

Вплив екзогенного мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини

В.Я.Березовський¹, І.Г.Літовка¹, С.П.Весельський², Р.В.Янко¹, У.О. Жернокльов¹

¹Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ; ²Інститут фізіології імені Петра Богача Національного Київського університету ім. Тараса Шевченка, Київ;
E-mail: litir@biph.kiev.ua

Досліджували у весняний період 28-добовий вплив фармакологічної дози (5 мг/кг) мелатоніну на показники ремоделювання кісткової тканини 3-місячних щурів-самців із високим та низьким рівнем енергетичного метаболізму. Показано зниження активності остеобластів і зростання активності остеокластів незалежно від інтенсивності енергетичного метаболізму, підвищення концентрації глікозаміногліканів, вільних амінокислот. Це свідчить про пригнічення фізіологічного ремоделювання кісткової тканини і не сприяє підтриманню цілісності органічного матриксу та фіксації неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

Ключові слова: мелатонін; кісткова тканина.

ВСТУП

Мелатонін відіграє ключову роль як паракринна сигнальна молекула для локальної координації клітинних функцій і міжклітинних зв'язків. Водночас він може діяти і як типовий гормон для віддалених клітин-мішеней. Функціонально всі клітини, що продукують мелатонін, мають відношення до так званої дифузної нейроендокринної системи, універсальної системи адаптації та підтримки гомеостазу. За своїми властивостями він належить до циркадно-залежних регуляторів метаболізму.

Головними ефектами дії цього гормону на кісткову тканину є: стимулювання диференціації та активації остеобластів, гальмування диференціації остеокластів, нейтралізування утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових і неколагенових білків кісткового матрикса [1–3]. Існують і інші гіпотези щодо впливу мелатоніну на ці процеси. Виявлено залежність між високою його концентрацією в плазмі крові щурів-самців лінії Вістар і низьким рівнем маркерів формування кісткової

тканини [4]. В іншому дослідженні проаналізовано ефекти мелатоніну на культуру остеобластів за наявності остеокластів. Виявлено пригнічення активності обох типів клітин, що дало змогу зробити висновок про існування балансу між ними [5, 6]. Автори підкреслюють важливість міжклітинної взаємодії остеобластів і остеокластів для розуміння їх фізіологічної активності так само, як і реакції на додавання мелатоніну.

У наших попередніх дослідженнях спостерігали вплив 28-добового перорального введення екзогенного мелатоніну у фізіологічній дозі 1 мг/кг у весняний період на фізіологічне ремоделювання кісткової тканини у молодих і дорослих щурів-самців лінії Вістар [7–9]. Показано вірогідне підвищення його концентрації у сироватці крові молодих і дорослих дослідних щурів на 50 та 25,6% відповідно, вірогідне підвищення активності лужної фосфатази у кістковій тканині обох досліджуваних груп тварин та її зниження у сироватці крові 9-місячних щурів і тенденцію до зниження у 3-місячних. Підвищення ендогенного вмісту гормону

супроводжувалося вірогідним зростанням активності кислої фосфатази в 1,6 і 1,3 раза та концентрації глікозаміногліканів у сироватці крові в 3,1 і 1,4 раза у 3- та 9-місячних щурів відповідно. Експресія гена інсуліноподібного фактора росту І у тварин обох досліджуваних груп мала тенденцію до підвищення. Зроблено висновок, що введення мелатоніну у дозі 1 мг/кг значно інтенсифікує фізіологічне ремоделювання кісткової тканини як у молодих, так і дорослих щурів.

Відомо, що в популяції щурів існують особини з високим і низьким рівнем енергетичного метаболізму (РЕМ). Виникає питання чи однаково вони реагують на введення екзогенного мелатоніну? Чи збільшена до фармакологічного рівня доза мелатоніну діє так само як фізіологічна?

Мета цієї роботи – дослідити показники ремоделювання кісткової тканини щурів із високим та низьким рівнем метаболізму після введення екзогенного мелатоніну.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 24 молодих (3 міс) щурах-самцях лінії Вістар у весняний період (березень–квітень), одержаних із розплідника віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України. Тварини знаходилися у стандартних умовах віварію при природному циклі світло/темрява та отримували звичайний раціон харчування.

Споживання кисню визначали методом непрямой калориметрії о 10.00 ранку натщесерце. Усі вимірювання проводили три рази. Розраховували споживання кисню у мілілітрах за 1 год на 1 кг. Всю популяцію щурів-самців розділили на тварин із низьким та високим РЕМ. Їм перорально у фармакологічній дозі 5 мг/кг протягом 28 діб вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну («Unipharm Inc.», США) о 10.00. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води.

У сироватці крові щурів за допомогою

стандартних наборів реактивів визначали лужну фосфатазу (ЛФ, «Лахема», Чехія) – показник формування кісткової тканини, а також кислу фосфатазу (КФ, «BioSystems», Іспанія), тартратрезистентну кислу фосфатазу (ТРКФ, «BioSystems», Іспанія), глікозаміноглікани (ГАГ) – показники резорбції [10]. В екстракті кісткової тканини досліджували уранові кислоти [11], гіалуронідазну активність [12].

Концентрацію вільних амінокислот і ліпідів у кістковій тканині розраховували методом тонкошарової хроматографії. Для визначення основних фракцій ліпідів у кістковій тканині стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку кісткової тканини (100 мг) знежирювали і зневоднювали в спирті та ацетоні (1:2) [13]. Потім його випарювали, а сухий залишок ліпідів розчиняли в 100 мкл суміші хлороформ–бензол–ацетон (1:2:1) і наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем. Хроматографічне розділення загальних ліпідів проводили на фабрично виготовлених пластинах Silufol (Чехія) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх упродовж 1 год в термостаті при 110°C. Водночас у хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гексан–діетиловий ефір–оцтова кислота (7:23:1) [14].

Для визначення амінокислотного складу знежирену та зневоднену стегнову кістку піддавали гідролізу при 100°C 20 хв у розчині 0,04 моль/л CH_3COOH (1:10). Центрифугували 30 хв при 3000 хв^{-1} . Супернатант випарювали при 40–60°C і розчиняли в 0,1 мл 50 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Наносили на розмічену хроматограму мікрошприцем по 20 мкл. Для розгонки використовували систему розчинників, яка включала ізоаміловий спирт–бутиловий спирт–оцтову кислоту–мурашину кислоту–воду (9:7:4:25:4) за об'ємом [15, 16].

Статистичний аналіз результатів здійснювали з використанням програми OriginPro 8.5. Визначали такі статистичні показники:

середнє значення – M , середнє квадратичне відхилення – m , вірогідність різниці двох масивів значень – P , який знаходили за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Метаболічний стан клітинних елементів кісткової тканини, які характеризують інтенсивність її фізіологічного відновлення/руйнування, ми оцінювали вимірюючи відповідні маркери двох основних типів клітин, що беруть участь у фізіологічному ремоделюванні кістки: остеобластів та остеокластів.

Після перорального введення мелатоніну спостерігали загалом у групі тенденцію до зниження активності ЛФ на 8% порівняно з контрольними значеннями. Активність ЛФ у сироватці крові у тварин із високим та низьким РЕМ вірогідно не змінювалася. Виявлено лише тенденцію до її незначного (3%) зростання при високому РЕМ і тенденцію до зниження активності на 6% порівняно з контролему щурів із низьким РЕМ.

Отримані нами результати узгоджуються з літературними даними щодо негативного впливу високих концентрацій мелатоніну на маркери формування кістки [4], однак суперечать тому, що мелатонін у фармакологічних дозах стимулює проліферацію остеобластів та підвищує активність ЛФ [2, 17].

Виявлено зростання на 78% ($P < 0,001$) активності КФ у сироватці крові щурів. У щурів із високим і низьким РЕМ відзначено підвищення активності КФ на 92 і на 72% ($P < 0,001$) відповідно порівняно з контролем (рис.1, а). Таким чином, спрямованість змін активності КФ була однаковою як загалом, так і у тварин із різним РЕМ. Активність ТРКФ у щурів знизилася в цілому на 72% ($P < 0,001$) відносно вихідних значень. У тварин як із високим, так і низьким РЕМ активність ТРКФ знижувалася на 79 і 85 % ($P < 0,001$) відповідно (рис.1, б).

Вважаємо, що екзогенний мелатонін

пригнічує процеси фізіологічного ремоделювання у молодих тварин, а саме: сприяє зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від РЕМ та загалом по групах. Про це свідчать показники відповідних ферментів. Аналогічні дані наведено Schroeder та співавт. [18], які показали, що екзогенний мелатонін у фармакологічній дозі гальмує резорбцію кісток. Проте існують також інші відомості. Показано, що мелатонін знижує резорбцію кісткової маси внаслідок пригнічення регуляції RANK-L [19].

Припускаємо, що пригнічення фізіологічного ремоделювання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну посилюється ендогенними ендокринними впливами. Адже відомо, що фармакологічні дози мелатоніну пригнічують тиреоїдну активність. А зниження функції щитоподібної залози суттєво впливає на структурно-метаболічний стан кісткової тканини. За літературними даними при зменшенні концентрації тиреоїдних гормонів знижується активність як остеобластів, так і остеокластів. Це призводить до 2-3-кратного гальмування швидкості ремоделювання кісткової тканини [20, 21].

Основні біохімічні механізми обміну колагену та протеогліканів у кістковій тканині аналізували визначаючи концентрацію ГАГ, уронових кислот та гіалуронідазну активність. Ці показники відображають реактивність сполучної тканини у відповідь на зовнішні подразники. Після введення фармакологічної дози мелатоніну спостерігали підвищення концентрації ГАГ у сироватці крові на 29 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. У тварин із високим та низьким РЕМ спрямованість реакції була однаковою – тенденція до підвищення.

Відомо, що надлишок ГАГ змінює колоїдну структуру кісткової тканини, посилює її гідрофільність, що спричиняє набухання і розпушення колагенових волокон. Тобто відбуваються руйнівні зміни органічного

матриксу кісткової тканини під впливом надлишку мелатоніну, які призводять до зниження консолідації колагенових волокон та їх зв'язку із кристалами мінералів.

У складі ГАГ містяться уронові кислоти, вміст яких зростає у сироватці крові при остеопорозі. Ми не виявили їх вірогідних змін як загалом у групі, так і у тварин із різним РЕМ. Гіалуронідазна активність у сироватці крові не змінювалася.

Загальна біохімічна особливість кісткової тканини – високий вміст ліпідів. Вони є важливою складовою сполучної тканини, проте їх роль у мінералізації кісткової тканини вивчена недостатньо. Зокрема, це стосується ролі білково-ліпідних комплексів у процесі остеогенезу та утворенні ядер кристалізації.

Досліджуючи концентрацію загальних ліпідів після введення мелатоніну, ми виявили її зниження у кістковій тканині на 13% ($P<0,05$) порівняно з контролем.

Відомо, що фосфоліпіди відіграють суттєву роль у функціонуванні клітинних оболонок, внутрішньоклітинному обміні та виконують ключову роль у зоні контакту

некальцифікованого та кальцифікованого хрящів. Саме там розташована базofilна лінія, яка у людей та ссавців може бути охарактеризована як фронт мінералізації. При визначенні концентрації фосфоліпідів по групі загалом, а також у тварин із високим та низьким РЕМ, ми не виявили вірогідних змін порівняно з контролем. Хоча спостерігалася тенденція до зниження цього показника на 10%.

Концентрація решти фракцій – загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот і тригліцеридів як загалом у групі, так і у тварин із високим та низьким РЕМ не змінювалася відносно контролю.

Амінокислоти – це саме ті базальні структури, з яких білки створюють свою первинну і всі наступні рівні організації. Концентрація більшості досліджуваних нами вільних амінокислот у кістковій тканині щурів загалом по групі після 28-добового прийому екзогенного мелатоніну зростала. Із 14 груп амінокислот зростання відмічено в 9 випадках, а саме: проліну та оксипроліну на 80 % ($P<0,01$), лейцину – на 33% ($P<0,05$), фенілаланіну – на 75% ($P<0,05$), ізолейцину – на 67% ($P<0,01$). Вірогідне зниження

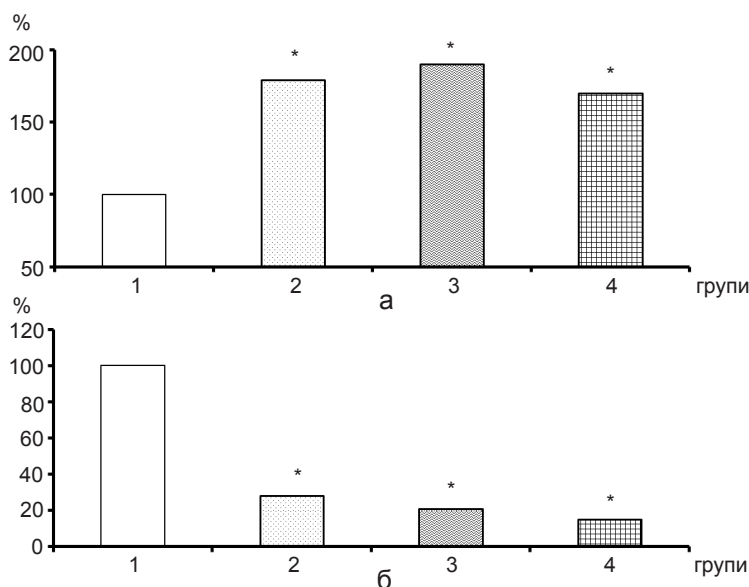


Рис.1. Активність кислотої фосфатази (а) та тартратрезистентної кислотої фосфатази (б) у сироватці крові молодих щурів після введення мелатоніну: 1 – контроль, 2 – загалом по групі, 3 – високий рівень енергетичного метаболізму, 4 – низький рівень енергетичного метаболізму. * $P<0,001$ порівняно з контролем

спостерігали лише концентрації валіна та триптофану на 57% порівняно з контролем.

У особин із високим РЕМ спостерігали збільшення концентрації гліцину та метіоніну на 55% ($P<0,01$) і зменшення валіну та триптофану на 50% ($P<0,05$) порівняно з контролем. У щурів із низьким РЕМ знизилася концентрація аланіну та глобуліну на 28% ($P<0,01$), збільшилася концентрація проліну та окипроліну на 88% ($P<0,01$), лейцину – на 60% ($P<0,01$), фенілаланіну – на 75% ($P<0,01$) та ізолейцину – на 66% ($P<0,01$) порівняно з контролем.

Зміни концентрації амінокислот, що безпосередньо беруть участь у синтезі колагену в кістковій тканині молодих тварин, після впливу екзогенного мелатоніну були односпрямованими. В більшості випадків ці показники вірогідно зростали, що може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу кісткової тканини. Отримані нами результати свідчать про негативний вплив фармакологічної дози мелатоніну на ремоделювання кісткової тканини.

Таким чином, введення молодим щурам мелатоніну у фармакологічній дозі у весняний період пригнічує фізіологічне ремоделювання кісткової тканини. А саме: сприяє зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від споживання кисню та загалом по групі, підвищенню концентрації ГАГ, вільних амінокислот. Це, на нашу думку, не сприяє підтриманню цілісності органічного матриксу та фіксації неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

**В.А.Березовский¹, И.Г.Литовка¹,
С.П.Весельский², Р.В.Янко¹, У.А.Жерноклев¹**

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА НА РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ

Исследовали в весенний период 28-суточное влияние фармакологической дозы (5 мг/кг) мелатонина на показатели

ремоделирования костной ткани 3-месячных крыс-самцов с высоким и низким уровнем энергетического метаболизма. Показано снижение активности остеобластов и возрастание активности остеокластов независимо от интенсивности энергетического метаболизма, повышение концентрации гликозаминогликанов, свободных аминокислот. Это свидетельствует об угнетении физиологического ремоделирования костной ткани и не способствует поддержанию целостности органического матрикса и фиксации неорганического компонента соединительной ткани – кристаллов гидроксиапатита.

Ключевые слова: мелатонин; костная ткань.

**V.A.Berezovsky¹, I.G.Litovka¹, S.P.Veselsky²,
R.V.Janko¹, U.A.Zhernoklev¹**

THE EFFECT OF EXOGENOUS MELATONIN ON BONE REMODELING

It was investigated in spring 28-day experiment the administration of pharmacological doses (5 mg/kg) of melatonin to 3-month male rats with high and low levels of energy metabolism remodeling of bone tissue. It was shown the decrease in activity of osteoblast and increase of osteoclast activity regardless of energy metabolism intensity, increase in concentration of glycosaminoglycans and free amino acids. This indicates the inhibition of physiological bone remodeling and helps to maintain the integrity of the organic matrix and the inorganic component of the fixation of the connective tissue - hydroxyapatite crystals.

Key words: melatonin; bone tissue.

¹*O.O.Bogomolets Institute of Physiology NAS, Kiev;*

²*Peter Bohach Institute of Physiology of Kiev National Taras Shevchenko University*

REFERENCES

1. Anisimov V. Role of melatonin in organism and its practice in. St/ Petersburg: Systema: 2007 [Russian].
2. Nakade O, Koyama H, Aiji H, Yajima A, Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. J Pineal Res. 1999; 27(2):106-10;
3. Roth JA, Byung-Gook Kim, Fei Song, Wen-Lang Lin, Moon-II Cho. Melatonin promotes osteoblasts differentiation and bone formation. J Biological Chemistry. 1999; 274(45):22041-47.
4. Ostrowska Z, Wolkowska-Pokrywa K, Kos-Kudla B, Swietochowska E, Marek B, Kajdaniuk D. Melatonin and bone status. Pol. Merkur. Lekarski. 2006; 21(124):389-93.
5. Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Tan DX, Reiter RJ. Scientific basis for the potential use of melatonin in bone disease: osteoporosis and adolescent idiopathic scoliosis. J Osteoporosis. 2010; 2010(1):1-10.
6. Suzuki N, Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. J Pineal

- Res. 2002; 33(4):253–58.
7. Berezovsky VJ, Litovka IG, Kostjuchenko OS, Janko RV. Influence of melatonin on physiological regeneration processes of bone tissue of young rats. Space Technol. Sci. 2008; 14(3):75-81 [Ukrainian].
 8. Berezovsky VJ, Litovka IG, Veselsky SP, Zamorska TM, Janko RV. Influence of exogenous melatonin on lipids and amino acid warehouse in organic matrix of bone tissue. Space. Technol. Sci. 2012; 18(3):78-82 [Ukrainian].
 9. Litovka IG, Berezovsky VA. The organic matrix adaptation and bone remodeling. Donetsk: Publisher Zaslavsky A.; 2014 [Russian].
 10. Klyatskin SA, Lifshitz RI. Determination of glycosaminoglycans by orsinov method in patients blood. Lab Work. 1989; 10:51-53 [Russian].
 11. Leontiev VK, Petrovich VK. Biochemical Methods in Clinical and Experimental Dentistry. Omsk: 1976 [Russian].
 12. Sharaev PN, Strelkov NS, Guncha VV, Sosulina LL. Determination of hyaluronidase activity in biological fluids. Clin Lab. Diagnostics. 1996; 3:21-22 [Russian].
 13. Peter VI, Regerand TI, Lysenko EI. Extraction, separation and quantification of lipid fractions of blood serum. Lab Business. 1986; 6:339 [Russian].
 14. Way of sample preparation of biofluids detecting in lipids determination Nature. Veselskiy SP, Lyaschenko PS, Kostenko S.I., Gorenko ZA, Kurovska LF. Deklaratsiyny patent for vinahid №33564A, 15.02.2001. [Ukraine], stated 11.03.1999 -Byul.№1, In Registration 15.02.2001 [Ukrainian].
 15. Kaznacheeva AI, Sinister NC. The content of free amino acids in healthy blood plasma, erythrocytes and urine. Lab Work. 1976; 8:479-80 [Russian].
 16. Korobeinikova EM, Meshcheriakova GV. Determination of free amino acids in the serum and urine of healthy children. Lab Work. 1981; 4:221-24 [Russian].
 17. Satomura K, Tobiume S, Tokuyama R. Melatonin at pharmacological doses enhances human osteoblastic differentiation in vitro and promotes mouse cortical bone formation in vivo. J Pineal Res. 2007; 42(3): 231–39.
 18. Schroeder A, Van Der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. J Maxillofacial Surgery. 1981; 9(1):15–25.
 19. Penarrocha Diago M, Oltra Moscardo M.J., Sanchis Bielsa J.M. Implantologia Oral. Barcelona, Spain: Ars Medica; 2005. Conceptos generales de implantologia. P.3–17.
 20. Greenspan SL. Effect of thyroid hormone on bone / Greenspan SL, Greenspan FS. Mezhd Zh Med Praktiki. 2001; 1:47-55 [Russian].
 21. Danilova LI. Thyroid hormones and bone metabolism. Med News. 2001; (9):3-7 [Russian].

*Матеріал надійшов
до редакції 29.01.2015*