

УДК 59

С.Н. Луканина, А.В. Сахаров,
А.Е. Просенко, Н.А. Аношина, Л.Н. Букреева

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА КАЛЬЦИЯ В КИШЕЧНИКЕ И КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС ПРИ ГЛЮКОКОРТИКОИД-ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Установлено, что в условиях глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса происходит нарушение транспорта Ca^{2+} в тонком и толстом кишечнике крыс, а также снижение содержания данного катиона в костной ткани. Обнаруженные изменения в органах и тканях в значительной степени происходят под действием активных кислородных метаболитов.

Ключевые слова: окислительный стресс, активные кислородные метаболиты, обмен Ca^{2+} , кишечник, костная ткань.

S.N. Lukanina, A.V. Sakharov,
A.E. Prosenko, N.A. Anoshina, L.N. Bukreeva

CALCIUM METABOLISM PECULIARITIES IN RAT INTESTINE AND BONE TISSUE IN THE GLUCOCORTICOID-INDUCED OXIDATIVE STRESS

It is determined that Ca^{2+} transfer disorder in rat small and large intestines as well as this cation availability reduction in the bone tissue occurs under the glucocorticoid-induced oxidative stress. The revealed changes in the organs and tissues occur to a great degree under the active oxygen metabolite action.

Key words: oxidative stress, active oxygen metabolites, Ca^{2+} metabolism, intestine, bone tissue.

Кальций является одним из структурных компонентов костной ткани, играющих важную роль в процессе минерализации костного матрикса, механизмах мышечного сокращения и внутриклеточной передаче сигналов. В этой связи у позвоночных животных в процессе эволюции возникла сложная система, обеспечивающая поддержание постоянства концентрации Ca^{2+} в плазме крови [2]. Считается, что нарушение одного или нескольких звеньев этой системы, в том числе прямое повреждение клеток эпителия слизистой оболочки кишечника и нефроцитов почек глюкокортикоидами при стрессе приводит к развитию остеопороза [4, 7]. В публикациях, посвященных изучению механизмов развития остеопороза при стрессе, указывается на ингибирование глюкокортикоидами активности остеобластов и угнетение всасывания Ca^{2+} в кишечнике [1, 10]. Вместе с тем, в [6, 9] авторы отмечают важную роль свободнорадикальных процессов при повышенном содержании в крови глюкокортикоидов в развитии остеопороза. Значение свободнорадикальных механизмов в регуляции минерального обмена, процессов моделирования и ремоделирования костной ткани остается недостаточно изученным.

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса на особенности транспорта Ca^{2+} в кишечнике и его содержание в костной ткани крыс.

Материал и методы исследования. Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар весом 250–300 г. Животные содержались в условиях вивария без ограничения доступа к корму и воде. Все манипуляции с крысами осуществляли в соответствии с международными принципами Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и решением Этического комитета (протокол заседания № 7 от 2010 г.). В соответствии с дизайном эксперимента животные были распределены на 4 группы: интактная, контрольная и две опытные (по 15 особей в каждой). У крыс всех групп воспроизводили модель окислительного стресса путем внутривенного введения один раз в сутки синтетического глюкокортикоида преднизолона в дозе 50 мг/кг веса, содержащегося в 2 мл водопроводной воды, в течение 14 суток [3]. Через три часа после

перорального введения преднизолона животные первой опытной группы внутрижелудочно получали водопроводную воду в объеме 0,2 мл, крысы второй опытной группы – антиоксидант тиофан (100 мг/кг веса), растворенный в 0,2 мл растительного масла. В связи с тем, что тиофан растворяли в растительном масле, крысам контрольной группы после приема преднизолона внутрижелудочно вводили только растительное масло в объеме 0,2 мл.

Особенности транспорта ионов Ca^{2+} через структуры слизистой оболочки органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) крыс исследовали методом перфузии кишечника *in vivo* [12] на 15 сутки эксперимента. У крыс под эфирным наркозом производили ляпаротомию по белой линии живота и выделяли участки соответствующих отделов кишечника для перфузии. Подготовленный участок тощей кишки и дистального отдела толстого кишечника (ДОТК) перфузировали теплой минеральной водой «Ессенуки-17» с помощью микронасоса («Radelkis», Budapest) в течение 20 мин при скорости 15 мл/ч.

После перфузии кишечника у крыс всех групп прижизненно забирали пробы крови из нижней полой вены *ex tempore*, а затем выводили из эксперимента путем передозировки ингаляционного наркоза. Для изучения содержания Ca^{2+} в костной ткани у животных всех групп забирали тела позвонков грудного отдела позвоночного столба.

Для оценки соотношения секреторных и абсорбционных процессов в кишечнике рассчитывали изменение содержания ионов Ca^{2+} в перфузате на единицу массы высушенного образца перфузируемого участка тонкого кишечника и ДОТК. Расчет проводили по следующей формуле: $\Delta C_{\text{Ca}^{2+}} = (\Delta C \cdot 1000) / m$, где $\Delta C_{\text{Ca}^{2+}}$ – изменение содержания ионов (мкг/1 г с.в.); m – масса высушенного перфузируемого участка кишечника (мг), 1000 – переводной коэффициент; ΔC – разница в содержании ионов в перфузате и во вводимом растворе, рассчитываемая по формуле $(C \cdot [\text{Ca}^{2+}] - C_1 \cdot [\text{Ca}^{2+}]_1)$, где C и C_1 – объем перфузата и вводимого раствора (мл); $[\text{Ca}^{2+}]$ и $[\text{Ca}^{2+}]_1$ – концентрация ионов кальция в перфузате и во вводимом растворе (мкг/мл).

В пробах перфузата, плазмы крови и костной ткани тел позвонков определяли содержание ионов Ca^{2+} методом атомно-эмиссионного анализа с индуктивно связанной плазмой (спектрометр «ОПТИМА», шифр методики КХА: МУК 4.1.1482-03).

Математическую обработку результатов осуществляли методами вариационной статистики. Достоверность отличий между показателями определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение. В сериях предшествующих экспериментальных исследований по изучению механизмов окислительного стресса [8, 11] нами было установлено, что в условиях хронической глюкокортикоидной нагрузки у крыс в плазме крови увеличивается по сравнению с контролем уровень свободнорадикального перекисного окисления липидов (СПОЛ) и отмечается депрессия системы антиоксидантной защиты. Использование антиоксиданта тиофана приводило к статистически достоверному снижению показателей окислительного стресса в образцах крови, гомогенатах тканей кишечника, а также коррекции структурно-функциональных нарушений костной ткани у экспериментальных животных. Полученные результаты явились основанием считать повышение активности свободнорадикальных процессов в организме лабораторных животных одним из важных механизмов в повреждении клеток слизистой оболочки кишечника и нарушении транспорта Ca^{2+} в его соответствующих отделах. Для доказательства влияния активных кислородных метаболитов (АКМ) на функциональную активность тонкого и дистального отдела толстого кишечника крыс при моделировании глюкокортикоид-индуцированного окислительного стресса (ОС) исследовали особенности транспорта Ca^{2+} в данных отделах кишечника. Возможность управления свободнорадикальными процессами в организме животных оценивали при сочетанном использовании в данной модели остеопороза антиоксиданта тиофана.

Анализ полученных результатов показал, что у крыс всех групп в тонком и толстом кишечнике транспорт Ca^{2+} осуществляется преимущественно за счет его абсорбции (рис. 1 а, б). Согласно полученным результатам, абсорбция данного катиона в тонком отделе кишечника крыс интактной группы преобладает по сравнению с толстым на 24,5%. В группе животных с моделью остеопороза интенсивность абсорбции Ca^{2+} в тонком кишечнике крыс к 14 суткам наблюдения снижается в 2,7 раза, а в ДОТК абсорбция этого катиона превышает значения крыс интактной группы в 2,5 раза. Схожая закономерность в отношении транспорта Ca^{2+} в обоих отделах кишечника наблюдается и у крыс контрольной группы. Известно, что тонкий отдел кишечника является основным компартментом желудочно-кишечного тракта, обеспечивающим поступление Ca^{2+} в организм за счет активного транспорта. Обнаруженное нами снижение интенсивности абсорбции этого катиона в данном отделе кишечника при глюкокортикоидной нагрузке согласуется с литературными данными [5, 13, 14] и связывается авторами не с прямым действием глюкокортикоидов на эпителиоциты кишечника, а опосредованно через механизм повреждения специфических транспортных систем плазматической мембраны энтероцитов активными кислородными метаболитами (АКМ). Считается, что всасывание

Ca^{2+} в толстом кишечнике осуществляется главным образом пассивно, через специализированные белковые каналы. Перераспределение функций между тонким и толстым кишечником в отношении транспорта Ca^{2+} при глюкокортикоид-индуцированном ОС, а именно более, чем двукратным повышением интенсивности его абсорбции в толстом отделе, с нашей точки зрения, может объясняться более выраженным повреждением данного отдела кишечника АКМ. Как известно, процесс пищеварения сопровождается окислением органических соединений, в том числе с участием АКМ. В этой связи участие энтероцитов в ограничении СПОЛ за счет активации собственных антиоксидантных систем является необходимым условием их функционирования и защиты от летального повреждения. Толстый отдел кишечника эволюционно не приспособлен к пищеварению. В этой связи можно полагать, что адаптационные возможности колоноцитов к действию АКМ уступают энтероцитам, что определяет их более низкую устойчивость к повреждениям при ОС. В связи с тем, что толстый кишечник не является основным участком всасывания Ca^{2+} , его избыточное поступление является неадекватным для клеток и может запускать механизм активации Ca -зависимых протео- и липолитических процессов в клетке. Считается, что повышение активности деградации белков и липидов в клетке сопровождается повышением уровня СПОЛ и в условиях снижения активности системы антиоксидантной защиты приводит к свободнорадикальному повреждению колоноцитов.

Использование антиоксиданта тиофана для оптимизации СПОЛ при глюкокортикоид-индуцированном ОС позволило увеличить уровень абсорбции Ca^{2+} в тонком кишечнике и, как следствие, снизить на 64,4% содержание данного катиона в перфузате по сравнению с аналогичными показателями крыс первой опытной группы (рис. 1, а). При анализе проб перфузата толстого кишечника установлено снижение уровня абсорбции Ca^{2+} по сравнению с образцами крыс первой опытной группы на 40,1% (рис. 1, б). Отсутствие достоверных различий по содержанию Ca^{2+} в перфузате крыс второй опытной и интактной групп доказывает преобладание свободнорадикального механизма повреждения клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта по сравнению с прямым действием глюкокортикоидов. Полученные результаты позволяют считать обоснованным использование антиоксиданта тиофана для коррекции нарушений транспорта Ca^{2+} в кишечнике крыс при ОС.

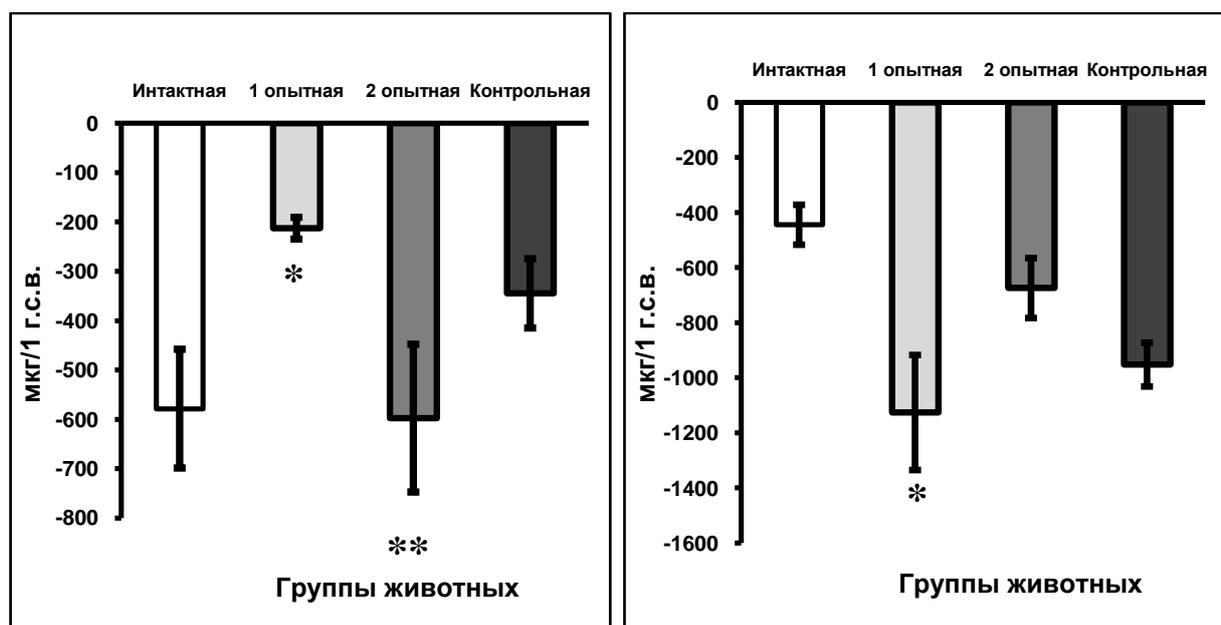


Рис. 1. Содержание Ca^{2+} в перфузате тонкого (А) и толстого (Б) кишечника, мкг/1г с.в.:

* отличие показателей крыс 1-й опытной группы от значений интактных крыс;

** различия показателей животных 1-й и 2-й опытных групп ($p \leq 0,05$)

В соответствии с классическими представлениями физиологии, транспорт элементов в организм из ЖКТ осуществляется преимущественно через кровь. В этой связи нарушение абсорбции Ca^{2+} в кишечнике крыс 1-й опытной группы и оптимизация данного процесса под влиянием антиоксиданта тиофана должны подтверждаться анализом содержания Ca^{2+} в плазме крови животных исследуемых групп. При исследовании содержания Ca^{2+} в плазме крови, полученной из русла нижней полой вены животных 1-й опытной группы, его

содержание было на 11,2% ниже аналогичного значения у крыс интактной группы (рис. 2). У животных 2-й опытной группы, с моделью ОС и получавших антиоксидант тиофан, содержание Ca^{2+} в плазме крови приближалось к значениям крыс интактной группы.

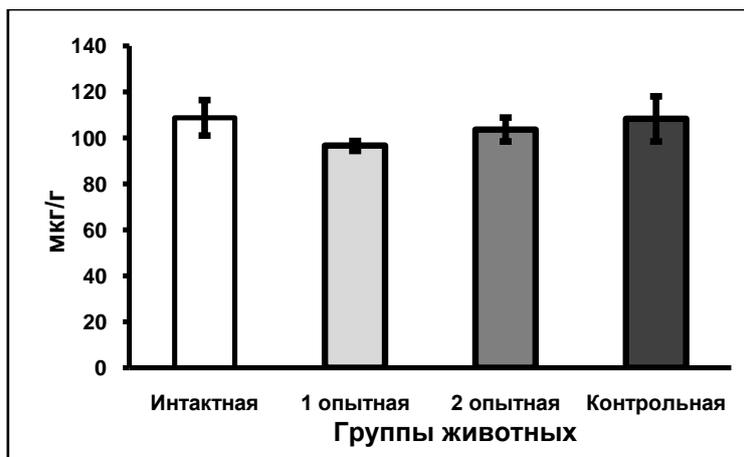


Рис. 2. Содержание Ca^{2+} в плазме крови из русла нижней полой вены, мкг/г

Как известно, поддержание постоянства уровня Ca^{2+} в плазме крови обеспечивается многоуровневой системой регуляции, допускающей лишь кратковременные и незначительные изменения данного показателя. Выявленные отличия между животными интактной и первой опытной группы по содержанию Ca^{2+} в плазме крови могут свидетельствовать о глубоких структурных и функциональных нарушениях в органах обеспечения кальциевого гомеостаза. Подтверждение или опровержение данного заключения может быть основано на определении содержания Ca^{2+} в костной ткани животных исследуемых групп.

При анализе содержания Ca^{2+} в костной ткани грудных позвонков у животных обеих опытных и контрольной групп было установлено, что распределение данного катиона в образцах кости крыс исследуемых групп имеет статистически достоверно низкий показатель по сравнению с костной тканью интактных крыс (рис. 3). Известно, что в условиях нарушения абсорбции Ca^{2+} в кишечнике обеспечение поддержания кальциевого гомеостаза должно осуществляться по механизму обратной связи за счет усиления резорбции костной ткани и транспорта катиона в общий кровоток.

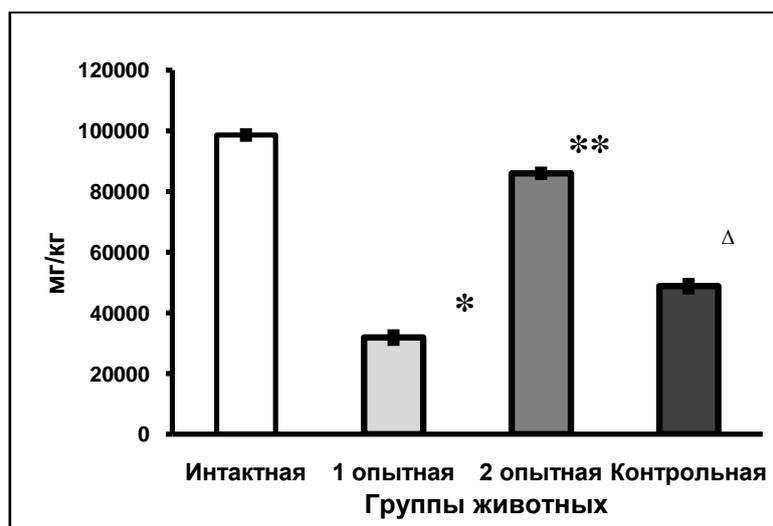


Рис. 3. Содержание Ca^{2+} в костной ткани грудного позвонка, мг/кг:

* отличие показателей крыс 1-й опытной группы от значений интактных крыс; ** различия показателей животных 1-й и 2-й опытных групп; Δ различия показателей животных 1-й опытной и контрольной групп ($p \leq 0,05$)

Данные атомно-эмиссионного анализа позволили выявить статистически достоверное превышение содержания Ca^{2+} в костной ткани у животных 2-й опытной группы, по сравнению с крысами 1-й опытной и контрольной групп (в 2,7 и 1,8 раз соответственно). Объяснение полученных результатов исследования может основываться на реализации антиоксидантом тиофаном в условиях ОС своих специфических свойств в отношении структур плазматической мембраны эпителиальных клеток кишечника, ответственных за абсорбцию Ca^{2+} в кишечнике.

В соответствии с законом о единстве структуры и функции, изменение уровня абсорбции Ca^{2+} в кишечнике и снижение его содержания в плазме крови животных всех групп безусловно должно сопровождается изменением параметров моделирования и ремоделирования костной ткани. По данным литературных источников, морфологическим отражением данных процессов является формирование различных форм остеопатий.

Таким образом, результаты исследования особенностей транспорта Ca^{2+} в кишечнике крыс всех исследуемых групп и его распределения в плазме крови и костной ткани животных всех групп позволяют вполне обоснованно заключить, что в условиях глюкокортикоид-индуцированного ОС происходит нарушение транспорта Ca^{2+} в тонком и толстом отделах кишечника. Доказательством преимущественного повреждения АКМ клеток эпителия кишечника является коррекция антиоксидантом тиофаном уровня абсорбции данного катиона в кишечнике и его содержания в костной ткани.

Литература

1. Остеопороз – социальная проблема XXI века / Л.П. Беневоленская [и др.] // Рус. мед. журн. – 2007. – Т.15. – №4. – С. 315–318.
2. Бондарева Л.А., Немова Н.Н., Кяйвярайнен Е.И. Внутриклеточная Ca^{2+} -зависимая протеолитическая система животных. – М.: Наука, 2006. – 294 с.
3. Влияние димефосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон / И.Х. Валеева [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – №2.
4. Васильев Ю.В. Терапия и профилактика эрозий желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциируемых со стрессовыми ситуациями // Рус. мед. журн. – 2010. – Т.18. – № 22. – С. 1–4.
5. Владимиров Ю.А. Кальциевые насосы живой клетки/Ю.А. Владимиров // Соросовский образов. журн. – 1998. – №3. – С.20–27.
6. Казимирко В.К., Коваленко В.Н., Мальцев В.И. Остеопороз: патогенез, клиника, профилактика и лечение. – Киев: МОРИОН, 2007. – 160 с.
7. Литвицкий П.Ф. Патофизиология: в 2-х т. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 808 с.
8. Луканина С.Н. Влияние антиоксиданта тиофана на структурно-функциональную организацию кишечника крыс в условиях глюкокортикоидной нагрузки // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2010. – №3. – С.61–68.
9. Рамазанова Л.М., Меньшикова И.А., Камиллов Ф.Х. Нарушения минеральной плотности костной ткани у мужчин – работников химического производства // Вестн. ОГУ. – 2008. – №9(91). – С.199–203.
10. Родионова С.С. Современный взгляд на глюкокортикоид-индуцированный остеопороз // Рус. мед. журн. – 2004. – Т.12. – №24(224). – С.236–240.
11. Влияние окислительного стресса на состояние костной ткани тела позвонка свиньи / А.В. Сахаров [и др.] // Сиб. вестн. с.-х. науки. – 2007. – №6. – С.81–86.
12. Binder H., Murer H. Potassium/proton exchange in brush-border membrane of rat ileum // J. Membr. Biol. – 1986. – Vol.91. – P.77–84.
13. Bowie A., O'Neill L. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries // Biochem Pharmacol. – 2000. – Vol.59. – P.13–23.
14. Zeiss N.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice // Vet Pathol. – 2003. – Vol.40. – P.481–495.

