УДК 612.27:612.75

В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, Р.В. Янко

Вплив зміненого парціального тиску кисню на остеометричні показники кісткової тканини щурів

Досліджували вплив зміненого парціального тиску кисню на остеометричні та біохімічні показники кісткової тканини. Встановлено, що перебування 12-місячних щурів в умовах зміненого газового середовища вірогідно не впливає на масу, загальну довжину, сагітальний діаметр і щільність стегнових кісток. Спостерігали підвищення активності лужної та зниження тартратрезистентної кислої фосфатази після дії дозованої нормобаричної гіпоксії саногенного рівня. Вплив нормобаричної гіпероксії (40 і 90 % O_2), навпаки, пригнічував активність лужної і стимулював активність тартратрезистентної кислої фосфатази.

Ключові слова: парціальний тиск кисню, регенерація кісткової тканини.

ВСТУП

Кісткова тканина хребетних – один із різновидів сполучної тканини, яка має поліфункціональне призначення. В онтогенезі кожного виду ссавців відбувається генетично зумовлений процес закладання хрящового скелета, поступове насичення його мінеральними компонентами та формування дефінітивної тканини. Остання складається із клітинних елементів (остеобласти, остеокласти) і міжклітинної субстанції (колаген та аморфна речовина). Найбільш специфічний фермент остеобластів – лужна фосфатаза (ЛФ). Саме вона визначає кісткоутворювальну роль цих клітин у мінералізації кісткового матриксу. Остеокласти – це багатоядерні клітини значних розмірів, які резорбують кістку за допомогою лізосомальних ферментів (кисла і тартратрезистентна кисла фосфатази (ТРКФ)), розчиняючи солі й руйнуючи матрикс [6, 11, 13].

В умовах сучасного дефіциту навантаження починається повільна деградація кісткової тканини, яка депонує 99 % всього запасу кальцію в організмі людини. Кінцевим проявом цього процесу стають донозологічні форми зменшення кісткової маси (остеодефіцитні стани) [5, 10, 12]. Втрата її частини зумовлює послаблення біомеханічних властивостей, зниження міцності та підвищення загрози переломів кісток. Варто зауважити, що ці зміни знаходяться в межах індивідуальних фізіологічних варіацій і майже не діагностуються. Тому надзвичайно актуальним є пошук шляхів і методів корекції процесів остеогенезу та ремоделювання кісткової тканини. Важливим і перспективним шляхом профілактики патології скелета може бути вплив керованого газового середовища.

З літературних джерел відомо, що парціальний тиск кисню (Po_2) є одним із суттєвих факторів, що впливає на функціональний стан як організму в цілому, так і будь-яких його систем, тканин і клітин, у тому числі й кісткових [3, 6, 7, 15, 16, 17, 19]. Помірно знижений Po_2, як неспецифічний стимулятор метаболізму кісткової тканини, сприяє відновленню взаємодії органічного і неорганічного матриксу, нормалізації щільності кістки. При цьому опосередковано через активацію індукованого гіпоксією фактора 1 та через дію паратиреоїдного гормону стимулює діяльність остеобластів [18]. Однак за іншими даними в експериментах in vitro в

© В.Я. Березовський, Т.М. Заморська, Р.В. Янко

культурі остеобластів максимальний остеогенез спостерігали у газовому середовищі із 35 % O_2, тобто в стані помірної нормобаричної гіпероксії [16]. Отримані літературні дані про вплив зміненого Po_2 на процеси фізіологічної регенерації скелета не тільки нечисленні, але й часто суперечливі і залежать від умов проведення експериментів. Тому метою нашої роботи було дослідити вплив зміненого Po_2 на остеометричні показники кісткової тканини.

МЕТОДИКА

Дослідження виконано протягом 28 діб на 35 щурах-самцях лінії Вістар віком 12 міс. Газову суміш (ГС) подавали у герметичну камеру в таких режимах: I – контроль (атмосферне повітря – 21 % O_2); II – ГС із 10 % O_2 безперервно протягом 30 хв; III – ГС із 10 % O_2 переривчасто 10/30 (10 хв деоксигенації з наступним періодом реоксигенації 30 хв протягом 3 циклів); IV і V – ГС із 40 або 90 % O_2 відповідно протягом години. Щури контрольної і експериментальних груп мали вільний доступ до води та корму ad libitum [4]. Тварин виводили з експерименту під ефірним наркозом. Усі досліди здійснювали з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей.

Матеріалом для досліджень були стегнові кістки щурів і сироватка крові, які одержували від декапітованих під рауш-наркозом тварин. Остеометричні показники визначали таким чином: стегнові кістки зважували у дистильованій воді та у повітрі на торсіонних вагах з межею визначення 500 мг і точністю до 1 мг. Об'єм зразків розраховували за формулою: $V = (M_{у\ повітрі} – M_{у\ воді})/d$,
де d – густина води, що дорівнює 0,996 при 20°С, М – маса зразка. Розраховували щільність кісток за формулою P=M/V, де M – маса зразка, V – об'єм. Вимірювали загальну довжину стегнової кістки (відстань від голівки кістки до площини, що проходить через найнижчі точки латерального та медіального мищелків) і сагітальний діаметр середини діафіза стегнової кістки [2].

Біохімічні показники фізіологічної регенерації кісткової тканини досліджували спектрофотометричним методом. У сироватці крові визначали активність ЛФ (фірма "Лахема", Чехія), ТРКФ (фірма "Лахема", Чехія) за стандартними наборами реактивів.

Отримані результати обробляли статистично з використанням критерію t Стьюдента. Для визначення корелятивних зв'язків між окремими показниками використовували коефіцієнт r і методи кореляційно-регресійного аналізу [9]. Інтегральний індекс фосфатаз (ІФ) розраховували за формулою: ІФ=ЛФ/ТРКФ. Статистичну обробку здійснювали за допомогою програмного забезпечення "Origin 7,5".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маса стегнових кісток контрольних щурів становила 614,7 мг ± 69,6 мг. Відносний приріст виявлено тільки у тварин II групи на 8 % порівняно з контролем після впливу ГС із 10 % O_2 (таблиця). У тварин III–V груп цей показник лише мав тенденцію до зниження. Загальна довжина та сагітальний діаметр стегнових кісток у контрольних щурів дорівнювали 39,2±1,7 і 3,8 мм ± 0,6 мм відповідно. Ці показники не змінювалися у всіх інших експериментальних тварин. Вірогідне зростання щільності стегнових кісток на 5 % ($P<0,05$) спостерігали лише після впливу нормобаричної гіпоксії (10 % O_2) в переривчастому режимі порівняно з контролем. Таким чином, змінене газове середовище не впливає на ріст стегнових кісток 12-місячних щурів.

Відомо, що кістки ростуть нерівномірно протягом онтогенезу. У молодих тварин закономірно відбувається активна мінералізація кісткової тканини, комбінування росту кісток у довжину і ширину, характерне для цього вікового періоду, формування кісткової маси. Водночас у дорослих тварин темпи приросту маси тіла та формування й руйнування кі-

Остеометричні показники стегнових кісток контрольних і дослідних 12-місячних щурів (M±m, n=7)

Група тварин	Маса, мг	Загальна довжина, мм	Сагітальний діаметр, мм	Щільність, мг/мм^3
Контроль	614,7±69,6	39,2±1,7	3,8±0,6	1,5±0,1
Гіпоксія				
I режим	661,6±99,5	40,1±1,7	3,7±0,5	1,5±0,1
II режим	595,4±90,8	39,5±1,3	3,6±0,5	1,6±0,1*
Гіпероксія				
40 % O_2	592,9±63,2	40,7±1,2	3, 8±0,2	1,4±0,1
90 % O_2	584,0±79,3	40,0±1,2	3,7±0,2	1,5±0,1

* P<0,05 – порівняно з контролем.

сткової тканини зазвичай врівноважені [4]. Багатоклітинні агрегати, які складаються з остеокластів і остеобластів, діють скоординовано, формуючи нові структурні елементи трабекулярної або кортикальної кістки. Резорбція і формування при ремоделюванні йдуть паралельно і як наслідок відбувається заміна невеликих об'ємів старої кістки на нову. Структура останньої визначається умовами, в яких відбувається цей процес [11, 13, 14].

Дослідження активності ЛФ і ТРКФ для функціонального стану кісткової тканини інформативне, оскільки ці ферменти продукуються остеобластами (ЛФ) і остеокластами (ТРКФ). Активність ЛФ у сироватці крові контрольних щурів становила 38,2 МО/л ± 3,6 МО/л. Зниження Po_2 у вдихуваному повітрі вірогідно збільшувало активність цього ферменту. Так, після впливу 30-хвилинних безперервних щодобових сеансів ГС вона була вищою на 7 %, а після подачі ГС у переривчастому режимі 10/30 хв на 65 % (P<0,05) порівняно з контрольними значеннями (рис. 1).

Кореляційний аналіз виявив сильний негативний зв'язок між активністю ЛФ і щільністю стегнових кісток (r= -0,74; рис. 2) після впливу ГС із 10 % O_2 30 хв безперервно.

Дихання гіпероксичною ГС з O_2 40 % призводило до зниження активності ЛФ на 43 % (P<0,05), а при O_2 90 % спостерігали лише тенденцію до зниження цього показника на 11% порівняно з контролем. Також нами був зафіксований сильний негативний зв'язок між активністю ЛФ і масою стегнових кісток (r= -0,82; рис. 3) після впливу ГС із 40 % O_2.

За даними Поворознюка та співавт. [8] синтез ЛФ підвищується під час процесу диференціювання остеобластів і прискореного кісткоутворення. Використовуючи дані спеціальної літератури припускаємо, що наслідком зафіксованого нами зростання активності ЛФ, ймовірно, може бути більш високий синтез колагену, що є додатковою умовою активного процесу формування кістки на клітинному рівні.

Зниження активності ЛФ у сироватці крові при диханні гіпероксичною ГС за нашими результатами, мабуть, свідчить про пригнічення процесу регенерації кісткової тканини, викликане підвищенням Po_2 у вдихуваній ГС. Поки достеменно не відомо, як ЛФ включається в мінералізацію кісткового матриксу. Lawrence [14] припускає, що дія цього ферменту може здійснюватися через

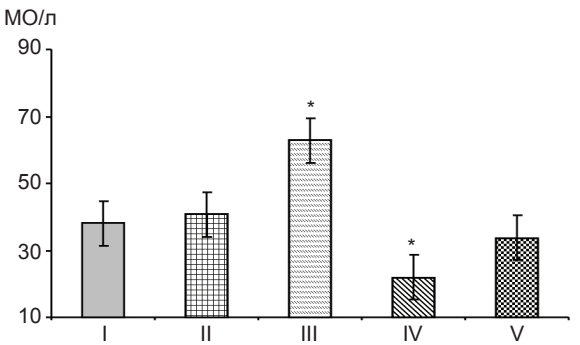

Рис. 1. Активність лужної фосфатази у сироватці крові контрольної (I) і дослідних груп щурів, які дихали газовою сумішшю (ГС): II – ГС із 10 % O_2 30 хв безперервно, III – ГС із 10 % O_2 переривчасто 10/30 хв, IV – ГС із 40 % O_2, V – ГС із 90 % O_2.*P<0,05 порівняно з контролем

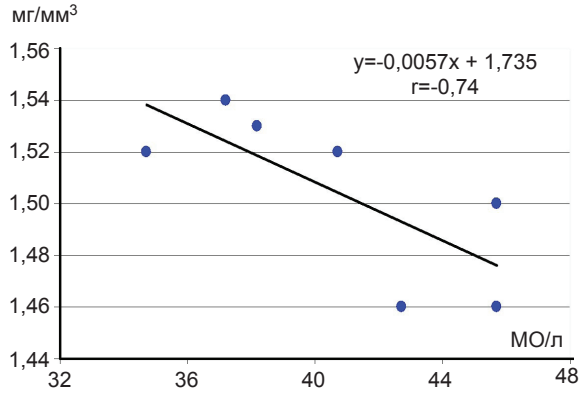

Рис. 2. Кореляційний зв'язок між активністю лужної фосфатази і щільністю стегнових кісток 12-місячних щурів

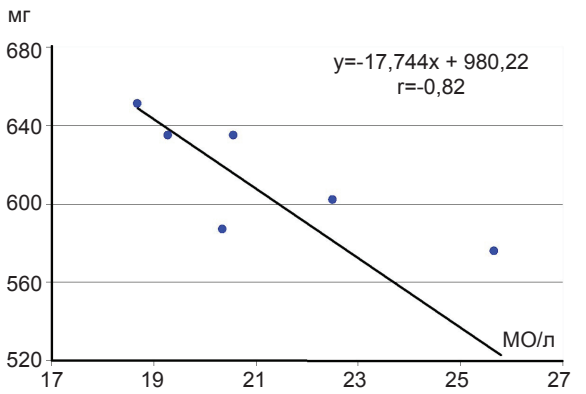

Рис. 3. Кореляційний зв'язок між активністю лужної фосфатази і масою стегнових кісток 12-місячних щурів

підвищення місцевої концентрації іонів фосфору, відщеплення фосфатних груп від інших протеїнів, руйнуванням таких інгібіторів мінералізації, як пірофосфат.

ТРКФ утворюється в органелах остеокластів, транспортується у міжклітинне середовище і забезпечує резорбцію кістки. Активність ТРКФ у щурів контрольної групи становила 12,4 МО/л ± 1,1 МО/л. Спостерігали вірогідне зниження активності ферменту після впливу нормобаричної гіпоксії в обох досліджуваних режимах на 44 і 26 % відповідно (рис. 4). Зростання Po_2 у вдихуваному повітрі, навпаки, збільшувало активність ТРКФ; після впливу ГС із 40 % O_2 на 107 % ($P<0,05$), а ГС із 90 % O_2 на 147 % ($P<0,05$) порівняно з вихідними значеннями. Аврунін [1] вважає, що у фізіологічних умовах кількість ферментів регулюється тільки в межах необхідної резорбтивної діяльності клітин. Якщо активність лізосомальних ферментів збільшується, то у кістковій тканині виникають дефекти структури, спричинені неконтрольованою дією гідролаз. Тобто вплив нормобаричної гіпероксії (40 та 90 % O_2) призводить до інтенсифікації процесів резорбції кісткової тканини.

На підставі отриманих результатів був розрахований ІФ. Так, у контрольних груп він становив 3,08, після впливу 30 хв щодобових сеансів ГС із 10 % O_2 підвищився до 5,90 порівняно з контролем. У щурів, що дихали ГС із 10 % O_2 в режимі 10/30 хв, він зріс до 6,85. Підвищення ІФ розцінюємо як показник процесу активного ремоделювання і мінералізації кісткової тканини в умовах помірно зниженого Po_2. Дихання гіпероксичною ГС знижувало ІФ до 0,85 і 1,10 відповідно після впливу ГС із 40 або 90 % O_2, що вказує на розбалансування процесів формування і резорбції кістки в умовах надлишку кисню.

Таким чином, змінений Po_2 впливає на біоенергетичні процеси, які відображають повноцінність органічного матриксу і його мінералізацію під час ремоделювання кісткової тканини. Отримані результати свідчать, що помірно знижений Po_2 створює умови для підвищення проліферації остеобластів, по-

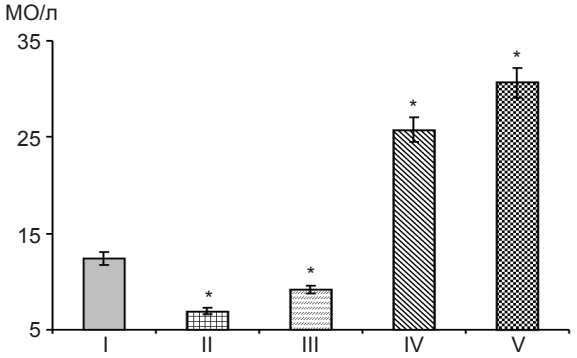

Рис. 4. Активність тартратрезистентної кислої фосфатази у сироватці крові контрольної (I) і дослідних груп щурів, які дихали газовою сумішшю (ГС): II – ГС із 10 % O_2 30 хв безперервно, III – ГС із 10 % O_2 переривчасто 10/30 хв, IV – ГС із 40 % O_2, V – ГС із 90 % O_2 груп щурів. *$P<0,05$ порівняно з контролем

силення формування зрілих полінуклеарних остеокластів і прискорення темпів фізіологічного ремоделювання кісткової тканини. Тоді як підвищений Po_2 порушує нормальний перебіг остеогенезу з активацією темпів резорбції кісти, про що свідчить підвищення активності ТРКФ у сироватці крові.

В.А. Березовский, Т.М. Заморская, Р.В. Янко

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕННОГО ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ КИСЛОРОДА НА ОСТЕОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС

Исследовали влияние измененного парциального давления кислорода на остеометрические и биохимические показатели костной ткани. Установлено, что пребывание 12-месячных крыс в условиях измененной газовой среды достоверно не влияет на массу, общую длину, сагиттальный диаметр и плотность бедренных костей. Наблюдали повышение активности щелочной фосфатазы и снижение активности тартратрезистентной кислой фосфатазы после воздействия дозированной нормобарической гипоксии саногенного уровня. Влияние нормобарической гипероксии (40 и 90 % O_2), наоборот, угнетает активность щелочной и стимулирует активность тартратрезистентной кислой фосфатазы.
Ключевые слова: парциальное давление кислорода, регенерация костной ткани.

V.A. Berezovskiy, T.M. Zamorska, R.V. Yanko

THE EFFECTS OF OXYGEN PARTIAL PRESSURE CHANGES ON THE OSTEOMETRIC MARKERS OF BONE TISSUE IN RATS

Our purpose was to investigate the oxygen partial pressure changes on the osteometric and biochemical markers of bone tissue in rats. It was shown that breathing of altered gas mixture did not change the mass, general length, sagittal diameter and density thigh-bones in 12-month Wistar male-rats. The dosed normobaric hypoxia increased the activity of alkaline phosphatase and decreased the activity of tartrate-resistant acid phosphatase. At the same time normobaric hyperoxia with 40 and 90 % oxygen conversely decreased the activity of alkaline phosphatase and increased the activity of tartrate-resistant acid phosphatase.
Key words: oxygen partial pressure, bone regeneration.

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

Ін-т фізіології ім.О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: tanya_ztm@ukr.net

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В., Емельянов В.Г. Формирование остеопоротических сдвигов в структуре костной ткани. – СПб: Ольга, 1998. – 68 с.
2. Алексеев В.П. Остеометрия. – М.: Наука, 1966. – С.148–152.
3. Жиронкин А.Г. Кислород. Физиологическое и токсическое действие. – Л.: Медицина, 1972. – 186 с.
4. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
5. Зацепин С.Т. Костная патология у взрослых // Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2001. – 640 с.
6. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. – К.: ДП "Інформ.-аналіт. агентство", 2011. – 243 с.
7. Петровский Б.В., Ефуни С.Н. Основы гипербарической оксигенации. – М.: Медицина, 1995. – 346 с.
8. Поворознюк В.В., Малишкіна С.В., Горідова Л.Д., Сторожук. Л.М. Біохімічні маркери метаболізму кісткової тканини // Проблеми остеологія. – 1999. – **2**, №4. – С. 4–14.
9. Радченко С.Г. Устойчивые методы оценивания статистических моделей: Монография. – К.: ПП "Санспарель", 2005. – 504 с.
10. Романюк А.М., Гортинська О.М., Будко Г.Ю. Реакція кісткової тканини на негативні впливи фізичних та хімічних факторів зовнішнього середовища // Вісн. Сум. держ. ун-ту. Серія: Медицина. – 2002. – **14**, №11 – С. 5–11.
11. Франке Ю., Рунге Г. Остеопороз / Пер. с нем. – М.: Медицина, 1995. – 304 с.
12. Шуба Н.М. Остеопороз – актуальная проблема XXI века: современное представление о патогенезе и терапии // Укр. ревматол. журн. – 2008. – **2**, №3. – С. 5–14.
13. Dempster D.W. Ремоделирование кости. – *В кн.:* Остеопороз / Пер. с англ. – СПб: Бином, Невский диалект, 2000. – С.85–108.
14. Lawrence G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling // Clin. Chem. – 1999. – **45**, № 8 (B). – P.1353–1358.
15. O`Driscoll S.W., Fitzsimmons J.S, Commisso C.N. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum // J. Orthop. Res. – 1997. – **15**, №2. – P.682–687.
16. Tuncay O., Ho D., Barker M. Oxygen tension regulates osteoblasts function // Am. J. Orthd. Dentofacial Ortrhop. – 1994. – **105**, №5. – P.457–463.
17. Wang Y., Wan C., Deng L., Liu X., Cao X., Gilbert S.R., Bouxsein M.L., Faugere M.C., Guldberg R.E., Gerstenfeld L.C., Haase V.H., Johnson R.S., Schipani E., Clemens T.L. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development // Clin. Invest. – 2007. – **117**, № 6. – P.1616–1626.
18. Wang Y., Wan C., Gibbert S.R., Clemens T.L. Oxygen sensing and osteogenesis // Ann NY Acad. Sci. – 2007. – **111**, № 7. – P.1–11.
19. West J. Respiratory Physiology – The Essentials. – Baltimore: London: Los Angeles: Williams and Wilking, 1982. – 196 p.

Матеріал надійшов до редакції 14.12.2012