

Сведения об авторах:

Батурина Мария Владимировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической фармакологии с курсом ДПО; тел.: (8652)713466; e-mail: nimdark@mail.ru

Бейер Эдуард Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии, заведующий лабораторией фармакологии; тел.: (8652)354881; e-mail: karokris@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-3248-6212>

Батурин Владимир Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии с курсом ДПО, директор научно-инновационного объединения; тел.: (8652)713466; e-mail: v_baturin@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-6892-3552>

Попов Алексей Викторович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии, тел.: (8652)354881; e-mail: popov2003@bk.ru

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.75:612.017.2

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15074>

ISSN – 2073-8137

МИНЕРАЛЬНАЯ ПЛОТНОСТЬ КОСТИ САМОК КРЫС В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К МОДЕЛИРУЕМОЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

Н. Г. Беляев, И. В. Ржепаковский, С. И. Писков, В. В. Плюйко

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Российская Федерация

BONE MINERAL DENSITY OF FEMALE RATS IN THE PROCESS OF ADAPTATION TO SIMULATED DURATIVE INTERMITTENT HYPOBARIC HYPOXIA

Belyaev N. G., Rzhepakovsky I. V., Piskov S. I., Plyuiko V. V.

North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russian Federation

Представлена оценка минеральной плотности бедренной кости методом рентгеновской компьютерной микромографии и показателей адаптивных процессов самок крыс при моделировании хронической прерывистой гипобарической гипоксии. Увеличение массы сердца и надпочечников, повышение количества эритроцитов и гемоглобина явились маркерами компенсаторных процессов. Полученные результаты указывают на то, что длительное прерывистое воздействие гипобарической гипоксии как в условиях жесткой адаптации, так и с постепенным наращиванием стресс-фактора служит фактором, способствующим остеопоротическим изменениям в костной ткани.

Ключевые слова: гипоксическая гипоксия, гипобарическая хроническая гипоксия, минеральная плотность костной ткани, самки крыс, адаптация

The estimation of femoral mineral density by X-ray computer microtomography and indicators of adaptive processes in female rats in the simulation of chronic intermittent hypobaric hypoxia is presented. An increase in heart and adrenal mass, an increase in the number of red blood cells and hemoglobin were markers of compensatory processes. The obtained results indicate that long-term intermittent exposure to hypobaric hypoxia, both in conditions of severe adaptation, and with a gradual build-up of the stress factor, can lead to osteoporotic changes in the bone tissue.

Keywords: hypoxic hypoxia, chronic hypobaric hypoxia, bone mineral density, female rats, adaptation

Для цитирования: Беляев Н. Г., Ржепаковский И. В., Писков С. И., Плюйко В. В. МИНЕРАЛЬНАЯ ПЛОТНОСТЬ КОСТИ САМОК КРЫС В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К МОДЕЛИРУЕМОЙ ДЛИТЕЛЬНОЙ ПРЕРЫВИСТОЙ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2020;15(3):311-314.

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15074>

For citation: Belyaev N. G., Rzhepakovsky I. V., Piskov S. I., Plyuiko V. V. BONE MINERAL DENSITY OF FEMALE RATS IN THE PROCESS OF ADAPTATION TO SIMULATED DURATIVE INTERMITTENT HYPOBARIC HYPOXIA. *Medical News of North Caucasus*. 2020;15(3):311-314. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15074> (In Russ.)

BMD – значение минеральной плотности

Исследование механизмов гипоксических повреждений, их профилактики актуально для широкого круга специалистов. Гипоксическая гипоксия, вызванная снижением парциаль-

ного давления кислорода во вдыхаемом воздухе, широко используется при адаптации, для повышения функциональных резервов организма, для лечения некоторых заболеваний [1–3]. Результа-

ты ее исследования используются во многих сферах человеческой деятельности: космос, стратосфера, высокогорье, районы полюсов земли с уменьшенной плотностью атмосферы, подводные аппараты и др.

Несмотря на большое количество исследований, касающихся гипоксии, знания о механизмах действия гипобарической гипоксии на минеральный обмен и минеральную плотность костной ткани довольно ограничены [4, 5]. Особую ценность могут представлять данные о влиянии гипоксии на женский организм, поскольку с возрастом увеличивается количество факторов риска нарушений минерального обмена в костной ткани.

Цель исследования – оценить влияние моделируемой хронической прерывистой гипобарической гипоксии на минеральную плотность бедренной кости и показатели адаптивных процессов самок крыс.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на самках крыс линии Вистар в возрасте 4 месяцев. Крысы были разделены на три группы – контрольную (К) и опытные (О-1; О-2) по 12 животных в группе. Самки крыс опытных групп подвергались моделируемой гипобарической гипоксии. С этой целью их на протяжении 28 дней помещали в барокамеру 6 дней в неделю с перерывом на 7-й день. Животных группы О-1 помещали в барокамеру при неизменной величине атмосферного давления в 0,55 атм, что соответствует высоте около 4800 метров над уровнем моря. Время воздействия гипоксии начиналось с 20 минут и увеличивалось каждый последующий день на 20 минут в течение 5 дней, а с 8-го по 28-й день составляло 3 часа (жесткий режим адаптации).

Формирование адаптации к гипоксии у животных О-2 осуществлялось в мягком режиме. Первая неделя: с 1-го по 6-й день время воздействия постепенно увеличивалось с 1 до 20 минут, давление постепенно уменьшалось с 0,86 до 0,75 атм. Вторая неделя: с 1-го по 6-й день время увеличивалось с 20 до 40 мин, давление уменьшалось с 0,75 до 0,61 атм. Третья неделя: время с 40 до 120 минут, давление – с 0,61 до 0,55 атм – 6 дней. С 23-го по 28-й день воздействие в течение 3 часов при давлении 0,55 атм.

В конце 7, 14, 21, 28-го дня эксперимента животных взвешивали и осуществляли забор крови из хвостовой вены для определения количества эритроцитов, уровня гемоглобина и концентрации общего кальция.

При подсчете эритроцитов использовали камеру Горяева, для определения гемоглобина – гемометр Сали. Концентрация общего кальция определялась колориметрическим методом с использованием набора «Кальций-2-Ольвенкс». На 28-й день у животных под эфирным наркозом осуществляли тотальный забор крови с последующим умерщвлением. При вскрытии у животных производили взятие надпочечников и сердца для определения их массы.

Оценка минеральной плотности и архитектуры костной ткани осуществлялась методом рентгеновской компьютерной микротомографии (микро-КТ) с использованием микротомографа SkyScan 1176 (Bruker-microCT, Бельгия). Зоной интереса рентгеновского сканирования выступали дистальный метафиз и диафиз бедренной кости.

Протокол сканирования в программе Skyscan 1176 (10.0.0.0, Bruker-microCT, Бельгия) для бедренных костей крыс: ускоряющее напряжение источника рентгеновского излучения 80 кВ, ток источника рентгеновского излучения 300 мкА, фильтр Cu+Al, размер пикселя 17,74 мкм, томографическое вращение 180°, шаг съемки 0,3°, усреднение по 3 кадрам.

Микротомографические изображения бедренных костей крыс реконструировали с помощью программного обеспечения Nrecon (1.7.4.2, Bruker-microCT, Бельгия). Ориентация в пространстве (x, y, z) и выделение отдельных областей реконструированных материалов проводились в программе DataViewer (1.5.6.2, Bruker-microCT, Бельгия). Анализ микротомографических данных костей проводился посредством программного обеспечения СТАп (1.18.4.0, Bruker-microCT, Бельгия). Результаты документировали микро-КТ снимками в формате 3D-изображений в программе CTVox (33.3.0r1403, Bruker-microCT, Бельгия).

Результаты экспериментов подверглись вариационно-статистической обработке с помощью программ «Biostat» (version 4.03) и «Statistics for Windows» v.6.0. Применялся t-критерий Стьюдента (при нормальном распределении переменных) и критерий Манна – Уитни (в случае отсутствия согласия данных с нормальным распределением). Полученные данные регистрировали в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего арифметического ($M \pm m$). О достоверности различий величин исследуемых показателей судили при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. По мере проведения эксперимента регистрировалось снижение массы тела животных группы О-1: с 229,5 \pm 13,8 г на начало эксперимента до 213,9 \pm 8,9 г к его окончанию ($p < 0,05$), и увеличение в группе О-2, где значения были недостоверны. У животных контрольной группы прирост массы тела был высоко достоверным: с 227,1 \pm 8,7 г на начало эксперимента до 259,4 \pm 4,5 г к его окончанию ($p < 0,05$). Невысокие темпы прибавки массы тела группы О-2 и, тем более, снижение веса в группе О-1, возможно, обусловлено аноректическим эффектом гипоксии [6] и является свидетельством реакции организма на высотную гипоксию как на стресс-фактор. Подтверждением является увеличение массы надпочечников у животных группы О-1 на 71,4 %, а О-2 – на 38,1 % ($p < 0,05$).

Недостаточное содержание кислорода во вдыхаемом воздухе повлекло классические адаптивные изменения. Прежде всего, повышение количества эритроцитов в обеих группах на 7-й день наблюдений. Но данное увеличение количества красных кровяных телец обеспечено выходом их из депо – ложный эритроцитоз. Высокозначимый прирост количества эритроцитов фиксировался на 21-й и 28-й дни эксперимента. В группе О-1 количество эритроцитов с 5,20 \pm 0,12 $\times 10^{12}$ /л на начало эксперимента повысилось до 7,38 \pm 0,21 $\times 10^{12}$ /л к 21-му дню ($p < 0,05$) и до 7,87 \pm 0,12 $\times 10^{12}$ /л к моменту окончания эксперимента ($p < 0,05$). У животных группы О-2 на 21-й и 28-й дни количество эритроцитов составило – 6,72 \pm 0,34 $\times 10^{12}$ /л и 7,14 \pm 0,18 $\times 10^{12}$ /л соответственно ($p < 0,05$). Достоверная динамика наблюдалась и при определении уровня гемоглобина. Повышение количества эритроцитов и гемоглобина на 21-й день эксперимента, несомненно, связано с увеличением кроветворной функции красного костного мозга.

Масса сердца животных групп О-1 и О-2 возросла к моменту окончания эксперимента на 62,4 и 38,4 % соответственно ($p < 0,05$), что свидетельствует в пользу выраженных адаптивных перестроек организма, связанных со снабжением систем организма кислородом, что соотносится с литературными данными [7, 8]. Но в условиях жесткой модели адаптации эти изменения более значительны.

Уровень кальция в организме животных группы О-1 к 7-му дню эксперимента возрос с

2,10±0,09 ммоль/л на начало эксперимента до 2,94±0,51 ммоль/л ($p < 0,05$). К 14-му дню гиперкальциемия составила 3,20±0,23 ммоль/л ($p < 0,05$), а на 21-й день отмечено снижение уровня кальция до 2,80±0,02 ммоль/л, и к моменту окончания эксперимента его концентрация не имела достоверных отличий от величин, определяемых в крови животных контрольной группы – 2,23±0,13 и 2,10±0,21 ммоль/л соответственно. В группе O-2 гиперкальциемия была менее выражена.

Исходя как из непосредственного, так и опосредованного участия кальция в протекании практически всех физиологических процессов, следует предположить, что возникающая гиперкальциемия является фактором, способствующим активированию адаптивных перестроек в организме. Если биологическая целесообразность гиперкальциемии при действии любого стрессирующего фактора является доказанным фактом, то ее роль в создании основного депо кальция – кости – остается недостаточно изученной.

Согласно результатам рентгеновской микротомографии бедренные кости крыс опытных групп характеризовались низкими величинами трабекулярной минеральной плотности (BMD). Средние значения данного показателя у животных выборок O-1 и O-2 достоверно в 3,5 и 2,1 раза соответственно отставали от такового контрольной группы (рис. 1).

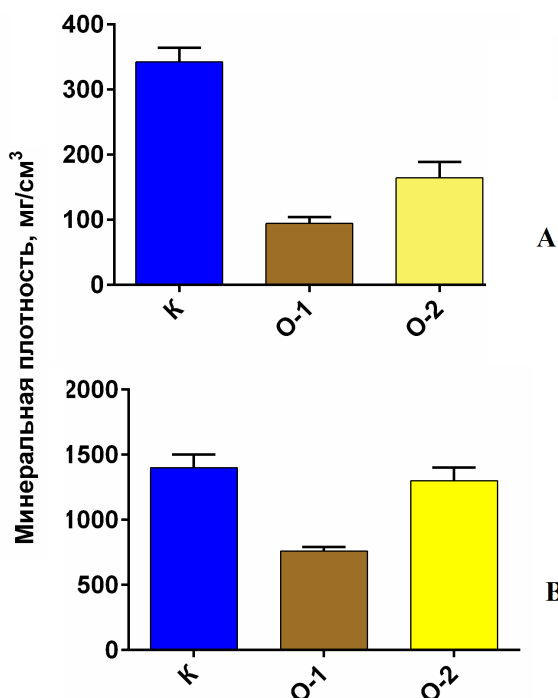


Рис. 1. Минеральная плотность (BMD) бедренной кости белых крыс: А – трабекулярная BMD; В – кортикальная BMD

Наиболее статистически выраженными изменениями величины кортикальной BMD характеризовались животные O-1. У них среднее значение кортикальной BMD оказалось в 1,8 раза ниже контрольного ($p < 0,05$). В группе O-2 этот показатель не претерпел достоверно значимых изменений.

На трехмерных микротомографических изображениях у животных группы O-2 в губчатой костной ткани метафиза бедренной кости отмечалось уменьшение числа костных трабекул, которые у крыс контрольной выборки формировали густопетлистую сеть костных пластин (рис. 2А).

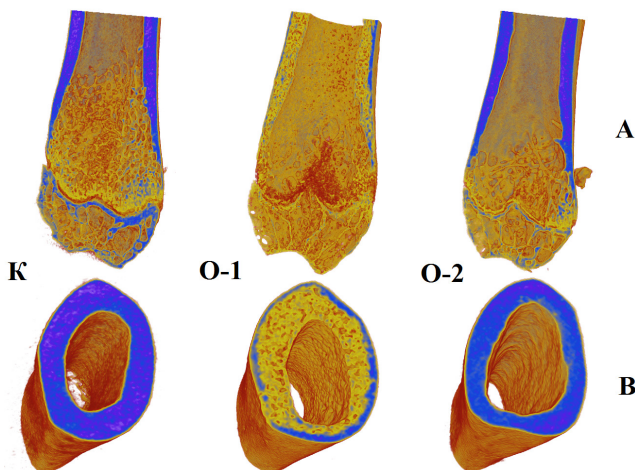


Рис. 2. Трехмерные микротомографические изображения бедренной кости крыс: А – продольный срез дистального метафиза и эпифиза; В – поперечный срез диафиза

Костные трабекулы у животных O-2 утратили свою нормальную архитектуру и выглядели как отдельные костные участки, разделенные расширенными межтрабекулярными пространствами. В группе животных O-1 изменения качества кости оказались более выражены и характеризовались потерей костных пластин и почти полным отсутствием трабекулярных связей.

Согласно микротомограммам в контрольной группе диафиз бедренной кости крыс характеризовался хорошо организованной компактной костной тканью (рис. 2В).

В выборке O-2 структура диафиза бедренной кости имела сходную картину с таковой у животных контроля и сопровождалась некоторым уменьшением толщины стенки кости. В группе O-1 изменения качества компактной кости характеризовались высокой пористостью и потерей костной массы.

Количественные параметры трабекулярной микроархитектуры, полученные с помощью трехмерного микро-КТ анализа группы O-1 и O-2 характеризовались достоверным уменьшением величины объемной доли трабекулярной кости (BV/TV, %) и количества трабекул (Tb.N) и в то же время ростом показателей трабекулярного разделения (Tb.Sp) и структурного модельного индекса (SMI) (табл.). Это согласно ряду данных указывает на развитие у животных изменений остеопоротического характера [9], максимальной выраженностью которых проявилась группа O-1.

Таблица
Количественные микро-КТ параметры трабекулярной части метафиза бедренной кости крыс (M±m)

Параметры	Группы		
	К	O-1	O-2
BV/TV (%)	23,10±0,59	5,9±0,41*	10,6±0,30*#
Tb.Th (µm)	101,89±4,09	127,67±4,19*	122,41±6,10*
Tb.Sp (µm)	0,59±0,02	2,15±0,05*	1,37±0,04*#
Tb.N (1/mm)	2,32±0,09	0,46±0,02*	0,86±0,04*#
Tb.Pf (1/mm)	2,61±0,11	5,49±0,14*	8,15±0,21*#
SMI	0,95±0,06	1,13±0,03*	1,53±0,04*#

Примечание: BV/TV – объемная доля трабекулярной кости; Tb.Th – средняя толщина трабекул; Tb.Sp – среднее распределение трабекул; Tb.N – количество трабекул; Tb.Pf – коэффициент трабекулярности; SMI – структурный модельный индекс; * – $p < 0,05$ статистически значимые различия по отношению к группе К; # – $p < 0,05$ статистически значимые различия по отношению к группе O-1.

Потеря костной массы в группах О-1 и О-2 происходила как за счет уменьшения толщины трабекул, так и за счет перфораций трабекулярной структуры. Это подтверждается достоверно высокими по сравнению с контролем средними величинами толщины трабекул (Tb.Th) и коэффициента трабекулярности (Tb.Pf), количественно отражающего связность костных структур. При этом отсутствующие статистические различия между группами О-1 и О-2 в значениях Tb.Th указывают на то, что более выраженная потеря костной ткани у крыс группы О-1, нежели у животных выборки О-2, происходила главным образом за счет потери трабекулярной связи, а не истончения костных пластин.

Заключение. Снижение минеральной плотности кости с появлением изменений, характеризующихся как остеопоротические явления при воздействии моделируемой гипобарической прерывистой гипоксии, свидетельствует в пользу того, что метод жесткой адаптации к гипоксии – фактор риска ремоделирования костной ткани.

Литература/References

1. Dempsey J. A., Morgan B. J. Humans In Hypoxia: A Conspiracy Of Maladaptation?! *Physiology (Bethesda)*. 2015;30(4):304-316. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2015>
2. Martinez-Bello V. E., Sanchis-Gomar F., Nascimben A. L., Pallardo F. V., Ibañez-Sania S. [et al.]. Living at high altitude in combination with sea-level sprint training increases hematological parameters but does not improve performance in rats. *European Journal of Applied Physiology*. 2010;111(6):1147-1156. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1740-z>
3. Ekström M., Ringbaek T. Which patients with moderate hypoxemia benefit from long-term oxygen therapy? Ways forward. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2018;13:231-235. <https://doi.org/10.2147/COPD.S148673>
4. Johnson R. W., Sowder M. E., Giaccia A. J. Hypoxia and Bone Metastatic Disease. *Current Osteoporosis Reports*. 2017;15(4):231-238. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0378-8>
5. Yellowley C. E., Genetos D. C. Hypoxia Signaling in the Skeleton: Implications for Bone Health. *Current Osteoporosis Reports*. 2019;17(1):26-35. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00500-6>

Информированное согласие: Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434–2009), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

6. Caris A., Santos R. V. T. Performance and altitude: is there anything that nutrition can do for it? *Nutrition*. 2019;60:35-40. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.09.030>
7. Stembridge Mike, Benjamin D. Levine. No heartbreak at high altitude; preserved cardiac function in chronic hypoxia. *Experimental Physiology*. 2019;104(5):619-620. <https://doi.org/10.1113/EP087665>
8. Stewart G. M., Wheatley-Guy C. M., Morris N. R., Cofman K. E., Stepanek J. [et al.]. Myocardial adaptability in young and older-aged sea-level habitants sojourning at Mt Kilimanjaro: are cardiac compensatory limits reached in older trekkers?. *European Journal of Applied Physiology*. 2020;120:799-809. <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04319-3>
9. Boussein M. L., Boyd S. K., Christiansen B. A., Goldberg R. E., Jepsen K. J., Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010;25(7):1468-1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>

Сведения об авторах:

Беляев Николай Георгиевич, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биомедицины и физиологии института живых систем; тел.: 89034411854; e-mail: belyaev_nikolay@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0003-1751-1053>

Ржепаковский Игорь Владимирович, кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии; тел.: 89054164981; e-mail: 78igorr@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-2632-8923>

Писков Сергей Иванович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; тел.: 89054191482; e-mail: piskovsi77@mail.ru; <http://orcid.org/0000-0002-5558-5486>

Плюйко Вера Вадимовна, студентка; тел.: 89283006568; e-mail: veraavant2503@yandex.ru