

# Ремоделювання кісткової тканини після введення екзогенного мелатоніну в різні сезони року

І.Г.Літовка<sup>1</sup>, В.Я.Березовський<sup>1</sup>, С.П.Весельський<sup>2</sup>, У.О.Жернокльов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, Київ, <sup>2</sup>Інститут фізіології ім. Петра Богача Київського національного університету ім. Тараса Шевченка; e-mail: litir@biph.kiev.ua

*Досліджено 28-добовий вплив фармакологічної дози (5 мг/кг) мелатоніну на показники ремоделювання кісткової тканини 3-місячних щурів-самців лінії Вістар в осінній та весняний періоди. Восени введення мелатоніну викликало підвищення активності лужної фосфатази на 43,9%, гіалуронідазної активності на 15,4% та зниження концентрації глікозаміногліканів на 46,7% незалежно від інтенсивності споживання кисню. Концентрація загальних ліпідів і тригліцеридів знижувалася. Навесні введення щурам мелатоніну пригнічувало фізіологічне ремоделювання кісткової тканини, знижувало активність лужної фосфатази і підвищувало активність кислоти і тартратрезистентної кислоти фосфатази на 78 і 72% відповідно, незважаючи на рівень споживання кисню. Зростала концентрація глікозаміногліканів і вільних амінокислот. Такі зміни можуть порушувати цілісність органічного матриксу та послаблювати фіксацію неорганічного компонента сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.*

*Ключові слова:* мелатонін; ремоделювання кісткової тканини.

## ВСТУП

У численних дослідженнях показано сезонні зміни характеру та інтенсивності фізіологічних процесів в організмі та їх біохімічних показників [1, 2]. Якщо циркадіанні (добові) ритми забезпечують термінову адаптацію функцій організму до зміни освітлення, то циркануальні (сезонні) – до зміни енергетичного метаболізму та процесів регенерації [3, 4]. Синтезу мелатоніну в організмі притаманна як добова, так і сезонна ритміка. Восени та взимку зі зменшенням освітлення концентрація гормону зростає, а весною та влітку, навпаки, знижується [5, 6]. Біоритмологічна структура метаболізму кісткової тканини (КТ) є достатньо пластичною і легко модифікується при змінах умов зовнішнього середовища: температури повітря, ступеня освітленості та режиму харчування [6]. У літературі існує точка зору, що мелатонін впливає на циркадіанні ритми метаболізму кістки. Однак дані щодо його дії на ремо-

делювання КТ нині є дискусійними. Серед головних ефектів цього гормону на КТ відзначають: стимуляцію диференціації та активації остеобластів, гальмування диференціації остеокластів, нейтралізацію утворених остеокластами вільних радикалів, посилення синтезу колагенових і неколагенових білків кісткового матриксу [7–9]. Тобто встановлена можливість циркадіанної інтенсивності фізіологічної регенерації КТ за допомогою зміни амплітуди та ритму добових флуктуацій концентрації мелатоніну в організмі. Щодо циркануальних впливів – такі дані неоднозначні.

Мета нашої роботи – порівняння ефектів дії екзогенного мелатоніну на ремоделювання КТ щурів лінії Вістар у різні сезони року.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 48 молодих (3 міс) щурах-самцях лінії Вістар у весняний період (березень-квітень) та восени (жовтень-листо-

пад). Тварин одержано із розплідника віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України. Вони знаходилися під наглядом ветеринарного лікаря у стандартних умовах віварію при природному циклі світ/темрява.

Для зменшення ступеня дисперсії показників у кожній з груп контрольних і дослідних тварин їх додатково розділили на підгрупи із низьким та високим рівнем споживання кисню (РСК). Цей показник визначали методом непрямой калориметрії о 10.00 натщесерце три рази. Розраховували споживання кисню у мілілітрах  $O_2$  за 1 год на 1 кг маси тіла. Дослідним щурам перорально у фармакологічній дозі 5 мг/кг протягом 28 днів вводили 1 мл водної суспензії мелатоніну («Unipharm Inc.», США) о 10.00. Контрольним щурам у той самий час вводили еквівалентну кількість дистильованої води. Через 28 днів щурів декапітували під рауш-наркозом із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей.

Рівень руйнування та синтезу КТ визначали, вимірюючи активність найбільш специфічних ферментів остеокластів та остеобластів або інших речовин, які надходять у кров під час ремоделювання. У сироватці крові щурів за допомогою стандартних наборів реактивів визначали активність лужної фосфатази (ЛФ, «BioSystems», Іспанія) – як показник формування КТ та кислої фосфатази (КФ, «BioSystems», Іспанія), тартратрезистентної кислої фосфатази (ТРКФ, «BioSystems», Іспанія), глікозаміноглікани (ГАГ) – як показники резорбції [10]. В екстракті КТ вимірювали концентрацію уронових кислот [11], гіалуронідазну активність [12].

Методом тонкошарової хроматографії визначали концентрацію вільних амінокислот і ліпідів у КТ. Для цього стегнову кістку очищали від м'язів і відмивали від кісткового мозку. Наважку КТ (100 мг) знежирювали і зневоднювали в розчині спирт-ацетон (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 пластинках Silufol (Чехія) розміром 15×15 см, попередньо активуючи їх впродовж години в термостаті при 110 °С. У цей самий час у хроматографічну камеру для кращого насичення вносили фільтрувальний папір і наливали суміш розчинників: гександіетиловий ефір-оцтова кислота (7:23:1) [14].

Для визначення амінокислотного складу КТ – знежирену і зневоднену стегнову кістку піддавали гідролізу при 100°C 20 хв у розчині 0,04 М  $CH_3COOH$  (1:10). Центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Супернатант випарювали при 40-60°C і розчиняли в 0,1 мл 50%-го  $C_2H_5OH$ . 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 отриманих результатів здійснювали на ПК із використанням програми OriginPro 8,5. Визначали середнє арифметичне (M) і стандартну похибку (m). Вірогідність різниці між контрольними і дослідними зразками оцінювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Восени після перорального введення мелатоніну молодим тваринам активність ЛФ у сироватці крові щурів зросла на 43,9% ( $P<0,05$ ). Ці результати узгоджуються з літературними даними щодо впливу мелатоніну у фармакологічних дозах на проліферацію остеобластів та активність ЛФ [9, 17]. Весною, навпаки, спостерігали лише зворотну тенденцію до зниження активності ЛФ на 8% порівняно з контрольними значеннями (рис. 1).

Активність КФ і ТРКФ у сироватці крові восени за тих самих експериментальних умов

проявляла тенденцію до зниження. У весняний період активність КФ вірогідно зросла на 78%, а ТРКФ – знизилася на 72% відносно контролю (рис.2). Припускаємо, що пригнічення фізіологічного ремоделювання КТ весною після введення екзогенного мелатоніну посилюється ендогенними ендокринними впливами, які здійснюються щитовидною залозою. Відомо, що фармакологічні дози мелатоніну пригнічують тиреоїдну активність, а зниження функції щитоподібної залози суттєво впливає на структурно-метаболічні показники стану КТ. За літературними даними при зменшенні концентрації тиреоїдних гормонів знижується активність як остеобластів, так і остеокластів. Це призводить до 2-3- кратного гальмування швидкості ремоделювання КТ [18, 19].

Концентрація ГАГ у сироватці крові восени знизилася на 46,7 % ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем (рис.3). Весною цей показник підвищився на 29 % ( $P < 0,05$ ) щодо контролю. Відомо, що надлишок ГАГ змінює колоїдну структуру КТ, посилює її гідрофільність, що спричиняє набухання і розпушення колагенових волокон [20, 21]. Тобто у весняний період відбувається часткова деградація органічного матриксу КТ під впливом надлишку мелатоніну, що призводить до зниження консолідації колагенових волокон та їх зв'язку з кристалами мінералів. У досліджувані періоди ми не виявили вірогідних змін концентрації уронових кислот, які є у складі ГАГ.

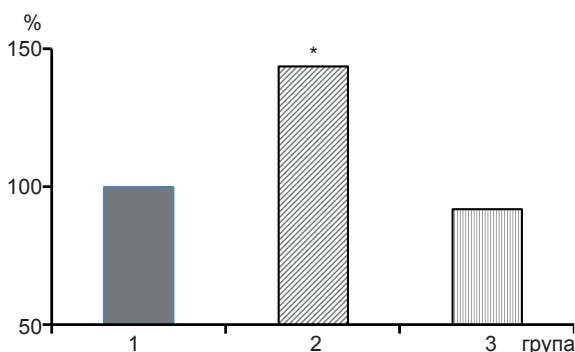


Рис. 1. Активність лужної фосфатази у сироватці крові молодих щурів контрольних (1) та після введення мелатоніну восени (2), весною (3).

\* $P < 0,05$  порівняно з контролем

Гіалуронідазна активність – це поєднана дія двох лізосомальних ферментів гіалуроноглюкозамінідази і гіалуроноглюкоронідази, які розщеплюють ГАГ у КТ. Восени вона вірогідно зросла на 15,4% у сироватці крові тварин дослідної групи (рис.4). У весняний період цей показник не змінювався.

Органічний та неорганічний матрикс безпосередньо сполучені між собою прямою хімічною взаємодією. Ліпідні компоненти – одна з ланок цього зв'язку. Після введення мелатоніну направленість змін концентрації загальних ліпідів у КТ була однаковою восени і весною. Восени вона вірогідно знизилася на 22,7%, а весною – на 13% порівняно з контролем. Восени з усіх ліпідних фракцій знижувалася тільки концентрація тригліцеридів (ТГ) на 27,2% ( $P < 0,01$ ). Концентрація решти фракцій – ФЛ, загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот у дослідній групі не змінювалася відносно контролю.

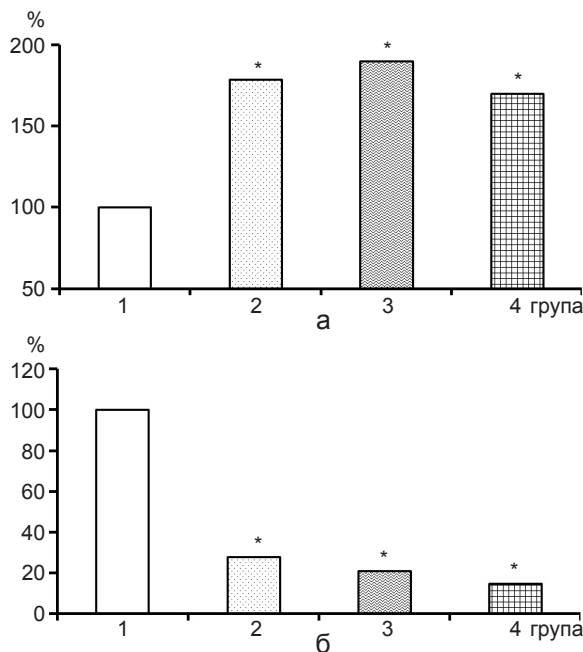


Рис.2. Активність кислої фосфатази (а) та тартратрезистентної кислої фосфатази (б) у сироватці крові молодих щурів після введення мелатоніну весною.

1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню; 4 – низький рівень споживання кисню.

\*  $P < 0,001$  порівняно з контролем

Весною виявлено лише вірогідне зниження концентрації загальних ліпідів у КТ дослідної групи тварин. Суттєвих змін концентрації ліпідних фракцій у КТ шурів та їх розподілі у загальному пулі ліпідів після впливу екзогенного мелатоніну у фармакологічній дозі ми не спостерігали. Результати отримані восени відрізнялися від весняних підвищенням майже на 10% концентрації загальних фосфоліпідів і зниженням на 8% загального холестерину.

Концентрація більшості досліджуваних восени вільних амінокислот у КТ експериментальних шурів після прийому екзогенного мелатоніну знижувалася, тоді як навесні – зростала. В осінній період спостерігали вірогідне зниження концентрації проліну та оксипроліну на 22 %, лейцину – на 49%, фенілаланіну – на 35%, ізолейцину – на 15%, валіну та триптофану – на 26%, тирозину та глютамінової кислоти – на 26%, треоніну та ізоваліну – на 39%. Концентрація аргініну, гістидину і таурину зросла на 48% ( $P<0,05$ ), гліцину та метіоніну – на 40% ( $P<0,01$ ), серину і аспарагінової кислоти – на 150% ( $P<0,01$ ), аланіну і глобуліну – на 124% ( $P<0,001$ ) порівняно з контролем.

Навесні у дослідних шурів відмічено вірогідне збільшення концентрації проліну та оксипроліну на 80 %, лейцину – на 33%,

фенілаланіну – на 75%, ізолейцину – на 67% відносно контрольних значень. Зниження спостерігали лише концентрації валіну та триптофану на 57% ( $P<0,01$ ) щодо контролю.

Зміни концентрації амінокислот, що безпосередньо беруть участь в синтезі колагену в КТ тварин, після впливу екзогенного мелатоніну весною були односпрямованими. У більшості випадків ці показники вірогідно зростали. Це може свідчити про пригнічення синтезу колагену органічного матриксу КТ. Отримані нами результати узгоджуються з наведеними вище щодо визначення концентрації ГАГ та свідчать про негативний сезонний вплив фармакологічної дози мелатоніну на ремоделювання КТ навесні. Можливо це пов'язано зі зміною температури середовища, весняним авітамінозом і зменшенням потреб високої теплопродукції.

Враховуючи індивідуальні варіації інтенсивності метаболізму в кожній з груп тварин ми визнали доцільним окремо проаналізувати показники реакції КТ особин із низьким та високим рівнем споживання кисню (РСК). Принцип такої диференціації описано в розділі «Методика».

Весною і восени активність ЛФ вірогідно не змінювалася у сироватці крові тварин із високим та низьким РСК порівняно з контролем. При визначенні восени активності

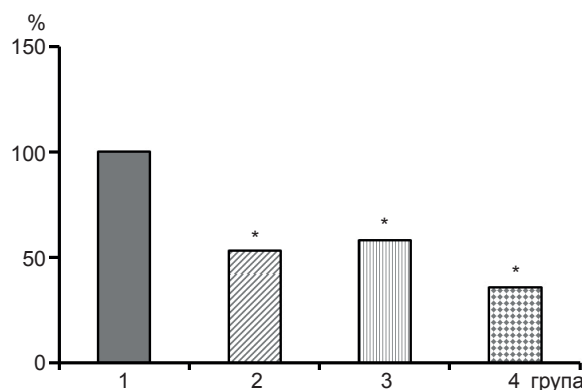


Рис.3. Активність глікозаміногліканів у сироватці крові молодих шурів після введення мелатоніну восени: 1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню; 4 – низький рівень споживання кисню.

\* $P<0,001$  порівняно з контролем

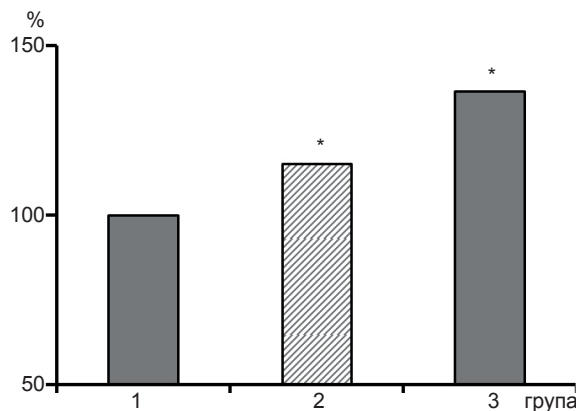


Рис.4. Гіалуронідазна активність у сироватці крові молодих шурів після введення мелатоніну восени: 1 – контроль; 2 – дослід; 3 – високий рівень споживання кисню.

\* $P<0,01$  порівняно з контролем

КФ і ТРКФ у сироватці крові тварин із високим та низьким РСК вірогідних змін порівняно з контролем не виявлено. У весняний період цей показник вірогідно зростав у щурів із високим та низьким РСК на 92 і 72% відповідно відносно контролю (див.рис.2).

Восени у тварин із високим та низьким РСК концентрація ГАГ знижувалася на 41,6 і 64,1% відповідно ( $P<0,05$ ; див.рис.3). У щурів із високим та низьким РСК весною спрямованість реакції була однаковою – тенденція до підвищення. Ми не виявили вірогідних змін концентрації уронових кислот у тварин із різним РСК. Восени гіалуронідазна активність зросла у щурів із високим РСК на 36,5% ( $P<0,01$ ) щодо контролю (див.рис.4). У весняний період вона не змінювалася.

Весною та восени у представників із високим та низьким РСК вірогідно не змінювалася порівняно з контролем концентрація ФЛ, загального, вільного та ефірів холестерину, вільних жирних кислот і ТГ.

У особин із низьким РСК восени спостерігали вірогідне порівняно з контролем збільшення концентрації у 5 пар амінокислот і зниження у 7 пар із 14 досліджуваних. Не змінювалися лише концентрації лізину і аспарагіну та валіну і триптофану. У щурів із високим РСК восени знизилася концентрація треоніну та ізоваліну на 23% ( $P<0,001$ ) і лейцину на 28% ( $P<0,05$ ), збільшилася концентрація орнітину та глюкозаміну на 88% ( $P<0,01$ ), серину і аспарагінової кислоти – на 140% ( $P<0,001$ ), аланіну і глобуліну – на 87% ( $P<0,01$ ) порівняно з контролем. Навесні у особин із високим РСК спостерігали зростання концентрації гліцину та метіоніну на 55% ( $P<0,01$ ) і зниження валіну та триптофану на 50% ( $P<0,05$ ) порівняно з контролем. У представників із низьким РСК вірогідно знизилася концентрація аланіну та глобуліну на 28%, підвищилася концентрація проліну та оксипроліну на 88%, лейцину – на 60%, фенілаланіну – на 75% та ізолейцину – на 66% порівняно з контролем.

Отримані нами результати свідчать про істотність впливу зовнішнього середовища на активність щитовидної залози та пов'язаних з ендокринним статусом процесів ремодельовання КТ. Вважаємо, що сезонні зміни чутливості рецепторів елементів КТ до екзогенних впливів (у тому числі фармакотерапевтичних) повинні плануватися з врахуванням реального рівня реактивності КТ.

## ВИСНОВКИ

1. Введення восени екзогенного мелатоніну у дозі 5 мг/кг маси тіла впливає на процеси фізіологічного ремодельовання КТ молодих щурів лінії Вістар і призводить до підвищення активності ЛФ, зростання гіалуронідазної активності та зниження концентрації ГАГ незалежно від індивідуального споживання кисню.

2. Восени у КТ молодих щурів знижується концентрація загальних ліпідів і тригліцеридів, що може негативно вплинути на рівень її мінералізації.

3. Введення навесні молодим щурам мелатоніну пригнічувало фізіологічне ремодельовання КТ, сприяло зниженню активності остеобластів і зростанню активності остеокластів незалежно від рівня індивідуального енергетичного метаболізму, підвищенню концентрації глікозаміногліканів та вільних амінокислот. Це може свідчити про порушення цілісності органічного матриксу та послаблення фіксації неорганічного компоненту сполучної тканини – кристалів гідроксіапатиту.

И.Г.Литовка<sup>1</sup>, В.А.Березовский<sup>1</sup>,  
С.П.Весельский<sup>2</sup>, У.А.Жерноклев<sup>1</sup>

## РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА В РАЗНЫЕ СЕЗОНЫ ГОДА

Исследовали 28-суточное влияние фармакологической дозы (5 мг/кг) мелатонина на показатели ремоделирования костной ткани 3-месячных крыс-самцов линии Вистар в осенний и весенний периоды. Осенью введение мелатонина вызывало повышение активности щелочной фосфатазы на 43,9%, гиалуронидазной активности на 15,4% и снижение концентрации гликозаминогликанов на 46,7%

независимо от интенсивности потребления кислорода. Концентрация общих липидов и триглицеридов снижалась. Весной введение крысам мелатонина угнетало физиологическое ремоделирование костной ткани, снижало активность щелочной фосфатазы и повышало активность кислой и тартратрезистентной кислой фосфатазы на 78 и 72% соответственно независимо от интенсивности потребления кислорода. Повышалась концентрация гликозаминогликанов и свободных аминокислот. Такие изменения могут нарушать целостность органического матрикса и ослаблять фиксацию неорганического компонента соединительной ткани – кристаллов гидроксиапатита. Ключевые слова: мелатонин, ремоделирование костной ткани.

<sup>1</sup>Інститут фізіології ім.А.А.Богомольця НАН України;

<sup>2</sup>Інститут фізіології ім.Петра Богача Київського національного університету ім.Тараса Шевченка

**I.G. Litovka<sup>1</sup>, V.Ya. Berezovsky<sup>1</sup>, S.P.Veselskiy<sup>2</sup>, U.O.Zhernoklov<sup>1</sup>**

### **BONE TISSUE REMODELING AFTER THE INTRODUCTION OF EXOGENOUS MELATONIN IN DIFFERENT SEASONS**

We studied the impact of pharmacological doses (5 mg / kg) of melatonin on the parameters of bone remodeling in 3 month-old male Wistar rats in autumn and spring. In autumn experiments, introduction of melatonin to young rats caused an increase of alkaline phosphatase by 43,9% and hyaluronidase activity by 15,4% and decreased the content of glycosaminoglycans by 46,7%. The concentration of total lipids and triglycerides was decreased. In spring, the introduction of melatonin to young rats inhibited the physiological remodeling of bone tissue, reduced the activity of alkaline phosphatase and increased the activity of acid on the 78% and tartrate resistant acid phosphatases by 72% regardless of the oxygen consumption level. The concentration of glycosaminoglycans and free amino acids increased. Such changes may disturb the integrity of the organic matrix and reduce the fixation of inorganic component of connective tissue – hydroxyapatite crystals.

Key words: melatonin, bone tissue.

<sup>1</sup>*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;*

<sup>2</sup>*Petro Bogach Institute of Physiology of Kyiv National Taras Shevchenko University*

### **REFERENCES**

1. Kalabukhov NI. Hibernation in mammals. Moscow: Nauka: 1985. [Russian].
2. Ivanter E, Ivanter T, Tumanov IL. Adaptive features of small mammals. Moscow: Nauka: 1985. [Russian].

3. Gwinner E. Annual rhythms: total prospect / In. Biological rhythms. Transl. from English. Ed. Yu.A.Ashoffa. Moscow: Mir: 1984; 2: P.44-54. [Russian].
4. Zamorskii II., Pishak VP. Functional organization of photoperiodic system of the brain. *Uspehi Fiziol Nauk.* 2003; 34 (4):37-53. [Russian].
5. Anisimov VN., Vinogradova IA., Bukalov AV. Light desynchronization risk of malignancies in humans: the state of the problem. *Problems of oncology.* 2013; 59 (3):302-13. [Russian].
6. 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.
7. Anisimov VN. Role of melatonin in the body, the application in clinic. St. Petersburg: Publisher "System": 2007. [Russian].
8. Roth JA., Kim BG., Lin WL., Cho M. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem.* 1999; 274 (31): 22041-47.
9. Nakade O., Koyama H., Arijji HYajima., A., Kaku T. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells in vitro. *J Pineal Res.* 1999; 27 (2): 106-110.
10. Klyatskin SA, Lifshitz RI. Determination of glycosaminoglycans by ortsin 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 Diagnost.* 1996; 3:21-22. [Russian].
13. Petrovskiy VI, Regerand TI, Lysenko EI. Extraction, separation and quantification of lipid fractions of blood serum. *Lab Business.* 1986; 6:339. [Russian].
14. Veselskiy SP, Lyaschenko PS, Kostenko S.I., Gorenko ZA, Kurovska LF. Way of sample preparation of bioliquids detecting in lipids determination. *Pryroda.* Patent for invention №33564A, 15.02.2001. [Ukraine], stated 11.03.1999 -Bull.№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. *Labor.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): P.231-39.
18. Greenspan SL, Greenspan FS. Effect of thyroid hormone on bone. *Mezhdunar Zh Med Prakt (International magazine of medical practice).* 2001;1:47-55. [Russian].
19. Danilova LI. Thyroid hormones and bone metabolism. *Med Novosti (Medical News).* 2001; (9):3-7. [Russian].
20. Serov VV, Palcev MA. *Pathological anatomy.* Moscow: Medicina: 1998.
21. Ohanian AV. Clinical and morphological changes in dental system with hypothyroidism: abstract of research for the degree of candidate of medical sciences: specialty 14.00.21 "Dentistry", 14.03.02 "Pathological anatomy". Stavropol: 2010. [Russian].

*Матеріал надійшов до редакції 03.09.2015*