

В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, І.Г. Літовка, Р.В. Янко

Вплив нормобаричної гіпероксії на показники метаболізму кісткової тканини

Вивчено вплив модельованої протягом 14 і 28 діб нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини у 3- і 12-місячних щурів-самців лінії Вістар. Показано, вірогідне зниження вмісту С-термінального пропептиду колагену I типу на 36 %, збільшення концентрації піридиноліну на 37 % і С-термінального телопептиду колагену I типу на 8 % у сироватці крові молодих тварин, які протягом 14 сеансів дихали нормобаричною газовою сумішшю з 90 % O₂. У дорослих щурів за таких самих умов виявлено вірогідне зниження концентрації піридиноліну в сироватці крові на 27 %, вміст С-термінального пропептиду колагену I типу не змінювався у жодній із досліджуваних груп. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90%) супроводжується порушенням синтезу колагену у молодих щурів. У дорослих тварин не виявлено негативних наслідків впливу обох рівнів нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини.

Ключові слова: нормобарична гіпероксія, С-термінальні пропептиди колагену I типу, С-термінальні телопептиди колагену I типу, піридинолін.

ВСТУП

Визначення фізіологічного стану кісткової тканини за допомогою біохімічних показників дає змогу оцінити стан кістки, встановити швидкість обмінних процесів. Важливу інформацію про метаболізм кісткової тканини дають такі показники синтезу, як С-термінальні пропептиди колагену I типу (СІСР) або продукти деградації колагену I типу С-термінальні телопептиди колагену I типу (β -CrossLaps) і піридинолін.

Вивчення компонентів колагену I типу, насамперед пропептидів колагену I типу має певний інтерес, адже він є основним органічним компонентом кісткової тканини і створює передумови для використання СІСР як складової кісткоутворення. Відомо, що зріла молекула колагену I типу включається у склад кісткового матриксу, а СІСР залишаються в екстрацелюлярній рідині. Співвідношення кількості колагену, що відкладається у кістковий матрикс і

СІСР, що надходить у кровообіг, теоретично дорівнює одиниці. Тому за вмістом пропептидів можна говорити про спроможність остеобластів синтезувати колаген I типу.

Дослідження β -CrossLaps у сироватці крові дає змогу оцінити темпи деградації кісткової тканини. Вважають, що вміст С-телопептиду спірального домену у сироватці крові, який визначають імунологічним методом, є показником метаболізму колагену, а не специфічним маркером кісткової резорбції [7].

Піридинолін або гідроксилізілпіридинолін – невідновлюваний поперечнозв'язаний піридин, також є компонентом колагену I типу. Він відіграє значну роль в його стабілізації і надає своєрідність структурі колагену та еластину. Поперекові зв'язки формуються у міжклітинному матриксі після структурної організації молекул колагену. Під час резорбції кісткової тканини, що здійснюється остеокластами та при руйнуванні колагену, можливий вихід піридиноліну в судинне русло.

© В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, І.Г. Літовка

Парціальний тиск кисню (P_{O_2}) є важливим чинником енергетичного метаболізму та процесів остеогенезу. З 60-х років ХХ сторіччя у дослідженнях *in vivo* та *in vitro* відтворені численні спроби встановити ефекти змін P_{O_2} на процеси ремоделювання кісткової тканини [3, 5, 7, 9, 10]. Однак отримані дані суперечливі. Це пов'язують з різними умовами проведення експериментів. Більшість досліджень здійснено в умовах гіпербарії, коли P_{O_2} дорівнював 1 – 3 ата [1, 2, 5]. Відомо також, що само по собі перебування людини чи тварини в умовах підвищеного атмосферного тиску, призводить до суттєвих змін у роботі основних систем і тканин організму. Тому варто визначати як атмосферний тиск, так і P_{O_2} у середовищі.

Мета нашої роботи – вивчення показників метаболізму кісткової тканини в умовах моделювання двох рівнів нормобаричної гіпероксії на щурах різного віку.

МЕТОДИКА

Дослідження було проведено на 80 щурах-самцях віком 3 і 12 міс (на початок експерименту). Дослідним тваринам впродовж 14 та 28 діб щоденно по годині подавали нормобаричну гіпероксичну газову суміш (ГГС) із вмістом O_2 40 % ($P_{O_2} = 304$ мм рт.ст.) і 90 % ($P_{O_2} = 684$ мм рт.ст.; табл.1). Контрольних щурів кожної вікової групи утримували в умовах віварію протягом такого самого терміну.

У сироватці крові щурів методом імуноферментного аналізу за допомогою стандартних наборів реактивів визначали вміст СІСР («IDS Inc.», США), β -CrossLaps («IDS Inc.», США), піридинолін («Quidel Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати досліджень показали, що у 3-місячних тварин через 14 сеансів дихання

ГГС із 90 % O_2 вміст СІСР вірогідно знизився на 36 %. Після 28 сеансів спостерігали лише тенденцію до його зниження (рис. 1).

У 12-місячних щурів вміст СІСР у сироватці крові вірогідно не змінювався в жодній із досліджуваних груп тварин.

Отримані нами результати свідчать про відсутність змін концентрації СІСР у сироватці крові молодих і дорослих щурів, які впродовж 14, так і 28 діб дихали нормобаричною ГГС із 40 % O_2 . Це відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації O_2 у газовому середовищі, призначеному для оксигенотерапії. Перебування молодих тварин протягом 14 сеансів за умов більш високого ступеня нормобаричної гіпероксії (90 %) призводить до вірогідних змін концентрації СІСР, що можна вважати ознакою оксидативного стресу. Він супроводжувався зниженням вмісту СІСР на 36 %. Припускаємо, що такі зміни можуть бути наслідком зниження як кількості остеобластів, так і їх спроможності синтезувати колаген I типу в кількостях, потрібних для нормального розвитку кісткової тканини молодих тварин.

Дослідження показників резорбції кісткової тканини показало, що концентрація β -CrossLaps вірогідно збільшувалася відносно контрольних значень у молодих тварин після 14 сеансів дихання ГГС із вмістом O_2 90 % (рис. 2,а). У 3-місячних щурів інших дослідних груп вірогідних відмінностей від контролю не спостерігали.

Дорослі тварини (12 міс) дещо інакше реагували на нормобаричну гіпероксію. У них через 14 сеансів дихання ГГС із вмістом O_2 40 % концентрація β -CrossLaps вірогідно знижувалася (див. рис. 2,б).

Таким чином, визначення вмісту β -CrossLaps у сироватці крові молодих щурів після їх перебування у ГГС із 90 % O_2 протягом 14 сеансів показало підвищення темпів деградації колагену. У дорослих тварин у тих самих умовах (14 і 28 сеансів)

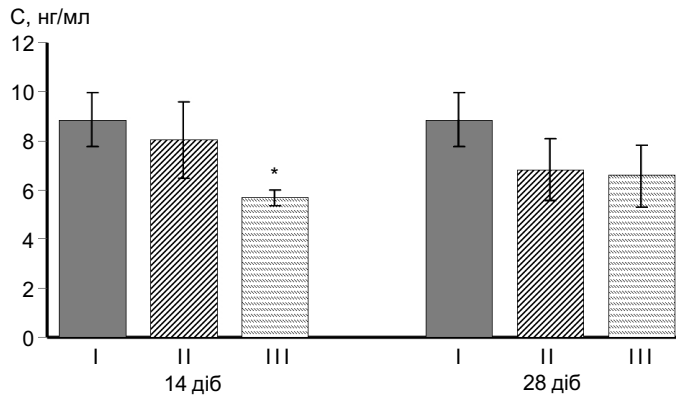


Рис. 1. Зміни концентрації С-термінального пропептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних контрольних (I) та дослідних (II – 40 % O₂, III – 90 % O₂) груп щурів. *P<0,05 порівняно з контролем

не виникає вірогідних змін показників метаболізму колагену. На наш погляд, така різниця в реакції може відбуватися за рахунок надлишку дози кисню, який отримували тварини протягом експерименту. Якщо прийняти, що в атмосферному повітрі 21 % O₂, що відповідає 160 мм рт. ст., то за одну годину умовна доза впливу кисню буде $9,6 \cdot 10^3$ мм рт.ст. · год. У ГГС (40 % O₂ за годину) умовна надлишкова доза кисню становить $18 \cdot 10^3$ мм рт.ст. · год і зростає майже вдвічі відносно атмосферного повітря. При подальшому підвищенні кисню у ГГС (90 % O₂) протягом години умовна надлишкова доза кисню стає $41 \cdot 10^3$ мм рт.ст. · год, що в 4,3 раза вище, ніж при диханні атмосферним повітрям. Саме це призвело до виразних змін у метаболізмі колагену кісткової тканини молодих щурів (табл. 2).

При визначенні концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин, які протягом години дихали газовою сумішшю зі вмістом 40 % O₂ як 14, так і 28 сеансів, ми спостерігали лише тенденцію до його підвищення. При перебуванні цих щурів у газовому середовищі з 90 % O₂

протягом 14 діб вміст піридиноліну у сироватці крові вірогідно підвищувався порівняно з контролем на 37 % (рис. 3,а). Отримані результати односпрямовані з такими стосовно змін концентрації СІСР при цій самій умовній дозі надлишку кисню.

У 12-місячних тварин за умов дихання 90 % кисню протягом 14 сеансів концентрація піридиноліну у сироватці крові вірогідно знизилася порівняно з контрольними значеннями на 27 % (див. рис. 3,б). При диханні газовою сумішшю зі вмістом O₂ 40 % протягом 14 і 28 сеансів у дорослих щурів значення цього показника не змінювалося.

Вірогідне підвищення концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин після 14 сеансів дихання газовою сумішшю з вмістом 90 % O₂ свідчить про руйнування колагену і зростання активності остеокластів.

У літературі існують відомості про те, що в експериментах *in vitro* на культурі остеобластів максимальний остеогенез відбувається в газовому середовищі з 35 % O₂, тобто у стані помірної гіпероксії. Концентрація кисню 95 % спричиняє істотне гальмування остеогенезу та значну втрату

Таблиця 1. Тривалість гіпероксичного впливу та число циклів гіпероксія–оксигенація за 14 і 28 діб

Режим впливу	За 14 діб		За 28 діб	
	Час впливу	Число циклів	Час впливу	Число циклів
40 % O ₂	840	14	1680	28
90 % O ₂	840	14	1680	28

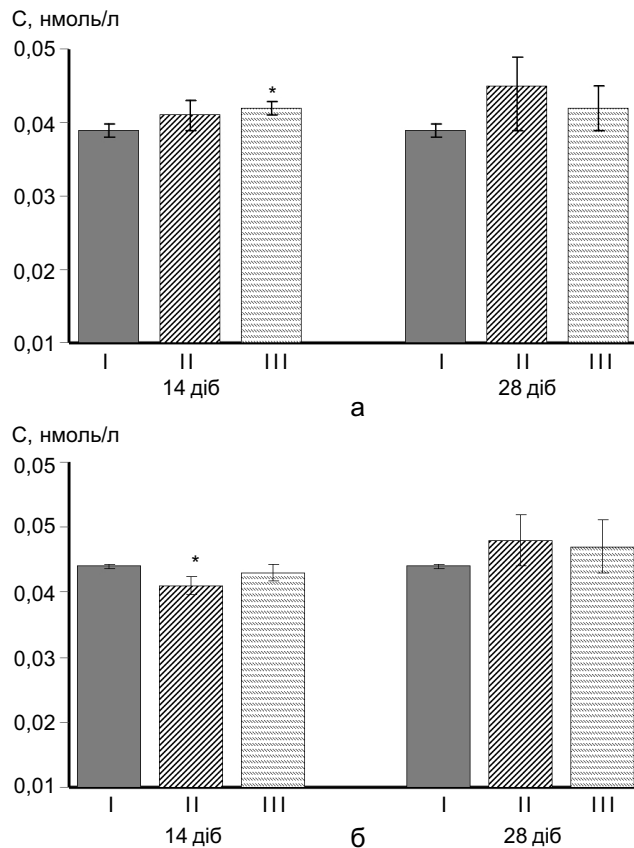


Рис. 2. Зміни концентрації С-термінального телопептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (I) і дослідних (II – 40 % O₂, III – 90 % O₂) груп щурів. * P<0,05 порівняно з контролем

клітин. Автори дослідження припускають, що такий ефект виникає в наслідок збільшення продукції високотоксичних активних форм O₂, які викликають оксидативний стрес [9]. Подібні дані отримані іншими дослідниками на культурі клітин гомілки 11-добових ембріонів курчат при інкубації на згустках плазми у п'яти різних газових середовищах із вмістом O₂ – 5, 20, 35, 65 і 95 %. Посилення остеогенезу спостерігали в умовах середовища з 35 % O₂. Форму-

вання колагенових волокон і активність остеогенезу пригнічувалися за умов зниження O₂ до 5 %. При 95 % O₂ воно відбувалося, але в меншому ступені [8].

На підставі результатів проведених нами експериментів можна зробити висновок, що 40 % O₂ у вдихуваному повітрі по 1 год щоденно не викликає істотних змін досліджених показників синтезу колагену, що відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації

Таблиця 2. Умовна доза кисню у гіпероксичній газовій суміші при різній тривалості дихання

Показники	1 сеанс		14 сеансів		28 сеансів	
	40 %	90 %	40 %	90 %	40 %	90 %
Умовна доза впливу, мм рт.ст. · год гіпероксичної газової суміші	18 · 10 ³	41 · 10 ³	252 · 10 ³	574 · 10 ³	504 · 10 ³	1148 · 10 ³
надлишку кисню	8,4 · 10 ³	31,4 · 10 ³	117,6 · 10 ³	439,6 · 10 ³	235,2 · 10 ³	879,2 · 10 ³

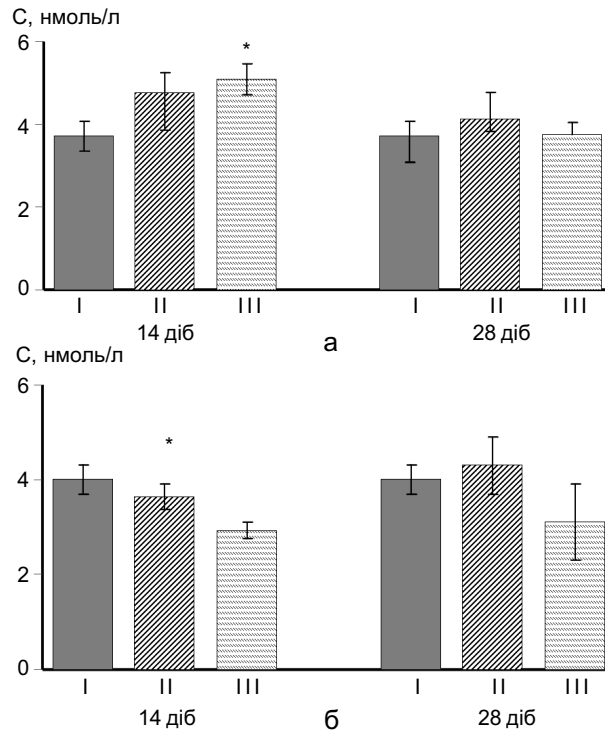


Рис. 3. Зміни концентрації піридиноліну у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (I) та дослідних (II – 40 % O₂, III – 90 % O₂) груп щурів. * P<0,05 порівняно з контролем

кисню у газовому середовищі. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одиноднинних сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O₂) супроводжується вірогідним зниженням СІСР на 36 %, зростанням концентрації піридиноліну на 37 % та концентрації β-CrossLaps на 8 % у сироватці крові. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90%) супроводжується порушенням синтезу колагену у молодих щурів. У дорослих тварин не виявлено негативних наслідків впливу обох рівнів нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини.

**В.А. Березовский, Т.М. Заморская,
И.Г. Литовка, Р.В. Янко**

ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПЕРОКСИИ НА ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА КОСТНОЙ ТКАНИ

Изучено влияние нормобарической гипероксии, моделированной в течение 14 и 28 сут, на метаболиты костной ткани у 3- и 12-месячных крыс-самцов линии Вистар.

Показано, достоверное снижение концентрации С-терминального пропептида коллагена I типа на 36 %, увеличение содержания пиридинолина на 37 % и С-терминального телопептида коллагена I типа на 8 % в сыворотке крови молодых животных, которые в течение 14 сеансов дышали нормобарической газовой смесью с 90 % O₂. У взрослых крыс в тех же условиях выявлено достоверное снижение концентрации пиридинолина в сыворотке крови на 27 %, а содержание С-терминального пропептида коллагена I типа не изменялось ни в одной из исследованных групп животных. Считаем, что 14-суточная нормобарическая гипероксия (90 %) сопровождается нарушением синтеза коллагена костной ткани у молодых крыс. У взрослых животных не обнаружено негативных последствий влияния обеих уровней гипероксии на метаболиты костной ткани.

Ключевые слова: нормобарическая гипероксия, С-терминальные пропептиды коллагена I типа, С-терминальные телопептиды коллагена I типа, пиридинолин.

**V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska, I.G. Litovka,
R.V. Yanko**

NORMOBARIC HYPEROXIA EFFECTS ON THE MARKERS OF BONE METABOLISM

We studied the influencing of normobaric hyperoxia one hour

daily during 14 and 28 days on the bone metabolism for 3- and 12-monthly Wistar male-rats (n =80). It was shown, that breathed normobaric gas mixture with 90% O₂ during 14 days significant reducing of C-terminal propeptides of type I collagen levels for 36%, an increasing piridinolin levels for 37% and concentration of C-terminal telopeptides of type I collagen for 8% in the blood serum. We found reliable decreasing the concentration of piridinolin levels for 27% in adult rats in the same conditions. The C-terminal propeptides of type I collagen levels did not change in any of the groups' research. We believe that 14 days normobaric hyperoxia (90%) in young animals accompanied by violation of collagen synthesis. The adult rats were more stable and had no changes after influence the two hyperoxia levels.

Key words: normobaric hyperoxia, C-terminal propeptides of type I collagen, C-terminal telopeptides of type I collagen, piridinolin.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гюльназарова С.В., Кучиев А.Ю. Возможности гипербарической оксигенации в коррекции сниженной минеральной плотности кости у больных с несращением переломов // Травматология и ортопедия России. – 2007. – 3, №45. – С. 27–30.
2. Кучиев А.Ю. Применение гипербарической оксигенации при лечении ложных суставов трубчатых костей, осложненных остеопорозом (экспериментально-клиническое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. Наук. – Новосибирск, 2008. – 26 с.
3. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – К.: ДП “Інформаційно-аналітичне агентство”, 2011. – 243 с.
4. Asher M.A., Sledge C.B. Hyperoxia and in vitro bone resorption // Clin. Orthop. and Rel. Res. – 1968. – 61, №6 – P. 48–51.
5. Goldhaber P. The effect of hyperoxia on bone resorption in tissue culture // Arch. Pathol. – 1958. – 66, №5. – P. 635–641.
6. Gokce S., Bengi O., Akin E., Karacay S., Sagdic D., Kurkcü M., Gokce H. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement // Ang. Orthod. – 2008. – 78, №2. – P.304–308.
7. Gray D.H., Katz J.M., Speak K.S. The effect of varying oxygen tensions on hydroxyproline synthesis in mouse // Clin. Orthop. and Rel. Res. – 1980. – 146, №5 – P.276–281.
8. Hassager C., Jensen L.T., 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 // Calc. Tiss. Int. – 1994. – 54, №.1– P.30–33.
9. Joseph L., Shaw M.D., Andrew C.L., Bassett M.D. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro // J. Bone and Joint Surg. – 1967. – 49-A, №1. – P.73–80.
10. Tuncay O.C., Ho D., Barker M.K. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Amer. J. Orthd. Dent. Orthop. – 1994. – 105, №5. – P. 457–463.

*Ін-т фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ
E-mail: vadber@biph.kiev.ua*

Матеріал надійшов до редакції 29.03.2011