

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

## Фізіологічна регенерація кісткової тканини за умов дозованої нормобаричної гіпоксії

*Исследовали влияние трех различных режимов подачи нормобарической газовой смеси со сниженным парциальным давлением кислорода на физиологическую регенерацию костной ткани 64 взрослых крыс. О состоянии регенерации судили по активности биохимических маркеров ремоделирования кости и гормонов, регулирующих этот процесс. Показано, что периодическое вдыхание животными газовой смеси азота и кислорода ( $P_{O_2} = 76$  мм рт.ст.) в режимах 10 мин деоксигенации и 10 мин реоксигенации 4 ч и 1 ч непрерывно на протяжении 28 сут является достаточным для интенсификации физиологической регенерации костной ткани.*

### ВСТУП

Життєдіяльність організму супроводжується постійною фізіологічною регенерацією клітин. У кістковому мозку, слизових оболонках шлунково-кишкового тракту, покривному епітелії шкіри, клітинний склад оновлюється достатньо швидко. Водночас для нервових, м'язових клітин і кісткової тканини темпи регенерації більш повільні [9, 16, 17]. Період онтогенезу, інтенсивність функціонального навантаження, іонізуюча радіація, невагомість та особливості харчування можуть впливати на інтенсивність самовідновлення тканин організму [1, 2]. Модулювальний вплив на цей процес здійснюють деякі лікарські препарати (імунодепресанти, кортикостероїди, цитостатики, антибіотики). Для протидії негативним тенденціям розвитку остеопорозу внаслідок урбанізації, віку, фармакологічних препаратів та стресорних факторів, крім загальновідомих остеопротекторних речовин, доцільно використовувати більш безпечні немедикаментозні, біофізичні методи стимуляції остеогенезу.

Дослідження Сиротиніна [7] та його послідовників [1, 3, 5] показали, що перебування в умовах гірського клімату та дихання

повітрям зі зниженим парціальним тиском кисню ( $P_{O_2}$ ) стимулює гемопоєз, поліпшує кровообіг і підвищує загальну неспецифічну резистентність організму. Нашими попередніми дослідженнями підтверджено, що дозована переривчаста нормобарична гіпоксія змінює концентрацію паратиреоїдного гормону, остеокальцину та С-термінального пропептиду І типу. Саме ці біологічно активні речовини здатні впливати на темпи регенерації кісткової тканини та зменшувати негативні ефекти гіпокінезії та остеопенії бездіяльності у лабораторних щурів. Показано, що різні режими подачі гіпоксичної газової суміші мають неоднакову ефективність. Особливо чітко ці розбіжності проявлялися при використанні циклів деоксигенація/реоксигенація 10/10 і 10/20 хв [3].

Мета нашої роботи – пошук максимально ефективного для стимуляції фізіологічної регенерації кісткової тканини режиму подачі газової суміші зі зниженим парціальним тиском кисню.

### МЕТОДИКА

Досліди виконано на 64 щурах-самцях лінії Вістар віком 6 і 9 міс. Контрольні щури обох вікових груп перебували за звичайних умов

віварію. Дослідних щурів розподілили на 6 груп по 8 тварин у кожній. Вони періодично дихали гіпоксичною газовою сумішшю (10 %  $O_2$  в азоті) в режимі 10 хв деоксигенації і 10 хв реоксигенації протягом однієї години (I), чотирьох годин (II) або гіпоксичною газовою сумішшю одну годину безперервно (III). Подачу гіпоксичної газової суміші здійснювали від мембранної газорозподільної системи апарату “Борей-М” виробництва НД медико-інженерного центру “НОРТ” НАН України в першій половині дня протягом 28 діб. Тривалість гіпоксичного впливу і число циклів деоксигенації/реоксигенації за 1 та 28 діб представлено у таблиці.

Всі щури знаходилися на стандартному раціоні віварію та мали вільний доступ до питної води. Як у контрольних, так і у дослідних щурів щотижнево натщесерце реєстрували масу тіла кожної особини.

Матеріалом для біохімічних досліджень були свіжовиділені стегнові кістки щурів і сироватка крові, які одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини вимірювали за допомогою спектрофотометричних та імуноферментних методів. У сироватці крові та кістковій тканині визначали показники формування кісткової тканини: соматотропний гормон (реактиви фірми “SPI-BIO”, Франція), лужну фосфатазу (КФ 3.1.3.1, реактиви фірми “Лахема”, Чехія) та її кістковий ізофермент. Показники резорбції оцінювали за загальною каталітичною активністю кислої фосфатази (КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентної кислої фосфатази (реактиви фірми “Лахема”, Чехія), а також

концентрацією глікозаміногліканів за методом Кляцкіна [4], гіалуронідазної активності за методом Шараєва та співавт. [8]

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

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Показано, що маса тіла у 6- і 9-місячних щурів контрольної групи збільшувалася протягом усього експерименту. Приріст маси тіла за 28 діб для 6-місячних тварин становив 11,8 % порівняно з вихідними значеннями, а у 9-місячних – 5,3 %. Таким чином, темпи приросту маси 9-місячних щурів виявляються вдвічі нижчими, ніж у 6-місячних тварин, що відповідає, описаному багатьма авторами, онтогенетичному зниженню темпів регенерації з віком.

У 6-місячних тварин, що дихали гіпоксичною газовою сумішшю у трьох різних режимах, знижувалася маса тіла за перший тиждень від 1,4 до 3,3 %. Протягом трьох наступних тижнів на момент закінчення експерименту маса тіла цих тварин збільшилася в середньому на 6 % порівняно з вихідною масою.

У 9-місячних щурів маса тіла зменшувалася при диханні гіпоксичною газовою сумішшю у режимах II і III за перший тиждень. Протягом наступних 3 тиж у 9-місячних щурів в ідентичних умовах експерименту відбувалося уповільнене збільшення маси тіла. Так, при III режимі дихання гіпоксичною газовою сумішшю вона збіль-

Параметри циклів деоксигенації/реоксигенації та тривалості впливу

Вплив, хв	Загальна тривалість сеансу, год	Тривалість, хв	Кількість циклів	Тривалість, хв	Кількість циклів
		За 1 добу		За 28 діб	
I режим (10/10)	1	30	3	840	84
II режим (10/10)	4	120	12	3360	336
III режим (60)	1	60	1	1680	28

шилася лише на 0,4 %, при режимі I – на 3,3 %, а при режимі II навіть знизилася на 0,7 %. Таким чином, за показниками збільшення загальної маси тіла 6-місячні щури краще пристосовуються до нестачі кисню у вдихуваній газовій суміші при всіх трьох режимах її подачі у порівнянні з 9-місячними тваринами.

Метаболічний стан клітинних елементів кісткової тканини, які характеризують інтенсивність її фізіологічного відновлення-руйнування ми оцінювали на підставі активності відповідних біохімічних маркерів обох основних типів клітин, які беруть участь у фізіологічному ремоделюванні кісткової тканини.

Отримані нами результати свідчать, що вихідний вміст соматотропного гормону в сироватці крові 6-місячних контрольних щурів був вірогідно вищим у 1,4 раза порівняно з 9-місячними тваринами. Можливо, саме тому адаптація до гіпоксії відбувається

у цих щурів більш активно, ніж у старших тварин. Після дихання гіпоксичною газовою сумішшю у режимі II у 6-місячних щурів спостерігали тенденцію до підвищення концентрації гормону росту у сироватці крові. Аналогічну тенденцію відзначили для 9-місячних щурів при режимі подачі гіпоксичної газової суміші II і III (рис.1,а).

Відомо, що основна функція соматотропного гормону полягає у регуляції обміну білків, процесів росту та розвитку організму [19]. До потенційних регуляторів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини відносять численні фактори росту: цитокіни, трансформуючий фактор росту, інсуліноподібний фактор росту-1 [11–14, 18–21] та інші, які активуються гормоном росту [10]. Цей гормон зв'язується зі специфічними рецепторами цитоплазматичної мембрани та індукує каскад біохімічних реакцій, результатом яких є активація або пригнічення певних фізіологічних функцій.

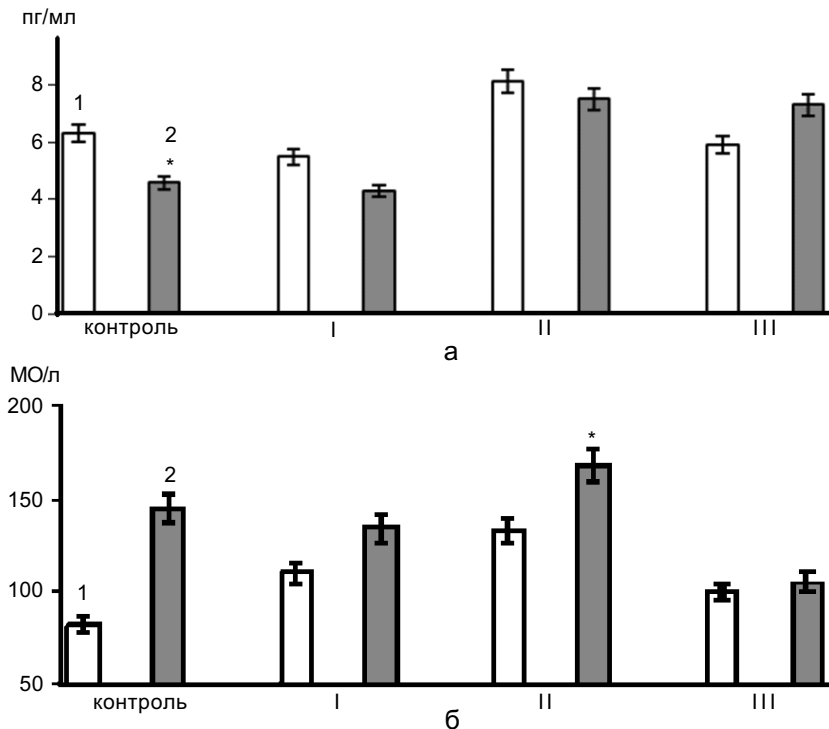


Рис. 1. Зміни концентрації соматотропного гормону (а) та активності лужної фосфатази (б) під впливом різних режимів кисневої депривації: 1 – 6-місячні тварини, 2 – 9-місячні тварини; I, II, III – режими.

\* статистично вірогідні ефекти порівняно з 6-місячними контрольними щурами

Отримані нами результати дають можливість зробити припущення, що гіпоксична газова суміш, яку подавали в режимах II і III, є тим біофізичним чинником, який запускає метаболічні реакції, спрямовані на інтенсифікацію процесів фізіологічної регенерації кісткової тканини. Ступінь проявів цього впливу пов'язаний з віком щурів і більш виразно проявляється у 9-місячних тварин. Взаємозв'язок цих чинників наведено на рис.2.

Не виключено, що зниження парціального тиску кисню у середовищі існування тварин, впливає на активність секреції соматотропного гормону через певні проміжні механізми, серед яких можуть бути HIF-1 $\alpha$ , білки теплового шоку, численні фактори росту тощо.

Проведені нами експерименти показали, що активність основного ферменту остеобластів – лужної фосфатази у 9-місячних щурів була значно вищою порівняно з 6-місячними тваринами як у контрольній групі, так і в експериментальній. Після стимулювання фізіологічної регенерації гіпок-

сичною газовою сумішшю у 6-місячних щурів цей показник виразно підвищувався при I та II режимах переривчастої подачі відносно контрольних значень (див.рис.1,б).

Слід відмітити, що за результатами наших експериментів активність кислої і тартрат-резистентної кислої фосфатази, основних ферментів остеокластів, не змінювалася суттєво відносно вихідних значень у щурів усіх досліджуваних груп, але була дещо вищою у 9-місячних тварин. Тенденція до паралельного підвищення активності основних ферментів остеобластів та остеокластів може характеризувати загальне прискорення інтенсивності процесів ремоделювання кісткової тканини, зумовлену впливом відповідних гормонів.

Проведені нами експерименти показали, що вихідна концентрація глікозаміногліканів у сироватці крові 6-місячних щурів була в 1,5 раза вищою порівняно з 9-місячними тваринами. Таку саму тенденцію спостерігали при дозованій кисневій депривації в досліджуваних групах тварин.

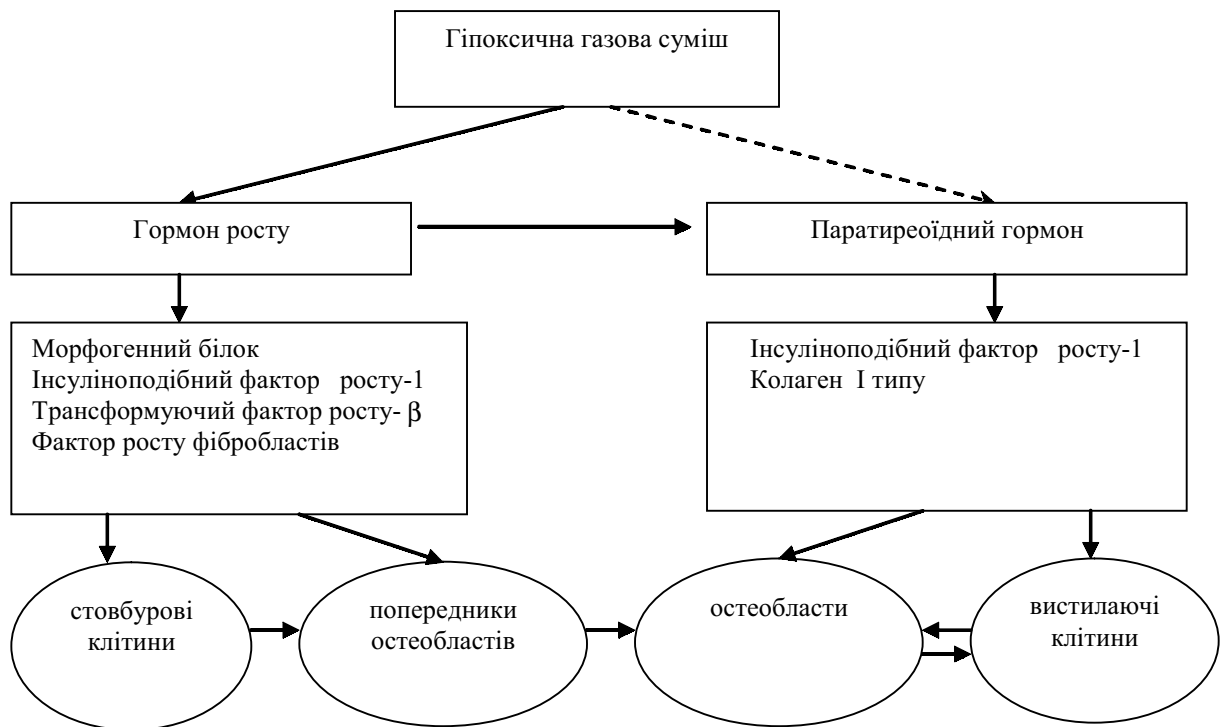


Рис. 2. Основні чинники стимуляції клітин остеобластної лінії

Фізіологічна роль глікозаміногліканів полягає в підтримці цілісності органічного матриксу, неорганічного компоненту сполучної тканини та регуляції фібрилогенезу колагену. Отримані нами результати свідчать про більш міцний зв'язок волокон колагену з глікозаміногліканами у 6-місячних тварин.

Нашими попередніми дослідженнями [3, 5] показано підвищення концентрації паратиреоїдного гормону у сироватці крові молодих і дорослих щурів, що дихали гіпоксичною газовою сумішшю зі зниженим  $P_{O_2}$ . Вважаємо, що існує можливість реципрокного впливу гормону росту та паратиреоїдного гормону на фізіологічне ремоделювання кісткової тканини. Відомо, що їх співвідношення суттєво змінюється в різні періоди онтогенезу. Не виключено, що у процесі вікової депресії секреції гормону росту, його вплив на фізіологічну регенерацію кісткової тканини компенсується підвищенням вмісту паратиреоїдного гормону та інших гуморальних регуляторів росту.

Ця гіпотеза підтверджується оригінальним дослідженням авторів [6], які зіставляли два варіанти силового тренування з аеробним і анаеробним режимом, при яких виникали переважно механічний або метаболічний стимул. При другому варіанті тренування наступні навантаження надавалися при неповному розслабленні м'яза, який знаходився в стані рухової гіпоксії. Після такого варіанту навантаження автори спостерігали вірогідне збільшення концентрації соматотропного гормону та інсуліноподібного фактора I типу в сироватці крові. Таким чином, отримано підтвердження того, що секреція анаболічних гормонів ініціюється в основному метаболічним, а не механічним стимулом з працюючого м'яза. Тобто, рухова гіпоксія при неповному розслабленні м'яза і киснева депривація без механічного стимулу, яку ми створювали в переривчастому режимі, викликає однаковий ефект гормональної активації процесів регенерації.

Вважаємо, що з трьох досліджуваних режимів гіпоксичної активації метаболізму, максимально сприятливий вплив здійснює дозована киснева депривація протягом 4 год у режимі 10/10 хв, яка має найбільшу кількість циклів деоксигенація/реоксигенація. Близькі позитивні результати одержано при застосуванні III режиму, при якому гіпоксичну газову суміш подавали безперервно впродовж 1 год. Періодичне дихання газовою сумішшю з помірно зниженим парціальним тиском кисню ( $P_{O_2} = 76$  мм рт.ст.) при оптимальному співвідношенні періодів деоксигенації та реоксигенації і дозований інтенсивності гіпоксичного впливу може бути одним із біофізичних чинників активації процесів фізіологічної регенерації кісткової тканини, темпи якої з віком та гіпокінетичним способом життя зменшуються.

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

#### **STIMULATION OF BONE TISSUE PHYSIOLOGICAL REGENERATION BY HYPOXIC GAS MIXTURES**

We investigated the effect of dosed normobaric hypoxic gas mixtures with reduced oxygen partial pressure in the different modes on stimulation of the physiological bone tissue regeneration process in adult rats. It is shown that nitrogen and oxygen gas mixture ( $P_{O_2} = 76$  mm Hg) application in the modes 10 min deoxygenation - 10 min reoxygenation during 4 hours daily or during 1 hour continuously is the optimum for an increase of biochemical markers of physiological regeneration of bone tissue.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Агаджанян Н.А., Баевский Р.М., Барсеньева А.П. Проблемы адаптации и учение о здоровье. – М.: Изд-во РУДН, 2006. – 283 с.
2. Аршавский И.А. Физиологические механизмы и закономерности индивидуального развития. – М.: Наука, 1982. – 270 с.
3. Березовський В.Я., Літовка І.Г., Костюченко О.С. Дозовані біофізичні впливи стабілізують маркери ремоделювання кісткової тканини при остеопенії розвантаження // Косм. наука і технологія. – 2005. – 11, №1/2. – С.93–97.

4. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – №10. – С.51–53.
5. Літовка І.Г. Ремоделювання кісткової тканини у низько- і високоактивних щурів в умовах 45-добової гіпокінезії та впливу дозованої кисневої деривації // Косм. наука і технологія. – 2003. – **9**, №1. – С. 92–95.
6. Попов Д.В., Цверкун Д.В., Нетреба А.И. и др. Увеличение мышечной массы и силы при низкоинтенсивной силовой тренировке без расслабления связано с гормональной адаптацией // Физиология человека. – 2006. – **32**, №5. – С.121–127.
7. Сиротинин Н.Н. Сравнительная физиология акклиматизации к высокогорному климату. – В кн.: Кислородная недостаточность. – К.: Изд-во АН УССР, 1963. – С.3–13.
8. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В., Сосулина Л.Л. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях // Клини. лаб. диагностика. – 1996. – №3. – С.21–22.
9. Beites CL, Kawachi S, Crocker CE, Calof AL. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium // Exp. Cell. Res. – 2005. – **306**, №5. – P. 309–316.
10. Canalis E. Regulation of bone remodeling. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism // Amer. Soc. Bone and Mineral Res. – 1990. – P.23–26.
11. Compston J.E. Sex steroids and bone // Physiol. Rev. – 2001. – **81**, №1. – P. 419–447.
12. Dutertre M., Smith C.L. Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – **295**, №2. – P. 431–437.
13. Grey A., Mitnick M.A., Masiukiewicz U.A. Role of interleukin-6 in parathyroid hormone – induced bone resorption in vivo // Endocrinology. – 1990. – **140**, №5. – P.4683–4690.
14. Guillain C., Martinez P., de Gortazar A.R. et al. Both N- and C-terminal domains of parathyroid hormone – related protein increase interleukin-6 by nuclear Factor – kB activation in osteoblastic cells // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №10. – P.28109–28117.
15. Kong Y-Y., Boyle W.J., Penninger J.M. Osteoprotegerin ligand a common link between osteoclastogenesis, lymph – node formation, lymphocyte development // Immun. Cell Biology. – 2000. – **21**, №10. – P.188–193.
16. Kucia M., Reza R., Jala V.R. et al. Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells // Leukemia. – 2005. – **19**, №14. – P. 1118–1127.
17. Marshman E, Booth C, Potten C.S. The intestinal epithelial stem cell // Bioessays. – 2002. – **24**, №2. – P. 91–98.
18. Martin T.J., Dempster D.W. Bone structure and cellular activity. In: Osteoporosis / Ed. J. C. Stevenson and R. Lindsay. – London: Chapman and Hall Medical, 1998. – P. 1–28.
19. Ohlsson C. Growth hormone and bone // Endocrine Reviews. – 1998. – **19**, №1. – P.55–79.
20. Patridge N.C., Jeffrey J., Ehlich L.S. Hormone regulating of production collagenase and collagenase inhibitor activity by rat osteogenic sarcoma cells // Endocrinology. – 1987. – **120**, №5. – P.1956–1962.
21. Purdie D.W. Selective estrogen receptor modulation: HRT replacement therapy? // Brit. J. Obster. Gynaecol. – 1997. – **104**, №10. – P.1003–1005.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,  
Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 04.09.2007*