miner. Res. – 1996. – **11**, №4. – P.440–445.
- Takeda S. Central control of bone remodeling//Biochem. and Biophys. Res. Comm. – 2005. – **328**, №4. – P. 697–699.
- Talbott S. M., Cifuentes M., Dunn M. G. , Shapses S.A. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats// J. Nutrit. – 2001. – **131**. – P.2382–2387.
- Weindruch R., Sohal R. S. Caloric intake and aging// New Engl. J. Med. – 1997. – **337**, №6. – P. 984–986.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: litir@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 09.09.2008