

І.Г. Літовка, О.П. Березовська

Киснева депривація як ініціатор остеогенезу при гіпокінезії

Изучено влияние гипокинезии на развитие дистрофических изменений в бедренных костях крыс. Исследована возможность торможения деструктивных процессов в костной ткани с помощью прерывистой нормобарической гипоксии. Показано, что подача газовой смеси азота и кислорода ($PO_2 = 100 - 110$ мм рт. ст.) нормализует большинство биохимических маркеров остеогенеза, существенно уменьшает потерю вторичной спонгиозы за счет снижения интенсивности остеокластической резорбции, нормализует состояние периферических слоев компактной кости как со стороны периоста, так и костномозговой полости. Пониженная по сравнению с контролем активность остеобластов в области метафиза и меньшая протяженность ростовой пластинки свидетельствуют о неполной компенсации потери двигательной активности при использованном режиме искусственной гипоксии.

ВСТУП

Сучасний спосіб життя істотно обмежив рухову активність та фізичне навантаження на людину. Це призвело до розвитку низки загальних захворювань організму, збільшення патології опорно-рухового апарату.

Відомо, що механічні навантаження істотно впливають на формування скелета та просторової структури кісток [6,13]. У дорослої людини або тварини за звичайних умов земної гравітації маса скелетної тканини відносно постійна і зберігається доти, доки існує баланс між фізіологічними процесами формування і резорбції кістки. У разі тривалого зниження гравітаційного навантаження та відсутності механічної стимуляції остеогенезу порушується рівновага між цими процесами, зменшується кісткова маса. Особливо інтенсивно цей процес відбувається коли гравітаційна стимуляція скелета у космічному польоті суттєво зменшена. Медико-біологічними дослідженнями стану скелета космонавтів було показано, що на-

віть короткочасне перебування за умов мікрогравітації призводить до розвитку остеопенії [8,15,16] й істотних змін у біохімічних і механічних показниках стану кісткової тканини [18,20].

Негативні зміни в трабекулярному відділі кісток було описано у щурів за умов штучного обмеження рухової активності [4,9]. Експериментальна гіпокінезія тривалий час використовувалася дослідниками як модель для дослідження механізмів кісткової атрофії в невагомості. Викликають інтерес дані про зміни стану кістки при експериментальній гіпокінезії, оскільки вони ілюструють роль динамічних навантажень у формуванні структури кістки.

Проблема усунення або компенсації негативних наслідків вимушеної гіпокінезії не вирішена, тому одним із важливих завдань земної та космічної медицини є пошук засобів збереження механічних властивостей скелета за умов гіпокінезії та мікрогравітації. В дослідях на щурах з безопорним положенням задніх кінцівок

було показано, що штучна газова суміш (ШГС) зі зниженим парціальним тиском кисню (P_{O_2}) гальмує розвиток остеопенії та позитивно впливає на біохімічні властивості стегнових кісток – нормалізує концентрацію глікозаміногліканів (ГАГ), вільного оксипроліну в сироватці крові, зменшує екскрецію оксипроліну, кальцію та фосфору з сечею. Гальмує погіршення біомеханічних властивостей стегнової кістки: несучої спроможності, модуля пружності, межі міцності, енергії пружного деформування [2,3].

Метою нашої роботи був аналіз впливу гіпокінезії на біохімічні та морфологічні показники стану кісткової тканини, а також вивчення стимулювальної ролі дозованої гіпоксії при дефіциті механічних навантажень.

МЕТОДИКА

У дослідах використано самців інбредних щурів лінії Вістар віком 3 міс. Для створення гіпокінезії тварин утримували в індивідуальних пластикових комірках малого розміру з контрольованою подачею корму та води. Конструкція комірок передбачала також можливість заміни в них атмосферного повітря газовою сумішшю (ГС) зі зниженим парціальним тиском кисню. Тварин розподілили на три групи по 8 у кожній: I група – тварини, яких утримували за умов віварію (віварний контроль), II – щури, які знаходилися за умов гіпокінезії в атмосферному повітрі, III – за умов гіпокінезії при періодичній подачі протягом 20 хв гіпоксичної ГС ($P_{O_2}=100-110$ мм рт.ст.) з наступним 20-хвилинним періодом дихання атмосферним повітрям. Подачу ГС здійснювали по 8 год щодобово. Загальна тривалість експерименту – 28 діб.

Для дослідження процесів ремоделювання кісткової тканини визначали активність остеобластів, які формують нову

тканину, та остеокластів, які здійснюють її резорбцію. Для цього в сироватці крові та кістковій тканині визначали активність лужної фосфатази (ЛФ, КФ 3.1.3.1.), загальну каталітичну активність кислої фосфатази (КФ, КФ 3.1.3.2) і тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ) за допомогою стандартних наборів “Лахема” (Чеська Республіка). Основні біохімічні механізми обміну колагену та протеогліканів у кістковій тканині аналізували визначаючи такі показники: концентрацію глікозаміногліканів (ГАГ) за методом Кляцкіна [5], креатиніну в крові та сечі за допомогою стандартних наборів “Лахема” (Чеська Республіка), глюконових кислот у кістковій тканині за методом Bitter, Menig (1962) у модифікації Леонтєва та співавт. [7]. Вміст паратиреоїдного гормону (ПТГ) визначали за допомогою стандартного набору реактивів “ELISA” (США) на імуоферментному аналізаторі “Multiscan EX” (“Labsystems”, Фінляндія).

Для гістологічного дослідження стегнової кістки ізолювали з організму, очищали від м'яких тканин і фіксували нейтральним 4%-м формаліном на фосфатному буфері. Виготовлення гістологічних препаратів проводили за стандартними методиками з попередньою декальцинацією кісток у 10%-му розчині ЕДТА протягом 28 діб. Зразки заливали в парафін, одержували поздовжні зрізи товщиною 5–10 мкм і фарбували гематоксиліном і еозинном.

На гістологічних зрізах вимірювали висоту ростової пластинки та кількість хондроцитів у колонці; оцінювали об'ємну щільність трабекулярної кістки в первинній і вторинній спонгіозі – показник, що відображає просторову організацію її структури; вимірювали товщину компактної кістки в середині діафіза.

Кістки для дослідження в скануючому мікроскопі та проведення зондового

мікроаналізу були поміщені в рідкий азот, розколоти поздовжньо в ділянці fossa intercondylaris, відмиті від клітин крові та кісткового мозку, висушені та напилені золотом у вакуумному напилувачі JFC-1100. Для проведення зондового рентгенівського мікроаналізу стегнові кістки заливали в епоксидну смолу й одержували поздовжні шліфи діафіза. Розподіл кальцію по товщині кістки досліджували в скануючому електронному мікроскопі з рентгенівським мікроаналізатором JEOL Superprobe 733 при напрузі прискорення 25 кВ і збільшенні $\times 2000$. Аналіз проводили по лінії Ca – K_α.

Розміри зони кальцифікованого хряща, товщину трабекул вторинної спонгіози аналізували в ділянці дистального метафіза.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Біохімічні показники ремоделювання кісткової тканини у щурів із обмеженою рухливістю, які дихали атмосферним повітрям, та щурів, які дихали ГС зі зниженим PO_2 , дещо змінювалися. Активність ЛФ у сироватці крові щурів із обмеженою рухливістю в атмосферному повітрі мала тенденцію до підвищення. А активність КФ і ТРКФ вірогідно збільшилася у 1,2 та 4,4 раза порівняно з контролем (рис.1). Концентрація креатиніну та ГАГ не змінювалася. Водночас концентрація ПТГ (рис.2) підвищилася у 2,4 раза ($P < 0,05$).

У тварин, які знаходилися в стані гіпокінезії та дихали дозованою ГС зі зниженим PO_2 активність ЛФ наближалася до контрольних значень. Виключення становили лише концентрація ПТГ, яка вірогідно підвищилася у 3,2 раза, а креатиніну – у 1,2 раза (див.рис. 2). Активність ЛФ у кістковій тканині щурів обох досліджуваних груп мала тенденцію до зниження порівняно з контролем. Таку саму тенденцію зафіксували щодо активності КФ

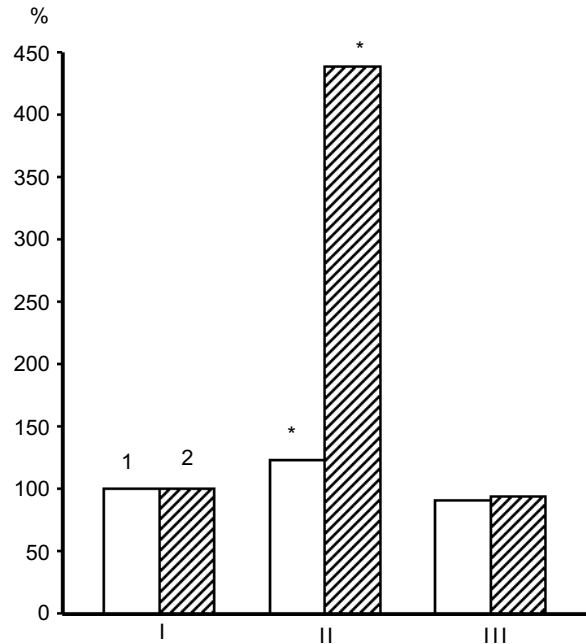


Рис.1. Зміна концентрації кислій фосфатази (1) та тартратрезистентної кислій фосфатази (2) у сироватці крові щурів з обмеженою рухливістю, які дихали атмосферним повітрям (II) або газовою сумішшю зі зниженим PO_2 (III) порівняно з контролем (I).

у тварин, які в стані гіпокінезії дихали атмосферним повітрям.

Концентрація глюкуронових кислот у кістковій тканині ні в II, ні в III групах не змінювалася. Виведення з сечею креатиніну дещо зменшувалося у щурів обох досліджуваних груп. Водночас концентрація ГАГ у сечі підвищувалася у тварин, які в стані гіпокінезії дихали атмосферним повітрям. На відміну від цього, у тварин, які в стані гіпокінезії дихали ГС зі зниженим PO_2 , концентрація ГАГ в сечі повернулася до вихідних значень, що свідчить про нормалізуючу роль зниження PO_2 в навколишньому середовищі.

Дослідження зразків кісток у скануючому електронному мікроскопі показало, що просторова структура трабекулярної кістки в метафізах стегнових кісток щурів, що знаходилися за умов обмеження рухливості, значно змінена порівняно з контролем (рис.3 а, б). Трабекули пер-

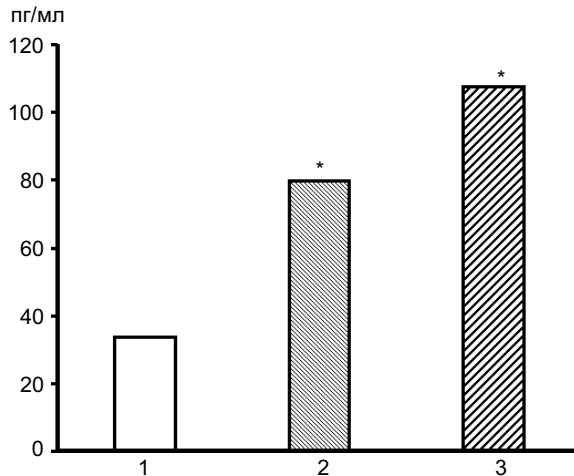


Рис. 2. Концентрація паратиреоїдного гормону в сироватці крові щурів з обмеженням рухливості, які дихали атмосферним повітрям (2) або газовою сумішшю зі зниженим P_{O_2} (3) порівняно з контролем (1).

винної спонгіози як залишки кальцифікованого хряща, покритого шаром кістки, в нормі характеризуються невеликими поперечними розмірами (близько 33 мкм), у цих щурів потовщені. Об'єм вторинної спонгіози з боку кісткової мозкової порожнини значно редукований. Трабекули, які залишилися, не мають звичайної для цієї ділянки поздовжньої орієнтації, їхня товщина майже на 25 % зменшена порівняно з контролем.

У щурів, які перебували за умов гіпокінезії з дозованою подачею ГС зі зниженим P_{O_2} , об'єм трабекулярної кістки знижений порівняно з контролем, але меншою мірою, просторова структура трабекулярної кістки також змінена менше (рис. 3 а, в). Трабекули в первинній спонгіозі вужчі, ніж у щурів з гіпокінезією за умов атмосферного повітря. Простір, який займала вторинна спонгіоза, приблизно такий як у контролі, проте питома щільність трабекул знижена внаслідок меншої їх товщини (68,0 порівняно з 86,3 мкм у контролі, різниця вірогідна за критерієм t Стьюдента, $P < 0,05$) та більшої відстані між ними. Поздовжня орієнтація трабекул по всій довгій осі кістки збережена.

Відмінність у структурі кальцифікованого хряща та трабекулярної кістки дистальних метафізів стегнових кісток у всіх дослідних тварин показано на рис.4.

Висота ростової пластинки, яка оцінена за кількістю хондроцитів, у щурів, що знаходилися за умов гіпокінезії при зниженому парціальному тиску кисню, приблизно на 20 % менше порівняно з тим, що спостерігається у щурів з обмеженою рухливістю при звичайному складі повітря та щурів, які знаходилися за умов ві-

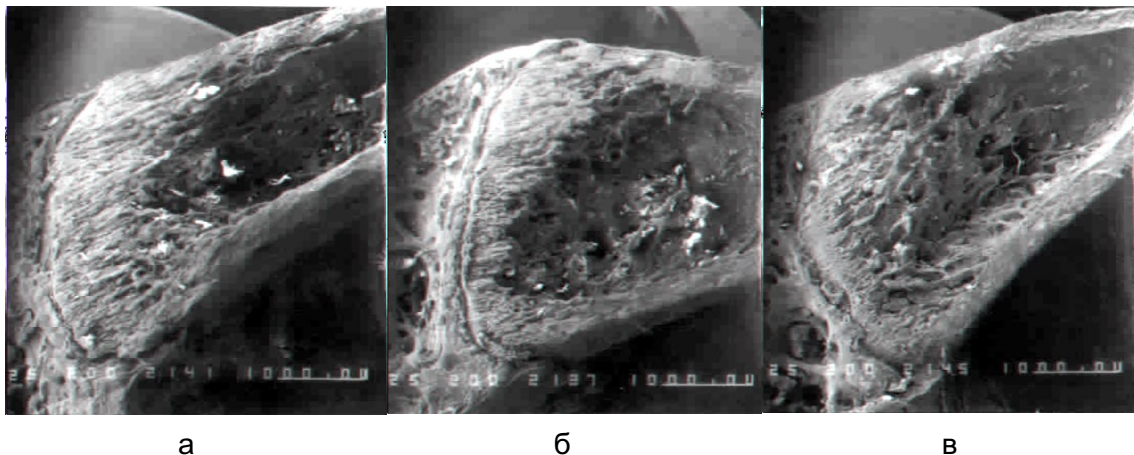


Рис. 3. Структура трабекулярної кістки щурів: а – віварний контроль, б – гіпокінезія в атмосферному повітрі, в – гіпокінезія за умов періодичної нормобаричної гіпоксії. Сканограма. Лінійна мітка відповідає 1 мм.

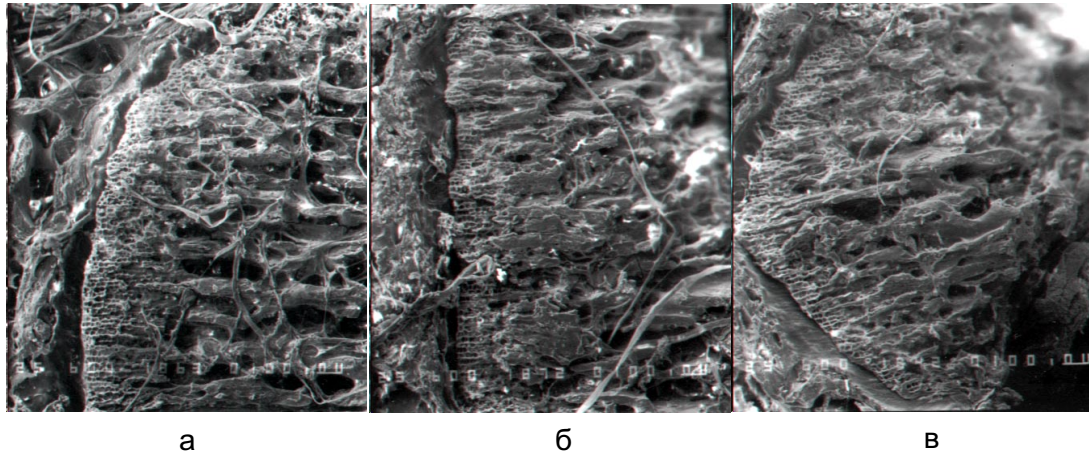


Рис. 4. Сканограма метафізів стегнових кісток щурів: а- віварний контроль, б – гіпокінезія в атмосферному середовищі, в – гіпокінезія за умов періодичної нормобаричної гіпоксії. Збільшення x 60.

варію. Така сама тенденція виявляється при оцінці висоти ростової пластинки за лінійними розмірами, хоча розходження не достовірні. Довжина ділянки кальцифікованого хряща в метафізах змінюється пропорційно розмірам зони росту. Це видно з результатів, отриманих за допомогою скануючої електронної мікроскопії: $147,5 \pm 21,0$; $145,0 \pm 12,9$; $118,8 \text{ мкм} \pm 13,1 \text{ мкм}$ у контролі, при гіпокінезії та при гіпокінезії за умов гіпоксії відповідно.

Питомий об'єм трабекул первинної спонгіози у щурів після обмеження рухливості

зберігається приблизно на рівні контролю, тоді як через сильну редукцію об'єму підрахунок цих даних для вторинної спонгіози виявився неможливим. Гістологічна картина свідчить про пригнічення остеогенезу. Остеобласти не покривають усієї поверхні трабекул і в більшості мають сплюснену форму, що свідчить про відсутність активного синтезу органічних компонентів кісткового матриксу. Остеокласти досить численні та локалізовані головним чином у ділянці вторинної спонгіози. Розширені міжтрабекулярні прос-

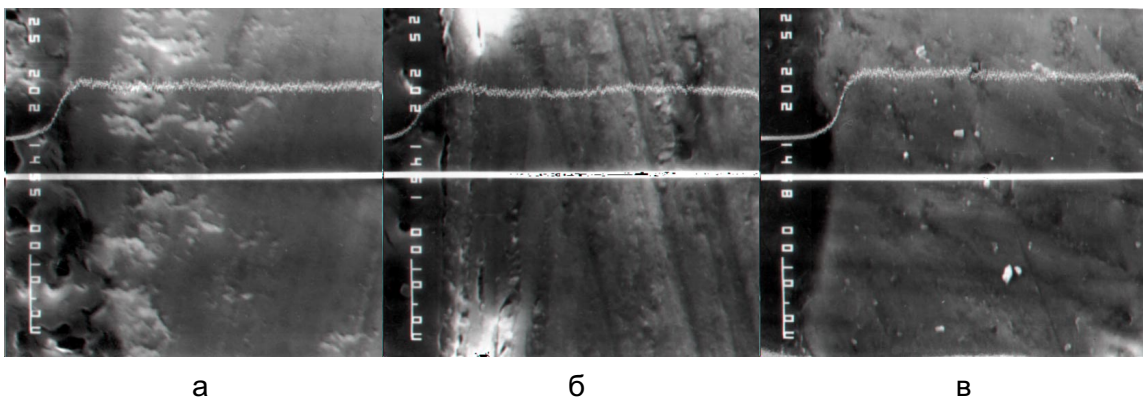


Рис. 5. Сканограма з накладенням кривої вмісту кальцію, обмірюваною по виділеній лінії, з боку медулярної поверхні в діяфізі стегнових кісток щурів: а – віварний контроль; б – гіпокінезія в атмосферному середовищі, в – гіпокінезія за умов дозованої нормобаричної гіпоксії.

тори заповнені клітинами кісткового мозку. Серед клітин кісткового мозку відносно висока кількість жирових клітин, що можна розглядати як показник зниження активності кровотворення порівняно з контролем.

У щурів із гіпокінезією, що перебували за умов періодичної подачі ГС зі зниженим вмістом кисню, навпаки, виявилось можливим кількісно оцінити тільки об'ємну щільність вторинної спонгіози. Цей показник виявився на 39 % нижчим відносно контролю. Ознаки зниження функціональної активності остеогенних клітин виявляються меншою мірою, ніж при гіпокінезії за умов атмосферного повітря. Остеокласти в ділянці метафіза численні не тільки поблизу кістковомозкової порожнини, але і безпосередньо в ділянках резорбції кальцифікованого хряща під ростовою пластинкою.

Гістоструктура діафіза стегнової кістки не змінена. Зниження значень середніх показників, що спостерігали, товщину стінки кісткового циліндру в середині діафіза в обох експериментальних групах щурів з гіпокінезією, статистично невірні і можуть розглядатися лише як тенденція. Вимір відносного вмісту кальцію в діафізах стегнових кісток за допомогою рентгенівського мікроаналізу також не виявив істотних розходжень у ступені мінералізованості.

Тангенс кута нахилу кривої вмісту кальцію на межі з кістковомозковою порожниною становив: 0,9, 0,5, 1,1 і з боку періостальної поверхні – 1, 1,6 і 1 для віварного контролю, гіпокінезії за умов атмосферного повітря, гіпокінезії за умов дозованої гіпоксії відповідно. Цей показник відображає швидкість збільшення вмісту кальцію від поверхні в середину кістки, залежить від рівня мінералізованості компактної кістки та товщини слабомінералізованого поверхневого шару.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Гістологічне дослідження показало, що в стегнових кістках у щурів усіх експериментальних груп епіфізарна зона росту й ділянка кальцифікованого хряща були збережені. Водночас у щурів із гіпокінезією виявлено істотне зменшення об'єму трабекулярної кістки порівняно з контролем. У щурів, які перебували за умов гіпокінезії та різних кисневих режимів, розрізнялася просторова організація трабекулярної кістки. При постійному вмісті кисню в атмосфері (21 %) резорбції піддавалася в основному вторинна спонгіоза, що безпосередньо прилягає до кістковомозкової порожнини, тоді як у первинній спонгіозі процеси резорбції були менш виражені. За умов дозованого зниження PO_2 трабекулярна кістка піддавалася резорбції більш рівномірно й у цілому її втрата була не настільки значна.

Відомо, що періодичне зниження вмісту кисню у вдихуваному повітрі збільшує кровонаповнення мікроциркуляторного русла та кількість капілярів у тканинах [1]. Оскільки активність процесів остеогенезу значною мірою залежить від рівня кровопостачання, при плануванні експерименту ми виходили з того, що періодичне зниження PO_2 в повітрі може активізувати мікроциркуляцію та запобігти деяким дистрофічним змінам у скелеті, що відбуваються внаслідок обмеження рухливості тварин. Отримані нами результати свідчать, що при гіпокінезії періодичне зниження PO_2 зберігає структуру трабекулярної кістки щурів більшою мірою, ніж атмосферне повітря. Проте об'єм, який займає вторинна спонгіоза у щурів III групи збільшений внаслідок зменшення об'єму первинної спонгіози, трабекули її тонші, відстані між ними більші, ніж у кістковій тканині контрольних тварин.

Судячи з рівня виведення ГАГ із сечею у щурів II групи після 28 діб експеримен-

ту, активність процесу резорбції кісткових структур знижувалася. У щурів, які періодично отримували гіпоксичну газову суміш, показники виведення продуктів деградації кісткового матриксу нормалізувалися настільки, що практично не відрізнялися від контролю. На момент закінчення експерименту вміст КФ у крові, який відображає активність остеокластичних клітин, у щурів усіх груп вірогідно не відрізнявся від норми.

Концентрація ПТГ у сироватці крові щурів з обмеженою рухливістю, що дихали різними ГС, вірогідно підвищувалася. Як показали досліді на щурах, секреція ПТГ з віком тварин підвищується [12, 19] незалежно від вмісту кальцію в крові. Можливо, така реакція пов'язана зі зниженням всмоктування кальцію в шлунково-кишковому тракці, або зниженням ниркової функції, які відбуваються як у фізіологічному процесі онтогенезу, так і у патологічному процесі реакції на гіпокінезію.

Таким чином, нами показано, що при обмеженні рухливості у щурів відбувається значне зменшення об'єму вторинної спонгіози внаслідок зниження активності остеогенних клітин. Водночас наявні ознаки резорбції трабекул, що може негативно впливати на механічні властивості метафізів кісток. Відзначено також тенденцію до зниження активності периостального остеогенезу та демінералізації внутрішніх шарів кісткової трубки. Періодична подача дозованої гіпоксичної ГС дозволяє зменшити негативний ефект гіпокінезії.

I.G. Litovka, O.P. Berezovska

THE OXYGEN DEPRIVATION AS THE OSTEOGENESIS INITIATOR UNDER THE HYPOKINESIA

The hypokinesia initiated on the dystrophic changes in the rats' femur bones was studied. The interrupted normobaric hypoxia destructive inhibited possibility in the bone tissue was also investigated. It was shown that inspiration the gas

mixture (nitrogen and oxygen (P_{O_2} =100-110 mm Hg) normalizes the biochemical markers, greatly minimizes the loss of the secondary spongioza due to the decrease of osteoclastic resorption activity; normalizes the compact bone peripheral layers. The decreased osteoblasts activity in comparison with the control in the metaphysis and the smaller length growth indicate non-complete hypokinesia influence compensation after the oxygen deprivation.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: Наук. думка, 1975. – 280 с.
2. Березовський В.Я., Літовка І.Г., Чака О.Г. Вплив дозованої гіпоксії на розвиток ситуаційної остеопенії // Фізіол. журн. – 2000. – 46, № 1. – С. 10 – 16.
3. Березовский В.А., Литовка И.Г., Чака Е.Г., Магомедов С. Влияние дозированной гипоксии на метаболизм костной ткани в условиях осевой разгрузки задних конечностей // Косм. наука і технологія. – 2000. – 6, №2/3. – С. 77 – 84.
4. Григорьев А.И., Воложин А.И., Ступаков Г.П. Минеральный обмен у человека в условиях измененной гравитации. – В кн.: Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1994. – Т. 74. – 214 с.
5. Кляцкин С.А., Лифшиц П.И. Определение гликозаминогликанов орциновым методом у больных // Лаб. дело. – 1989. – № 9. – С.51 – 53.
6. Коржув П.А. Эволюция, гравитация, невесомость. – М.: Наука, 1971. – 152 с.
7. Леонтьев В.К., Петрович Ю.А. Биохимические методы исследования в клинической и экспериментальной стоматологии. – Омск, 1976. – 93 с.
8. Оганов В.С. Гипокинезия – фактор риска остеопороза // Остеопороз и остеопатия. – 1998. – №1. – С.13 – 17.
9. Прохончуков А.А., Жижина Н.А., Тигранян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии. – В кн.: Проблемы космической биологии. – М.: Наука, 1984. – Т. 49. – 200 с.
10. Риггз Б.Л., Мелтон III Л. Дж. Остеопороз: Пер. с англ. М. – СПб.: ЗАО "Изд-во БИНОМ", "Невский диалект", 2000. – 560 с.
11. Chole R.A., Tinling S.P. Incomplete coverage of mammalian bone matrix by lining cells // Ann. Otorhinol. Laryngol. – 1993. – 102, № 5. – P.543 – 550.
12. Fox J. Regulation of parathyroid-hormone secretion by plasma calcium in aging rats // Amer.J.Physiol. – 1991. – 260, № 2. – P. E 220 – E225.
13. Fukuoka H., Nishimura Y., Haruna M., Suzuki Y. Effect of bed rest immobilization on metabolic turnover of bone and bone mineral density // Gravit. Physiol. – 1997. – 4, № 1. – P. S75 – S81.

14. Kakegawa H., Nikawa T., Takagi K., Kamioka H. Participation of cathepsin L in bone resorption // FEBS Lett. – 1993. – **321**, № 2. – P. 247 – 250.
15. Lutwak L., Whedon G.D., la Chance H.F. Mineral, electrolyte and nitrogen balance studies of the Gemini 7 fourteen-day orbital space flight // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 1969. – **29**, № 9. – P. 1140 – 1156.
16. Rambaut P.C., Leach C.S., Johnson P.C. Calcium and phosphorus change of the Appolo-17 crewmembers // Nutr. Metab. – 1975. – **18**, №. 2. – P. 62 – 69.
17. Sontag W. Quantitative measurements of periosteal and cortical-endosteal bone formation and resorption in the midshaft of male rat femur // Bone. – 1986. – **7**, № 1. – P. 63 – 70.
18. Vico L., Chappard D., Palle S. et al. Trabecular bone remodeling after seven days of weightlessness exposure (BIOCOSMOS 1667) // Amer. J. Physiol. – 1988. – **255**, № 2. – P. R243 – R247.
19. Wongsurawat N., Armbrecht L.I.J. Comparison of calcium effect on in vitro calcitonin and parathyroid glands // Exp. Gerontol. – 1987. – **22**, № 2. – P. 263 – 269.
20. Wronski T.J., Morey-Holton E., Jee W.S.S. Cosmos 1129: space flight and bone changes // Physiologist. – 1980. – **23**. – P. S79 – S82.

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