

УДК: 628.356.4:612.273

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ В УСЛОВИЯХ ДОЗИРОВАННОЙ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Березовский В.А., Литовка И.Г., Янко Р.В.

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины

e-mail: litir@biph.kiev.ua

Исследовали физиологическую регенерацию тканей при дыхании дозированной гипоксической газовой смесью на 72 крысах-самцах линии Wistar разного возраста. Выявлено, что дозированное снижение PO_2 во вдыхаемом воздухе способно активировать потенциальные возможности физиологической регенерации тех элементов костной ткани, которые отвечают за процессы ремоделирования. Дозированная нормобарическая гипоксия имеет стимулирующий эффект на физиологическую регенерацию, синтетическую и функциональную активность паренхимы печени.

Ключевые слова: физиологическая регенерация, нормобарическая гипоксия, костная ткань, печень.

Введение

Научная деятельность В.В. Подвысоцкого посвящена исследованиям в области общей патологии, иммунологии, эндокринологии, микробиологии. Но наибольший вклад внесен им в изучение процессов регенерации органов и тканей организма [1].

Исследования физиологической регенерации немногочисленны [2]. Сегодня ведутся активные поиски методов и факторов, которые могли бы ускорить физиологическую регенерацию тканей и органов. Одним из таких физических факторов может быть дозированная нормобарическая гипоксическая терапия. Нами был проведен ряд исследований по изучению влияния нормобарической гипоксии на интенсивность физиологической регенерации печени и костной ткани [3-5].

Цель – исследовать влияние дозированной нормобарической гипоксии саногенного уровня на физиологическую регенерацию печени и костной ткани.

Материалы и методы

Исследовали влияние двух режимов подачи дозированной нормобари-

ческой гипоксической газовой смеси (ГГС) со сниженным парциальным давлением кислорода ($PO_2 = 78-88$ мм рт. ст.) на физиологическую регенерацию паренхимы печени и костной ткани (КТ) 72 молодых (3 мес) и взрослых (12 мес) крыс-самцов. Животные на протяжении 28 суток периодически дышали ГГС в режиме 30 мин деоксигенация / 23 ч 30 мин реоксигенация (I) или 10 мин деоксигенация / 30 мин реоксигенация в течение 3 циклов (II). Продолжительность гипоксического воздействия как при I, так и при II режиме подачи ГГС составляла 840 мин.

Подачу ГГС осуществляли от мембранной газоразделительной системы аппарата «Борей-М» производства Медико-инженерного центра «НОРТ» НАН Украины в утренние часы (10-12 ч) 28 суток. Работу с лабораторными животными проводили с соблюдением международных принципов Европейской конвенции.

Материалом для исследований были свежесывороточные бедренные кости крыс, сыворотка крови и паренхима печени. В сыворотке крови определяли активность щелочной фосфатазы (ЩФ), концентрацию С-терминальных

пропептидов коллагена I типа (CICP), общую каталитическую активность кислот фосфатазы (КФ) и тартратрезистентную кислотную фосфатазу (ТРКФ), гиалуронидазную активность, концентрацию С-терминальных телопептидов коллагена I типа (в-CrossLaps), пиридинолин, концентрацию гликозаминогликанов (ГАГ), гиалуронидазную активность. В сыворотке крови и КТ методом тонкослойной хроматографии определяли концентрацию липидов.

Для морфологических и морфометрических исследований отбирали образцы ткани печени. Гистологические препараты изготавливали по стандартной методике. Препараты окрашивали обзорными красителями гематоксилином Бемера и эозином, а для визуализации элементов соединительной ткани – методом Ван-Гизона [6]. Морфометрические измерения производили на цифровых изображениях микропрепаратов с помощью компьютерной программы «Image J».

Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 for Windows и программы Microsoft Exel 2010.

Результаты исследований

У 3-мес крыс в сыворотке крови наблюдали повышение активности ЩФ на 54 % после воздействия ГГС I режима. После влияния II режима активность ЩФ в сыворотке крови молодых крыс возросла на 11 % ($P < 0,05$). В КТ только после I режима дыхания ГГС этот показатель увеличился на 10 % ($P < 0,05$) по сравнению с контролем, при II режиме изменения были статистически недостоверны.

У 12-мес крыс в сыворотке крови исходное значение активности ЩФ было на 33 % ниже таковых у 3-мес. После дыхания ГГС в I режиме этот показатель у взрослых крыс практически не изменялся относительно контро-

ля. Однако по сравнению с молодыми животными, мы отметили снижение активности ЩФ на 54 %. После воздействия II режима ГГС наблюдали повышение активности ЩФ на 58 % ($P < 0,05$). То есть II режим гипоксии однонаправленно изменял этот показатель как у молодых, так и у взрослых крыс. В КТ 12-мес животных активность ЩФ снижалась на 53 % ($P < 0,05$) после непрерывного (в течение 30 мин) дыхания ГГС.

У молодых и взрослых крыс наблюдали однонаправленные изменения концентрации С-терминальных телопептидов коллагена I типа (CICP) в сыворотке крови. Однако у 3-мес животных это было достоверное снижение CICP на 8 % и 6 % соответственно при обоих режимах дыхания, тогда как у 12-мес крыс наблюдали лишь тенденцию к его снижению. Исходя из полученных результатов оба режима саногенной гипоксии позитивно влияют на остеобласты и кислород-зависимые механизмы ремоделирования КТ в молодом возрасте. У взрослых животных таких значительных изменений не наблюдали.

У молодых крыс активность КФ в сыворотке крови снижалась только у подвергавшихся прерывистому воздействию ГГС на 15 % ($P < 0,05$). В КТ 3-мес животных обеих исследуемых групп этот показатель достоверно уменьшился на 5 и 9 % соответственно, по сравнению с контрольными значениями. Активность КФ возросла лишь в сыворотке крови взрослых животных на 26 % ($P < 0,05$) после воздействия ГГС I режима. В КТ активность ТРКФ достоверно не изменялась ни в одной из исследованных групп по сравнению с контролем. Вдыхание ГГС в I режиме изменяло активность ТРКФ в сыворотке крови молодых и взрослых животных. У 3-мес крыс наблюдали повышение на 34 % ($P < 0,05$), а у 12-мес, наоборот, достоверное снижение на 45 %.

При моделировании гипоксической среды в I режиме коэффициент ЩФ/КФ у молодых животных в сыворотке крови увеличился на 45 %, а ЩФ/ТРКФ – на 15 %. Соотношение ЩФ/КФ, после воздействия II режима, выросло на 31 %, тогда как ЩФ/ТРКФ – на 4 %. В КТ коэффициент ЩФ/КФ для экспериментальных крыс составлял 14,3 и 14,6 соответственно в условиях подачи I и II режимов ГГС. У взрослых крыс соотношение ЩФ/КФ после влияния I режима ГГС снизилось на 16 %, а в условиях II режима – значительно повысилось (на 87 %) и составило 2,06. Соотношение ЩФ/ТРКФ у 12-мес животных увеличилось на 92 и 91 % соответственно после воздействия I и II режима ГГС. Наблюдали снижение коэффициента ЩФ/КФ в КТ этой возрастной группы на 51 % (I режим) и повышение на 16 % после влияния II режима ГГС.

Исходные значения концентрации ГАГ у молодых крыс были значительно ниже таковых у 12-мес животных. У 12-мес крыс наблюдали достоверное увеличение этого показателя на 26 % после влияния II режима. Гиалуронидазная активность в сыворотке крови молодых крыс, находившихся в условиях I режима ГГС, повышалась на 44 % ($P < 0,05$) относительно контрольных значений. У взрослых крыс она имела лишь тенденцию к росту на 15 % и 23 % соответственно. Исходные значения концентрации пиридинолина в сыворотке крови были несколько выше у молодых животных как в контрольной, так и в экспериментальных группах. У 3-мес крыс вдыхание ГГС (I режим) достоверно повышало концентрацию пиридинолина на 16 %. У 12-мес животных его концентрация практически оставалась в пределах контрольных значений.

Концентрация общих липидов в КТ 3-мес животных достоверно возросла на 24 %, общих фосфолипидов (ФЛ) – на 32 % и общего холестерина (ХС) – на 24 % относительно контроля после

воздействия II режима ГГС. У взрослых крыс в идентичных условиях эксперимента повышалась концентрация общих липидов на 30 % и 38 % после воздействия I и II режимов ГГС соответственно. При непрерывном воздействии ГГС (I режим) в течение 28 суток достоверно повышались общие ФЛ – на 51 %, общий ХС – на 35 % за счет свободного ХС, который увеличился на 98 % по сравнению с контролем. После дыхания 12-мес животных ГГС во II режиме достоверно возросла концентрация общих ФЛ на 55 %, свободного ХС – на 89 %, общего ХС – на 34 %, свободных жирных кислот – на 35 %. Изменения липидных фракций и их распределение в общем пуле липидов у молодых и взрослых, крыс после воздействия нормобарической гипоксии, были однонаправленными, но имели свои особенности. Более выраженными они были у 12-мес животных. Это проявлялось в повышении концентрации как общих липидов, так и их фракций относительно контрольных значений. Такие изменения позволяют предположить, что рост липидных фракций в КТ взрослых крыс способствует повышению уровня ее минерализации. Из литературных данных известно, что с возрастом рост кости и связанная с ним перестройка замедляются, что приводит к повышению доли старой, полностью минерализованной и «неактивной» КТ [7].

Общий анализ совокупных данных позволяет акцентировать внимание на том, что дыхание саногенной ГГС интенсифицирует процессы физиологической регенерации КТ. Степень проявлений этого воздействия зависит от возраста крыс и более отчетливо проявляется у молодых животных. У взрослых крыс большинство показателей ремоделирования КТ достоверно не изменялось. Дозированное снижение P_{O_2} во вдыхаемом воздухе способно активировать потенциальные возможности физиологической регенерации.

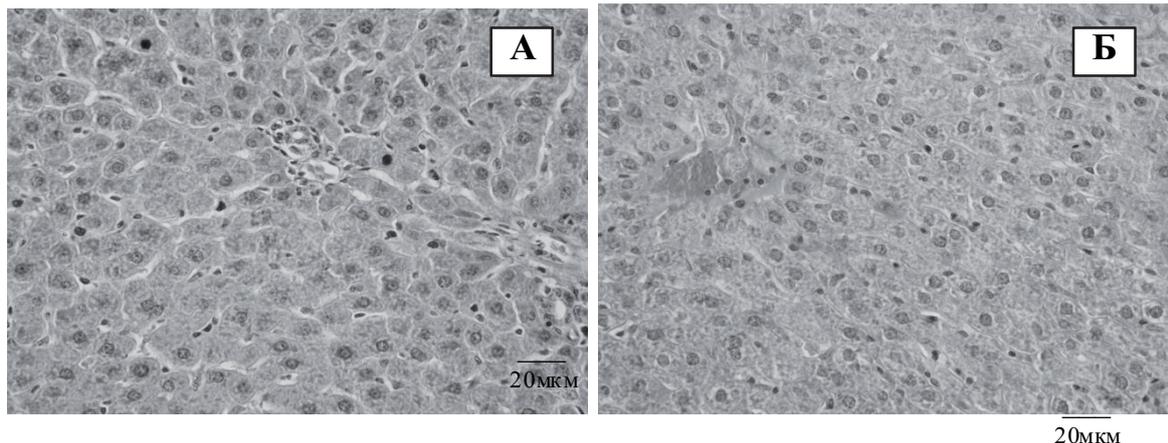


Рис. Микрофотография среза правой доли печени 12-мес интактной крысы (А) и после влияния ГГС (Б). Окраска гематоксилином Бемера и эозином. Увеличение в 400 раз.

При морфологическом анализе гистологических препаратов отмечено, что печень животных обеих подопытных групп имеет неизменную физиологическую структуру. Границы долек слабо выражены, кровеносные сосуды разного кровенаполнения. Гепатоциты типичной формы, среднего размера, с хорошо выраженной мембранной. Цитоплазма умеренно и равномерно окрашена (рис.).

Площадь поперечного сечения гепатоцитов и их цитоплазмы у подопытных крыс не имела достоверных отличий по сравнению с контролем. Ядра округлой формы, средних размеров, с центральным расположением в клетке и сохраненной мембраной. Площадь поперечного сечения ядра гепатоцитов, после влияния ГГС I и II режимов, достоверно возросла лишь у 12-мес животных на 12 % и 10 % соответственно. Также отмечена тенденция к увеличению ядерно-цитоплазматического соотношения. Гипертрофия ядра может быть связана с синтезом белка, нуклеиновых кислот и других компонентов клетки [8]. Мы рассматриваем это как свидетельство активации подготовки гепатоцитов к митозу.

После воздействия ГГС ядрышки гепатоцитов подопытных крыс хорошо визуализируются, среднего размера,

имеют округлую форму и четкие границы. Количество ядрышек (на 100 ядер) в гепатоцитах животных, получавших ГГС I и II режимов, достоверно увеличилось: у 3-мес – на 17 % и 27 %, а в 12-мес – на 18 % и 34 % соответственно, относительно контроля. Как результат этого у подопытных животных отмечено достоверное увеличение ядрышко-ядерного соотношения, что свидетельствует об активации белоксинтетической функции клетки, а также может быть одним из показателей интенсивности физиологической регенерации на внутриклеточном уровне [9].

Отмечено достоверное снижение расстояния между ядрами смежных гепатоцитов у 3- и 12-мес (в большей степени) крыс подопытных групп, что может свидетельствовать об уменьшении количества межклеточной соединительной ткани.

У 3-мес животных, после влияния ГГС II режима, выявлено достоверное увеличение числа двуядерных гепатоцитов на 67 % сравнительно с контролем. Это подтверждает активацию регенерации паренхимы печени на внутриклеточном уровне после воздействия прерывистой нормобарической гипоксии саногенного уровня.

Выводы

1. Периодическое дыхание газовой смесью с умеренно сниженным парциальным давлением кислорода ($P_{O_2} = 76-88$ мм.рт.ст.) при оптимальном соотношении периодов деоксигенации и реоксигенации и дозированной интенсивности гипоксического воздействия может быть одним из биофизических факторов активации процессов физиологической регенерации костной ткани, темпы которой с возрастом уменьшаются.
2. Из двух исследованных режимов гипоксической активации метаболизма костной ткани, максимально благоприятным для молодых животных является дозированная кислородная депривация, имеющая наибольшее количество циклов деоксигенации/ реоксигенации (II режим). Для взрослых крыс благоприятные результаты получены при применении режима, при котором ГГС подавали 30 мин непрерывно (I режим).
3. Дозированная нормобарическая гипоксия обладает стимулирующим эффектом на физиологическую регенерацию паренхимы печени, синтетическую и функциональную активность гепатоцитов. Позитивное влияние ГГС более выражено у 12-мес крыс.

Литература

1. Подвысоцкий В.В. Возрождение печеночной ткани у млекопитающих животных. — Киев, 1886. — 123 с.
2. Liozner L.D. The physiological regeneration of the mammalian liver / L.D. Liozner, V.F. Sidorova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 1959, V. 48., № 6. — P. 1532-1535.
3. Літовка І.Г. Кісткова тканина в умовах дефіциту навантаження. — К.: ДП «Інформаційно-аналітичне агенство», 2011. — 243 с.
4. Литовка И.Г., Березовский В.А. Органический матрикс в адаптации и remodelировании костной ткани. — Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2014. — 256 с.

5. Yanko R.V. Physiological regeneration and functional activity of hepatocytes at normobaric hypoxia / R.V. Yanko // International Journal of Physiology and Pathophysiology. — 2011. — V.2., № 1. — P. 35-42.
6. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. — СПб. СпецЛит. 2010. — 95 с.
7. Прохончуков А.А., Жижина Н.А., Тигрян Р.А. Гомеостаз костной ткани в норме и при экстремальном воздействии / Под ред. П.Д.Горизонтова. М.: Наука, 1984. — 200 с.
8. Zimmermann A. Liver regeneration: the emerge of new pathways / A. Zimmermann // Med. Sci. Monit. — 2004. — V. 8. — P. 53-63.
9. Liver regeneration / L.G. Koniaris, I.H. McKillop, S.I. Schwartz [et. all] // Journal of the American College of Surgeons. — 2003. — V. 197, № 4. — P. 634-659.

References

1. Podvysotsky V.V. Restoration of hepatic tissue in a mammal. — Kiev, 1886. — 123 p.
2. Liozner L.D. The physiological regeneration of the mammalian liver / L.D. Liozner, V.F. Sidorova // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 1959, V. 48., № 6. — P. 1532-1535.
3. Litovka I.G. Bone tissue in the deficit burden. — K.: SE "Information-analytical agency", 2011. — 243 p.
4. Litovka I.G., Berezovsky V.A. The organic matrix adaptation and bone remodeling. — Donetsk: Publisher Zaslavsky A., 2014. — 256 p.
5. Yanko R.V. Physiological regeneration and functional activity of hepatocytes at normobaric hypoxia / R.V. Yanko // International Journal of Physiology and Pathophysiology. — 2011. — V.2., № 1. — P. 35-42.
6. Korzhevsky D.E., Gilyarov A.V. Fundamentals of histological techniques. — SPb. SpetsLit. 2010. — 95 p.
7. Prohonchukov A.A., Zhizhina N.A., Tigranian R.A. Bone homeostasis in normal and extreme conditions / Ed. P.D. Gorizontova. M.: Nauka, 1984 — 200 p.
8. Zimmermann A. Liver regeneration: the emerge of new pathways / A. Zimmermann // Med. Sci. Monit. — 2004. — V. 8. — P. 53 — 63.

9. Liver regeneration / L.G. Koniaris, I.H. McKillop, S.I. Schwartz [et. all] // Journal of the American College of Surgeons. – 2003. – V. 197, № 4. – P. 634 – 659.

Резюме

**ФІЗІОЛОГІЧНА РЕГЕНЕРАЦІЯ ТКАНИН
В УМОВАХ ДОЗОВАНОЇ
НОРМОБАРИЧНОЇ ГІПОКСІЇ**

*Березовський В.А., Літовка І.Г.,
Янко Р.В.*

Досліджували фізіологічну регенерацію тканин в умовах дозованої гіпоксичної газової суміші на 72 щурах-самцях лінії Wistar різного віку. Виявлено, що дозоване зниження PO_2 в повітрі здатне активувати потенційні можливості фізіологічної регенерації тих елементів кісткової тканини, які відповідають за процеси ремоделювання. Дозована нормобарична гіпоксія має стимулюючий ефект на фізіологічну регенерацію, синтетичну і функціональну активність паренхіми печінки.

Ключові слова: фізіологічна регенерація, нормобарична гіпоксія, кісткова тканина, печінка.

Summary
**PHYSIOLOGICAL TISSUE
REGENERATION IN CONDITIONS OF
NORMOBARIC HYPOXIA**

*Berezovsky V.A., Litovka I.G.,
Yanko R.V.*

It was studied the physiological regeneration of tissues in conditions of hypoxic gas mixtures dosage of 72 male Wistar rats of different age. It was revealed that dosage reduction of PO_2 in the inhaled air which is capable to activate the potential physiological regeneration of the bone elements that are responsible for remodeling. Dosage normobaric hypoxia has a stimulating effect on the physiological regeneration, synthetic and functional activity of the liver parenchyma.

Keywords: physiological regeneration, normobaric hypoxia, bone and liver.

*Впервые поступила в редакцию 17.04.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании
редакционной коллегии после рецензирования*

УДК: [615.217.34+615.27]:616.311-002

**АНТИСТРЕССОВАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОЦЕТАМА В АДАПТАЦИИ
ОРГАНИЗМА К ВОСПАЛЕНИЮ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ
ПОЛОСТИ РТА**

Киричек Л.Т., Кальчук Р.О.

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков

На основании полученных в эксперименте данных о коррекции тиоцетамом функционального состояния слизистой оболочки полости рта в условиях сочетанного моделирования воспаления и иммобилизации, а также восстановления показателей нейрогормональной и метаболической регуляции функций центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, сделан вывод о наличии у тиоцетама адаптогенного действия, обусловленного его антистрессовыми и антиоксидантными свойствами.

Ключевые слова: воспаление; адаптация; слизистая оболочка полости рта; иммобилизационный стресс; тиоцетам; антиоксидантная защита.

Вступление

Воспаление слизистой оболочки полости рта (СОПР) широко распространено во всем мире [1, 2]. Главное

значение в этом процессе большинство авторов придают действию разнообразных локальных факторов, среди которых преобладает бактериальная флора