

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

Нормобарична гіпероксія впливає на остеогенез щурів

Вивчено вплив нормобаричної гіпероксії на метаболізм кісткової тканини у 3- і 12-місячних щурів-самців лінії Вістар. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одноденних щодобових сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O₂) супроводжується вірогідним зниженням концентрації С-термінальних пропептидів калагену I типу на 36 %, активності кислої фосфатази (КФ) на 32 %, зростанням активності лужної фосфатази на 64 %, концентрації піридиноліну на 37 %, β-CrossLaps на 8 %, та глікозаміногліканів (ГАГ) на 72 % у сироватці крові. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія порушує синтез колагену. У дорослих щурів за тих самих умов концентрація ГАГ у сироватці крові вірогідно зростає на 60 % відносно контрольних значень. Через 28 сеансів дихання гіпероксичною газовою сумішшю (ГГС) із 90 % O₂ – на 195 %. Активність КФ і тартратрезистентної кислої фосфатази знижувалась від 18 до 25 % при диханні ГГС як із 40 %, так і 90 % O₂ протягом 14 та 28 діб. Припускаємо, що у дорослих тварин 90%-ва гіпероксія не змінює активність остеобластів, проте порушує зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену, знижує активність лізосомальних ферментів, продукованих остеобластами, що може призвести до гальмування остеогенезу. Ключові слова: нормобарична оксигенація, кісткова тканина.

ВСТУП

Парціальний тиск кисню є одним із суттєвих факторів, що зумовлює функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його клітин, у тому числі й кісткових. Його зниження (гіпоксія) найчастіше є порушенням газового складу зовнішнього середовища. Існує чимало досліджень *in vitro* та *in vivo* в яких доведено, що знижений парціальний тиск кисню газової суміші відіграє важливу роль у процесах ремоделювання кісткової тканини (КТ) [2, 10, 13]. І в наших попередніх працях наведено значення фізіологічних, біохімічних і морфологічних показників стану КТ та її клітинних елементів за умов дозованої нормобаричної гіпоксії різної тривалості [3, 8].

Особливу актуальність набуває порівняльне дослідження помірних і підвищених доз кисню у газовій суміші на показники остеогенезу, які відображають онтогенетич-

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

но зумовлені, адаптаційні процеси, що відбуваються на клітинному, субклітинному і молекулярному рівнях [12, 14].

Мета нашої роботи – дослідження впливу нормобаричної гіпероксії на показники остеогенезу щурів різного віку.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено у весняний період на 80 щурах-самцях віком 3 і 12 міс (на початок експерименту). Щури контрольних груп перебували за стандартних умов виварію протягом 14 або 28 діб. Дослідним тваринам подавали штучну газову суміш із підвищеним парціальним тиском кисню (ГГС) по 1 год на добу протягом 14 або 28 діб із вмістом кисню 40 і 90 %. За одну добу загальна тривалість гіпероксичного впливу становила 60 хв, 14 діб – 840 хв і 28 діб – 1680 хв відповідно.

Досліди проводили з виконанням міжна-

родних вимог про гуманне ставлення до тварин.

Маркери остеогенезу досліджували за допомогою спектрофотометричних і імуноферментних методів. У сироватці крові визначали показники формування КТ: активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1, «Лаксема», Чехія), концентрацію С-термінальних пропептидів колагену І типу (СІСР) за допомогою стандартних наборів реактивів («IDS Inc.», США). Показники резорбції КТ – загальну каталітичну активність кислій фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) та тартратрезистентної кислій фосфатази (ТРКФ, «Лаксема», Чехія), гіалуронідазну активність, концентрацію С-термінальних телопептидів колагену І типу (β-CrossLaps, «IDS Inc.», США), піридиноліну («Quidel Corporation», США), глікозаміногліканів (ГАГ) визначали за методом Кляцкіна [6], гіалуронідазну активність – за методом Шараєва та співавт. [9].

Цифрові результати обробляли з використанням пакету програмного забезпечення Magellan 3.0, програми Microsoft Excell 2007. Для визначення вірогідності відмінностей між двома вибірками використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Швидкість утворення або руйнування органічного матриксу КТ може оцінюватися вимірюванням активності таких специфічних ферментів остеобластів і остеокластів, як ЛФ і КФ або ж визначенням компонентів, що надходять у кровотік під час синтезу чи резорбції кістки.

Результати досліджень показали, що у 3-місячних тварин активність ЛФ у сироватці крові як через 14, так і 28 сеансів дихання ГГС із 40 % O₂ не змінювалася. Збільшення вмісту O₂ протягом 28 сеансів до 90 % призвело до вірогідного зростання цього показника (на 64 %) порівняно з контролем. Дещо по-іншому реагували 12-

місячні щури на підвищення вмісту O₂ у газовій суміші. Вірогідне зниження на 32 % ЛФ ми спостерігали лише через 28 сеансів дихання ГГС із 40% O₂.

Певний інтерес має вивчення компонентів колагену І типу, насамперед, пропептидів проколагену І типу – СІСР. Адже за їх вмістом можна оцінювати спроможність остеобластів синтезувати колаген І типу. У 3-місячних тварин цей показник вірогідно знизився на 36 % через 14 сеансів дихання ГГС із 90 % O₂. Після 28 сеансів спостерігали лише тенденцію до його зниження. У 12-місячних щурів концентрація С-термінальних пропептидів колагену І типу не змінювалась у жодній із досліджуваних груп тварин.

Отримані нами результати свідчать про відсутність змін концентрації СІСР у сироватці крові молодих і дорослих щурів, які як 14, так і 28 діб дихали нормобаричною ГГС з 40 % O₂. Це відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації O₂ 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 є ознакою оксидативного стресу. У разі останнього змінюється активність ферментів внаслідок пошкодження біополімерів (порушення внутрішньо- та міжмолекулярних зв'язків) [5]. У наших дослідженнях він супроводжувався також зниженням вмісту СІСР на 36 %. Припускаємо, що такі зміни можуть бути наслідком зниження як кількості остеобластів, так і їх спроможності синтезувати колаген І типу в кількостях, потрібних для нормального розвитку КТ молодих тварин.

Дослідження показників резорбції КТ показало вірогідне зниження порівняно з контролем активності КФ у сироватці крові 3-місячних тварин на 32 і 36 % відповідно, що дихали ГГС із вмістом 90% O₂ протягом

14 і 28 сеансів (рис. 1). Аналогічно більш низькою була активність ТРКФ у щурів цієї вікової групи на 47 і 44 % ($P < 0,05$) через 14 і 28 сеансів відповідно (див. рис. 1).

У 12-місячних тварин через 14 сеансів спостерігали лише тенденцію до зниження активності КФ після вдихання ГГС із 40 % O_2 . Через 28 сеансів цей показник знизився на 18 % ($P < 0,05$) порівняно з контрольними значеннями. При диханні газовою сумішшю із 90 % O_2 , навпаки, відбулося вірогідне зниження активності КФ на 24 % через 14 сеансів, в той час як при 28 сеансах вона не змінювалася (рис. 2).

Активність ТРКФ у сироватці крові 12-місячних тварин знижувалася на 18 % ($P < 0,05$) через 14 сеансів 40%-ї гіпероксії і на 25 % при диханні ГГС із 90 % O_2 (див. рис. 2).

Таким чином, зниження активності лізосомальних ферментів у сироватці крові свідчить про гальмування резорбції КТ і як наслідок затримання подальшого її утворення. Гіпероксія (40 і 90 %) протягом 14 і 28 сеансів негативно впливає на остеокласти, пригнічуючи їх активність здебільшого у молодих щурів.

Концентрація ГАГ у 3-місячних щурів після 14 сеансів перебування у ГГС із 40 % O_2 мала лише тенденцію до підвищення, водночас як через 28 сеансів вона вірогідно зростала на 79 % порівняно з контрольними значеннями (рис. 3). При перебуванні тварин у ГГС із 90 % O_2 як 14 діб, так і 28 діб, цей показник підвищувався на 72 і 138 % ($P < 0,05$) відповідно.

У 12-місячних тварин в умовах гіпероксії (40 і 90 %) протягом 14 сеансів концентрація ГАГ вірогідно збільшилася приблизно на 60 % відносно контрольних значень (див. рис. 3). Через 28 сеансів дихання газовою сумішшю із 90 % O_2 вона залишалася підвищеною порівняно з контролем на 195 % ($P < 0,05$).

Таким чином, збільшення концентрації ГАГ у сироватці крові молодих і дорослих тварин в умовах гіпероксії може свідчити про порушення зв'язку між ним і фібрилами колагену.

Гіалуронідазна активність – це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозоамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. Підвищення гіалуронідазної активності у сиро-

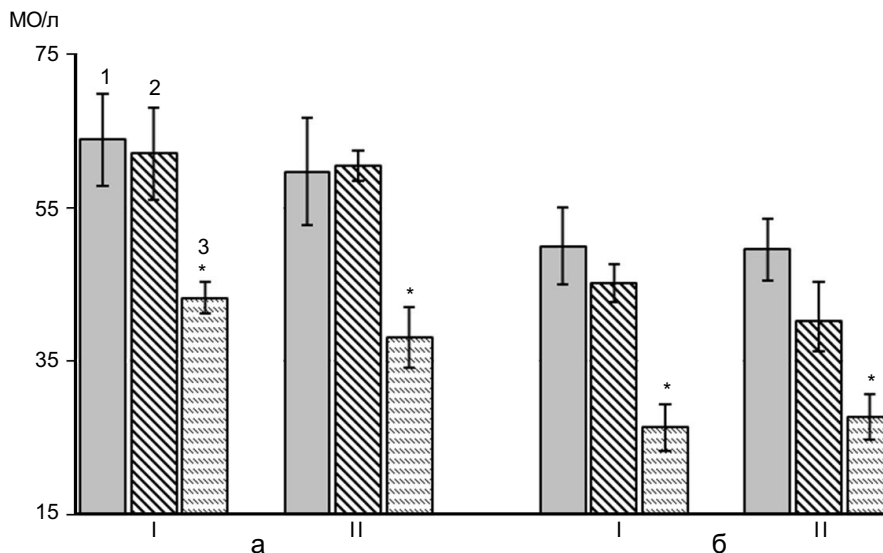


Рис. 1. Зміни активності кислої фосфатази (а) і тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові 3-місячних контрольних (1) і дослідних (2 – 40 % O_2 , 3 – 90 % O_2) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

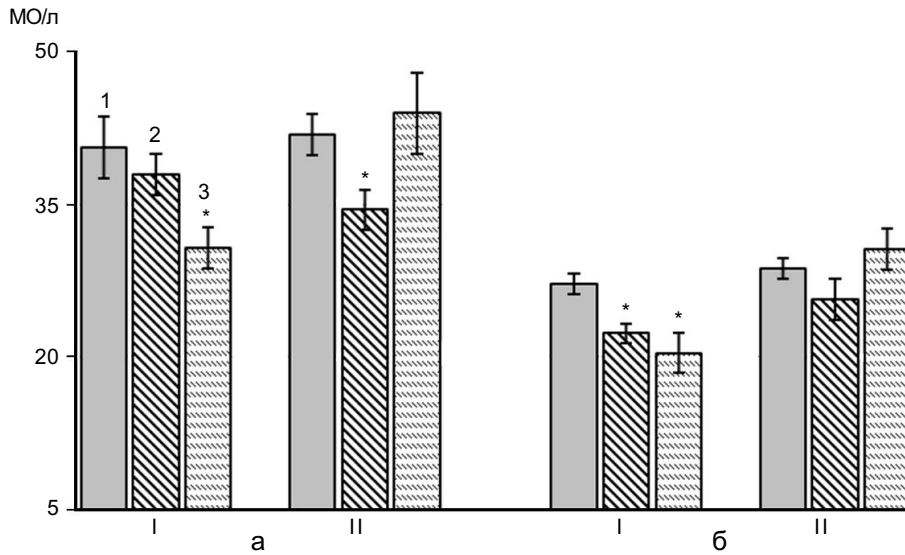


Рис. 2. Зміни активності кислоти фосфатази (а) і тартратрезистентної кислоти фосфатази (б) у сироватці крові 12-місячних контрольних (1) та дослідних (2 – 40 % O₂, 3 – 90 % O₂) груп урів. *P<0,05 порівняно з контролем

ватці крові 3-місячних тварин спостерігали через 14 сенсів їх перебування в умовах гіпероксії (40 і 90 %) на 114 і 76% відповідно порівняно з контролем. Через 28 сенсів цей показник не змінювався порівняно з контролем у жодній з досліджуваних груп щурів. У 12-місячних тварин гіалуронідазна активність зростала на 50 % лише за умов їх перебування протягом 14 діб у ГГС із 90 %

O₂. Отримані результати узгоджуються з вищенаведеними щодо визначення вмісту ГАГ і свідчать про негативний вплив гіпероксії (40 і 90%) на ремоделювання КТ.

Концентрація С-термінального телопептиду колагену I типу (β-CrossLaps) вірогідно збільшилася відносно контрольних значень у молодих тварин після 14 сенсів дихання ГГС із вмістом O₂ 90 %. Через 28

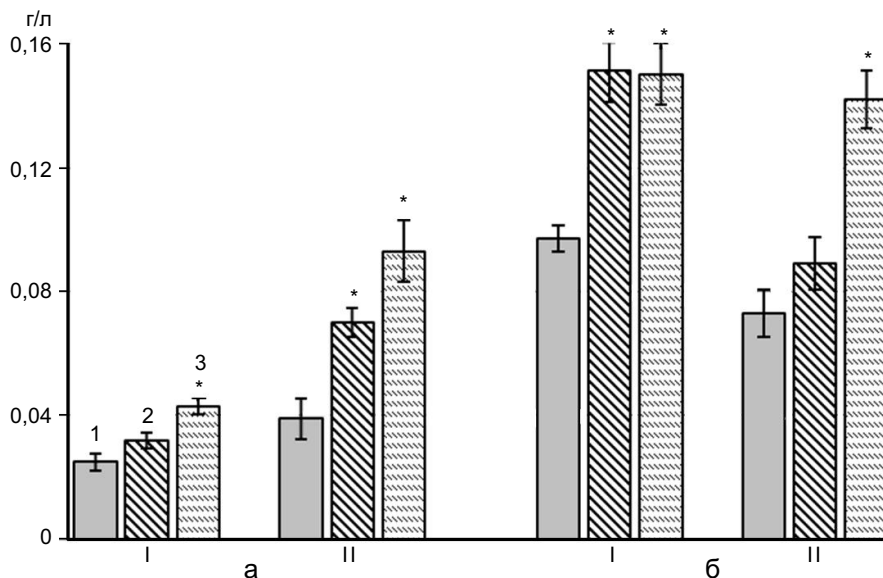


Рис. 3. Зміни концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (1) і дослідних (2 – 40 % O₂, 3 – 90 % O₂) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. *P<0,05 порівняно з контролем

сеансів у них статистично вірогідних відмінностей щодо контролю не спостерігали у зв'язку зі значними розбіжностями показників (рис. 4).

Дорослі тварини дещо по-іншому реагували на нормобаричну гіпероксію. У них через 14 сеансів дихання ГГС із вмістом O_2 40 % концентрація С-термінального телопептиду колагену I типу вірогідно знижувалася (рис. 4).

Таким чином, визначення вмісту β -CrossLaps у сироватці крові молодих щурів показало підвищення темпів деградації колагену після дихання газовою сумішшю із 90 % O_2 протягом 14 сеансів. Перебування дорослих тварин у ГГС із 40 % O_2 не викликало 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 % O_2 , що відповідає 160 мм рт. ст.·год, то за одну годину умовна доза впливу кисню буде 9,6

· 10^3 мм рт. ст.· год. У ГГС (40 % O_2 за годину) вона становить $18 \cdot 10^3$ мм рт. ст.·год і зростає майже вдвічі відносно атмосферного повітря. При подальшому підвищенні кисню у ГГС (90 % O_2) 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 істотних змін у метаболізмі колагену КТ молодих щурів.

Піридинолін також є компонентом колагену I типу. Він відіграє значну роль в його стабілізації і надає своєрідність структурі колагену та еластину. Під час резорбції КТ, що здійснюється остеокластами, та руйнуванні колагену, можливий вихід піридиноліну в судинне русло.

У разі визначення концентрації піридиноліну у сироватці крові молодих тварин, які протягом години дихали газовою сумішшю зі вмістом 40 % O_2 як 14, так і 28 сеансів, ми спостерігали лише тенденцію до його підвищення. При перебуванні цих щурів у газовому середовищі з 90 % O_2 протягом 14 діб вміст піридиноліну віро-

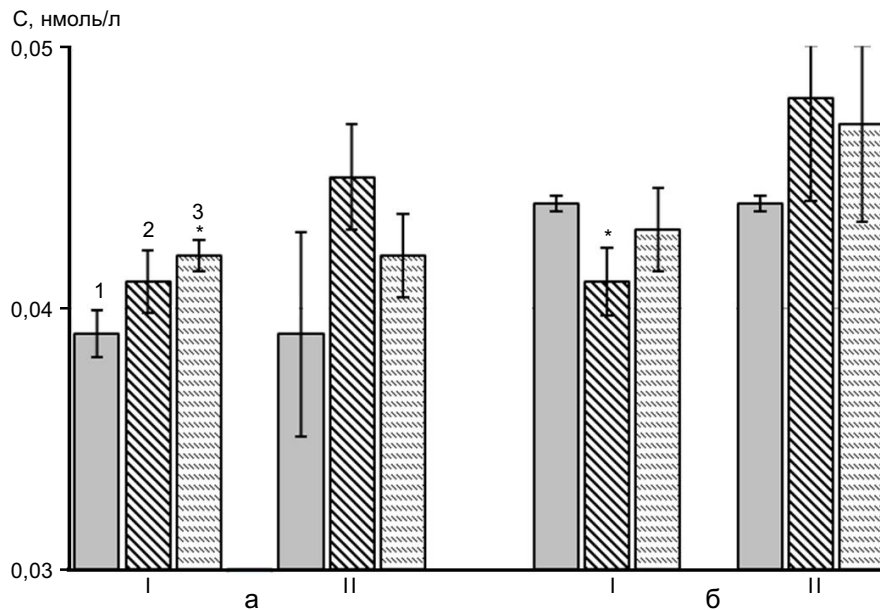


Рис. 4. Зміни концентрації С-термінального телопептиду колагену I типу у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) місячних контрольних (1) та дослідних (2 – 40 % O_2 , 3 – 90 % O_2) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

гідно підвищувався порівняно з контролем на 37 % (рис. 5). Отримані результати односпрямовані з такими щодо визначення вмісту СІСР при цій самій умовній дозі надлишку кисню.

У дорослих тварин за умов дихання ГГС зі вмістом кисню 90 % протягом 14 сеансів концентрація піридиноліну вірогідно знизилася порівняно з контрольними значеннями на 27 % (див. рис. 5), а зі вмістом O_2 40 % протягом 14 і 28 сеансів цей показник не змінювався.

Вірогідне підвищення концентрації піридиноліну у молодих тварин після 14 сеансів дихання газовою сумішшю зі вмістом O_2 90 % свідчить про руйнування колагену і зростання активності остеокластів.

Існують відомості про те, що в експериментах *in vitro* на культурі остеобластів максимальний остеогенез відбувається в газовому середовищі з O_2 35 %, тобто у стані помірної нормобаричної гіпероксії. Концентрація кисню 95 % спричиняє істотне гальмування остеогенезу та значну втрату клітин. Автори дослідження припускають, що такий ефект виникає внаслідок збільшення продукції високотоксичних активних

форм кисню, які викликають оксидативний стрес [13]. Подібні дані отримані й іншими дослідниками: проліферація остеоцитів склепіння черепа ембріонів щурів, інкубованих у середовищі, що містить 90 % кисню, була більш низькою, ніж при 10 % [10]. Хрящотворення, простежене на періостальному експлантаті проксимальної ділянки великої гомілкової кістки 2-місячних кролів у середовищах інкубації з різним вмістом кисню (від 1 до 90 %), виявилось максимальним при 12 – 15 % O_2 [12].

Водночас є відомості про прямо пропорційну залежність між підвищенням парціального тиску кисню і збільшенням активності остеобластів і остеокластів [11, 14]. Відомо, що гіпербарична оксигенація позитивно впливає на репаративний остеогенез внаслідок зниження активності катаболічних і стимулюванні анаболічних процесів, прискорення синтезу органічної складової кісткової тканини та її мінералізації, покращення регіонального кровообігу [4, 7].

На підставі результатів проведених нами експериментів можна зробити висновок, що 40 % O_2 у вдихуваному повітрі по 1 год щодобово не викликає істотних змін

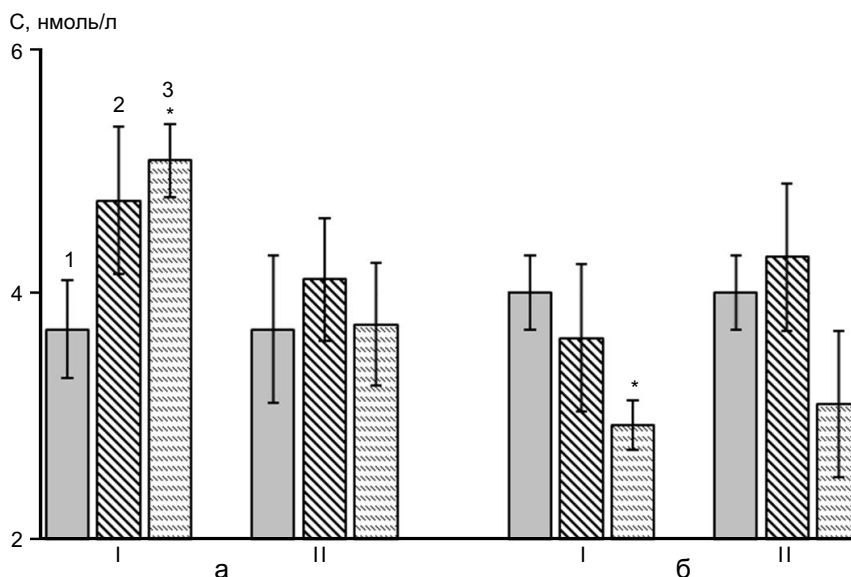


Рис. 5. Зміни концентрації піридиноліну у сироватці крові 3-місячних (а) і 12-місячних (б) контрольних (1) та дослідних (2 – 40 % O_2 , 3 – 90 % O_2) груп щурів: I – 14 діб, II – 28 діб. * $P < 0,05$ порівняно з контролем

досліджених показників синтезу колагену, що відповідає встановленому для клінічної медицини безпечному рівню концентрації кисню у газовому середовищі. Перебування молодих щурів (3 міс) протягом 14 одиноднинних щодобових сеансів в умовах нормобаричної гіпероксії (90 % O₂) супроводжується вірогідним зниженням концентрації СІСР на 36 % та активності КФ на 32 %, зростанням активності ЛФ на 64 % і концентрації піридиноліну на 37 %, β-CrossLaps на 8 % та ГАГ на 72 % у сироватці крові. Отримані значення біохімічних показників ремоделювання у молодих тварин свідчать про істотне розбалансування процесів утворення та руйнування КТ під впливом ГГС. Вважаємо, що 14-добова нормобарична гіпероксія (90 %) порушує синтез колагену.

У дорослих щурів за тих самих умов концентрація ГАГ у сироватці крові вірогідно збільшувалася приблизно на 60 % відносно контрольних значень. Через 28 сеансів дихання ГГС із 90 % O₂ цей показник залишався підвищеним порівняно з контролем на 195 %. Також спостерігали зниження активності КФ і ТРКФ у межах 18–25 % при диханні ГГС як із 40 %, так і 90 % O₂ протягом 14 та 28 діб. Припускаємо, що у дорослих тварин 90%-ва гіпероксія не змінює активність остеобластів, проте порушує зв'язок між ГАГ і фібрилами колагену, знижує активність лізосомальних ферментів, продукованих остеокластами, що може призвести до гальмування остеогенезу.

**І.Г. Литовка В.А. Березовский,
Т.М. Заморская**

НОРМОБАРИЧЕСКАЯ ГИПЕРОКСИЯ ВЛИЯЕТ НА ОСТЕОГЕНЕЗ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Изучено влияние нормобарической гипероксии на метаболизм костной ткани у 3- и 12-месячных крыс-самцов линии Вистар. Пребывание молодых крыс (3 мес) в течение 14 одночасовых ежесуточных сеансов в условиях

нормобарической гипероксии (90 % O₂) сопровождается достоверным снижением концентрации СІСР на 36 %, активности кислой фосфатазы (КФ) на 32 %, повышением активности щелочной фосфатазы на 64 %, увеличении концентрации пиридинолина на 37 % и β-CrossLaps на 8 %, гликозаминогликанов (ГАГ) на 72 % в сыворотке крови. Считаем, что нормобарическая гипероксия (90 %) сопровождается нарушением синтеза коллагена. У взрослых крыс в тех же условиях в течение 14 сеансов концентрация ГАГ достоверно повысилась на 60 % относительно контрольных значений. После 28 сеансов дыхания гипероксической газовой смесью (ГГС) с 90 % O₂ – на 195 %. Активность КФ и тартратрезистентной кислой фосфатазы снижалась в пределах 18–25 % при дыхании ГГС как из 40 %, так и 90 % O₂ в течение 14 и 28 сут. Полагаем, что у взрослых животных 90%-я гипероксия не влияет на активность остеобластов, но нарушает взаимосвязь ГАГ и фибрилла коллагена, снижает активность лизосомальных ферментов, продуцированных остеокластами, что способно затормозить остеогенез.

Ключевые слова: нормобарическая оксигенация, костная ткань.

I.G. Litovka, V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska

NORMOBARIC HYPEROXIA AFFECTS OSTEOGENESIS IN LABORATORY ANIMALS

We studied the influence of normobaric hyperoxia on bone metabolism in 3 - and 12-month-old male Wistar rats. Maintaining young rats (3 months) during the 14-hour daily sessions under normobaric hyperoxia (90% O₂) was accompanied by a significant decrease in the concentration of C-terminal propeptides of collagen type I (by 36%), the acid phosphatase activity (by 32%), an increased activity of alkaline phosphatase (by 64%), an increased concentration of pyridinoline (by 37%) and β-CrossLaps (by 8%), glycosaminoglycans (by 72%) in the blood serum. We believe that normobaric hyperoxia (90%) is accompanied by the disturbance of collagen synthesis. In adult rats under the same conditions for 14 sessions, the concentration of glycosaminoglycans significantly increased by 60% relative to the control values. After 28 sessions of breathing the normobaric gas mixture containing 90% O₂ this parameter increased by 195%. Breathing normobaric gas mixture containing both 40% and 90% of O₂ for 14 and 28 days decreased the acid phosphatase activity and the tartrat-resistant acid phosphatase activity by 18-25%. We believe that in adult animals 90% hyperoxia does not affect the activity of osteoblasts, but breaks the link between glycosaminoglycans and collagen fibrils, decreases the activity of lysosomal enzymes which are produced by osteoclasts and which can inhibit osteogenesis.

Key words: normobaric oxygenation, bone tissue.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Иоффе И.Д. Адаптационные механизмы костной ткани и регуляторно-метаболический профиль организма // Морфология. – 2001. – №6. – С. 7–12.
2. Астахова В.С. Остеогенные клетки-предшественники костного мозга человека. – К.: Феникс, 2000. – 176 с.
3. Березовський В.Я., Літовка І.Г., Костюченко О.С. Фізіологічна регенерація кісткової тканини за умов дозованої нормобаричної гіпоксії // Фізіол. журн. – 2007. – **53**, №6. – С. 40–45.
4. Вохмякова Т.В., Кулешов В.М., Овденко А.Г., Тихилов Р.М. ГБО в комплексном лечении больных с повреждениями опорно-двигательного аппарата // Гипербар. физиология и медицина. – 2002. – №1. – С. 27–31.
5. Гершенович З.С. Молекулярные механизмы действия повышенного давления кислорода. – В кн.: Влияние повышенного давления кислорода на организм. – Ростов н/Д: Изд-во Ростов. ун-та, 1969. – С. 16–18.
6. Кляцкин С.А., Лифшиц Р.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом в крови больных // Лаб. дело. – 1989. – № 10. – С. 51–53.
7. Котельников Г.П., Арбагов С.В., Панкратов А.С. Новый подход к лечению нейродистрофического синдрома при травмах нижних конечностей // Гипербар. физиология и медицина. – 2002. – №1. – С. 10–16.
8. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – ДП «Інформаційно-аналітичне агентство», 2011. – 244 с.
9. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В., Сосулина Л.Л. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях // Клин. лаб. диагностика. – 1996. – №3. – С. 21–22.
10. Dodd J.S., Raleigh J.A., Gross T.S. Osteocyte hypoxia: a novel mechanotransduction pathway // Amer. J. Physiol. – 1999. – **277**, № 3 (pt. 1). – P. 958–602.
11. Gokce S., Bengi A.O., Akin E., Karacay S. Effects of hyperbaric oxygen during experimental tooth movement // Angle Orthodontist. – 2008. – **78**, №2. – P. 304–308.
12. O'Driscoll S.W., Fitzsimmons J.S., Commisso C.N. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum // J. Orthopaedic. Res. – 1997. – **15**, №2. – P. 682–687.
13. Tuncay O.C. Ho D, Barker M.K. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Amer. J. Orthod. Dentofacial. Orthop. – 1994. – **105**, №5. – P. 457–463.
14. Shaw J. L., Bassett C.A. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro // J. Bone and Joint Surgery. – 1967. – 49-A, №1. – P. 73–80.

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

Матеріал надійшов до редакції 29.07.2011