

ОБМЕН СИАЛОГЛИКОПРОТЕИНОВ В ТКАНЯХ ТОНКОЙ КИШКИ КРЫС С РАЗЛИЧНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К СТРЕССУ ПРИ ВВЕДЕНИИ ДАЛАРГИНА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Оксузян А.В.¹, Максимов И.Е.¹, Кольцов В.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, Ижевск, e-mail: artur30st@mail.ru

В работе проводилось изучение влияния синтетического аналога лей-энкефалина – даларгина на обмен сialogликопротеинов (СГП) в тканях тонкой кишки крыс с различной устойчивостью к стрессу в условиях экспериментального аллоксанового диабета. Динамика обмена СГП оценивалась по уровню свободных сialовых кислот (ССК), олигосвязанных сialовых кислот (ОССК), белковосвязанных сialовых кислот (БССК), интегрального показателя (*БССК/ССК+ОССК*) и сialiдазной активности (СА) в сыворотке, слизистой оболочке и стенке тонкой кишки на 10-й, 20-й, 30-й, 45-й и 60-й дни эксперимента. Обмен изучаемых биополимеров у крыс с различной устойчивостью к стрессу при введении даларгина в условиях экспериментального диабета носил неодинаковый характер: в слизистых наложениях преобладали процессы накопления сialogликопротеинов, в особенности в группе стрессоустойчивых животных, а в стенке, наоборот, повышение активности реакций синтеза на 10-й день сменилось усилением реакций распада в обеих опытных группах, что доказывает быстрое компенсаторное анаболическое действие даларгина на сialовые кислоты в интестинальном мукозном слое, что может быть связано с его стресс-протективным эффектом на пролиферацию фибробластов и обмен биополимеров соединительной ткани.

Ключевые слова: даларгин, аллоксановый диабет, сialogликопротеины, ткани тонкой кишки, стрессоустойчивые, стрессонеустойчивые

EXCHANGE OF SIALOGLYCOPROTEINS OF THE THIN INTESTINE IN RATS WITH DIFFERENT STABILITY TO STRESS ON INTRODUCTION OF DALARGIN IN THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL DIABETES

Oksuzyan A.V.¹, Maximov I.E.¹, Koltsov V.A.¹

¹Izhevsk State Medical Academy, Ministry of Health of Russia, Izhevsk, e-mail: artur30st@mail.ru

In this work, we studied the effect of the synthetic analogue of lei-enkephalin - dalargin on the exchange of sialoglycoproteins (CGP) in the tissues of the small intestine of rats with different resistance to stress under conditions of experimental alloxan diabetes. The dynamics of CGP metabolism was assessed by the level of free sialic acids (FSA), oligo-bound sialic acids (OBSA), protein-bound sialic acids (PBSA), integral indicator (PBSA / FSA) and sialidase activity (CA) in serum, mucous membrane and wall of thin guts on days 10, 20, 30, 45 and 60 of the experiment. The exchange of studied biopolymers in rats with different resistance to stress when dalargin was administered under conditions of experimental diabetes was uneven: accumulation of sialoglycoproteins prevailed in mucous overlays, especially in the group of stress-resistant animals, and in the wall, on the contrary, increased activity of synthesis reactions day was replaced by increased decay reactions in both experimental groups, which proves the rapid compensatory anabolic effect of dalargin on sialic acids in the intestinal mucosal. This may be due to its stress-protective effect on the proliferation of fibroblasts and the exchange of connective tissue biopolymers.

Keywords: dalargin, alloxan diabetes, sialoglycoproteins, tissues of the small intestine, stress-resistant, stress-unstable

Сахарный диабет представляет собой сложное полифункциональное заболевание, характеризующееся многообразными метаболическими нарушениями, вызывающими гипергликемию и окислительный стресс, с последующими осложнениями, связанными с дисфункцией β -клеток поджелудочной железы и дефицитом инсулина [1]. При этом нарушаются энергетические процессы во всех видах соединительной ткани, где транспорт глюкозы сугубо инсулинозависимый [2]. Биохимическая особенность межклеточного

вещества этой ткани основана на синтезе специфических соединений, таких как углеводсодержащие биополимеры. Основными их представителями в слизистых наложениях желудочно-кишечного тракта являются сиалогликопротеины, важнейшие функции которых – защитная и барьерная [3]. Доказано, что частота поражений слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *H.pylori*, у больных сахарным диабетом выше по сравнению с пациентами, не имеющими нарушений углеводного обмена [4]. М.В. Ляпиной (2013) выявлено у лиц с инсулинорезистентностью угнетение всех видов пищеварения на фоне воспалительно-дистрофических изменений слизистой оболочки тонкой кишки, а также отмечена тенденция к повышению абсорбции моносахаров. Кроме этого, показано преобладание гипокинетической дискинезии тонкой кишки в постпрандиальном периоде, отмечается брадикинезия двенадцатиперстной кишки со снижением эвакуации и формированием дуоденостаза и дуодено-гастрального рефлюкса [5].

По проведенным исследованиям С.С. Перцова и др. (2009) известно, что среди общей популяции экспериментальных животных имеются индивиды, устойчивые и предрасположенные к стрессу, а в зависимости от их стрессоустойчивости изменения в обмене биополимеров соединительной ткани могут быть различны [6]. Индивидуальная стрессочувствительность организма во многом определяется генетически обусловленным состоянием так называемых стресс-лимитирующих систем, к которым относят в том числе дофаминергическую и серотонинергическую системы [7]. Ранее показано, что у крыс линии Август по сравнению с крысами Вистар более высокая устойчивость к стрессорному язвообразованию гастродуоденальной зоны сочетается с более высоким базальным и постстрессорным (после острого стресса) содержанием серотонина в стриатуме, что послужило одним из экспериментальных оснований отнесения серотонинергической системы к числу стресс-лимитирующих систем [8]. Важными участниками этих процессов являются нейропептиды. Они играют роль триггеров срочной мобилизации, модуляторов состояния системы нейрогуморальной регуляции неспецифических и специфических адаптивных функций организма, сохраняя запасы норадреналина и снижая накопление продуктов перекисного окисления липидов в тканях. Одним из синтетических аналогов лей-энкефалинов, энзиморезистентного агониста мю- и дельта-рецепторов является даларгин, оказывающий на обмен соединительной ткани протективный эффект. Это связано со способностью препарата вызывать пролиферацию, а в последующем быструю дифференцировку фибробластов с усилением секреции биополимеров соединительной ткани. Кроме этого, было доказано, что даларгин ограничивает действие стрессреализующих систем [9, 10].

Цель работы: проанализировать обмен сиалогликопротеинов в тканях тонкой кишки крыс с различной устойчивостью к стрессу при введении даларгина в условиях экспериментального сахарного диабета.

Материалы и методы исследования

Опыты проводились на 85 белых беспородных крысах-самцах массой 180–230 г, 43 из которых составляли группу стрессонеустойчивых (СНУ) и 42 – стрессоустойчивых (СУ) животных. С целью прогностической оценки устойчивости животных к стрессогенным воздействиям использовали тест «открытое поле» по методу С.С. Перцова (2009) [6]. При этом соблюдались положения Хельсинской декларации о гуманном отношении к лабораторным животным (одобрительная форма комитета по биомедицинской этике от 24 февраля 2009 г., аппликационный № 153). Экспериментальный сахарный диабет моделировали посредством однократной подкожной инъекции аллоксана тетрагидрата (мезоксалилмочевина, «Fluka Chemika», Швеция) в дозе 170 мг/кг массы тела животного по методике Н.А. Пальчиковой и соавт. (1987). В ходе эксперимента отмечалась гибель животных: среди СНУ 2 крысы погибли на четвертый день, а у СУ отмечалось аналогичное количество летальных исходов на третий день наблюдения, что может быть связано с острым стрессорным воздействием аллоксана в первые сутки и развитием декомпенсации на фоне гипергликемии. Для выяснения роли опиоидных пептидов в регуляции обмена сиалогликопротеинов при экспериментальном аллоксановом диабете (АД) использовали препарат даларгин – синтетический аналог лей-энкефалина (ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ, Россия), разведенный в стерильном 0,9%-ном растворе натрия хлорида (0,25М), который вводили внутримышечно по схеме: через каждые 72 часа, в дозе 100 мкг/кг массы тела крысы на протяжении 45 дней. Контрольную группу составили 8 СНУ и 8 СУ интактных крыс, содержащихся на обычном рационе вивария, которым вводили внутримышечно 0,2 мл физиологического раствора в динамике, аналогичной опытной группе.

Обмен сиалогликопротеинов (СПП) оценивали по уровню свободных сиаловых кислот (ССК), олигосвязанных сиаловых кислот (ОССК), белковосвязанных сиаловых кислот (БССК), интегрального показателя ($BCCK/ССК+ОССК$) и сиалидазной активности (СА) в сыворотке, слизистой оболочке и стенке тонкой кишки на 10-й, 20-й, 30-й, 45-й и 60-й дни эксперимента. Полученные в ходе исследования показатели проанализированы с помощью непараметрических методов количественной оценки критерия Манна–Уитни с достоверностью $p_1-1 < 0,05$. Результаты представлены в виде медианы (Me), нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей. Коэффициент корреляции оценивали по методике Спирмена с достоверностью $p_1-2 < 0,01$.

Результаты исследования и их обсуждение

Из таблицы 1 видно, что количество свободных сиаловых кислот в сыворотке крови СНУ животных при инъекции даларгина в условиях гипергликемии максимально возрастало на 45-й день эксперимента. Уровень олигосвязанных сиаловых кислот не изменялся на протяжении всего опыта, а количество белковосвязанных сиаловых кислот в сыворотке крови увеличивалось в динамике опытов с максимальным ростом на 30-й и 45-й дни. Одновременно отмечался рост сиалидазной активности с максимумом к 20-му дню эксперимента на 100,0%.

Достоверных изменений в содержании свободных и олигосвязанных сиаловых кислот в сыворотке крови СУ животных в течение всего экспериментального наблюдения не выявлено. Концентрация белковосвязанных сиаловых кислот возрастала в течение всей динамики с преобладанием на 30-й и 45-й дни на 85,4 и 100,9% соответственно. Уровень сиалидазной активности на 20-й день был на 66,7% выше контрольных значений (табл.).

Показатели обмена сиалогликопротеинов в сыворотке крови крыс с различной устойчивостью к стрессу при введении даларгина на фоне аллоксанового диабета

(Ме [Q₂₅-Q₇₅], n=8)

показатели	контроль	дни опыта				
		10	20	30	45	60
		рк-10	рк-20	рк-30	рк-45	рк-60
стрессонеустойчивые						
ССК, ммоль/л	0,07 [0,05–0,07]	0,09 [0,07–0,10] (p=0,10928)	0,04 [0,03–0,08] (p=0,12246)	0,10 [0,05–0,11] (p=0,39802)	0,10 [0,08–0,12]* (p=0,02607)	0,08 [0,05–0,10] (p=0,12499)
ОССК, ммоль/л	0,24 [0,18–0,25]	0,16 [0,14; 0,20] (p=0,11384)	0,27 [0,24; 0,30] (p=0,14060)	0,21 [0,18; 0,23] (p=0,26802)	0,25 [0,21; 0,27] (p=0,56150)	0,17 [0,16; 0,20] (p=0,17090)
БССК, ммоль/л	2,21 [2,20–2,23]	3,27 [3,24; 3,30]* (p=0,00108)	2,79 [2,77; 2,80]* (p=0,01141)	3,75 [3,65; 3,79]* (p=0,00075)	4,10 [4,08; 4,15]* (p=0,00074)	3,42 [3,36; 3,49]* (p=0,00110)
СА, ммоль/л /ч	0,03 [0,02–0,04]	0,05 [0,03–0,05] (p=0,10051)	0,06 [0,02–0,06]* (p=0,02674)	0,04 [0,02–0,04] (p=0,24590)	0,04 [0,01–0,04] (p=0,14001)	0,03 [0,02–0,04] (p=0,26553)
стрессоустойчивые						
ССК, ммоль/л	0,05 [0,04–0,06]	0,06 [0,02–0,07] (p=0,45209)	0,05 [0,03–0,06] (p=0,55707)	0,07 [0,06–0,09] (p=0,08976)	0,07 [0,05–0,10] (p=0,18566)	0,05 [0,02–0,06] (p=1,00000)

ОССК, ммоль/л	0,20 [0,16– 0,23]	0,13 [0,12– 0,16] (p=0,07229)	0,22 [0,20– 0,25] (p=0,24520)	0,17 [0,15– 0,21] (p=0,39907)	0,24 [0,21– 0,25] (p=0,12668)	0,18 [0,14– 0,20] (p=0,36812)
БССК, ммоль/л	2,19 [2,17– 2,22]	3,40 [3,38– 3,44]* (p=0,00075)	2,58 [2,55– 2,60]* (p=0,01153)	4,06 [4,02– 4,08]* (p=0,00077)	4,40 [4,38– 4,42]* (p=0,00075)	3,68 [3,59– 3,74]* (p=0,00075)
СА, ммоль/л /ч	0,03 [0,01– 0,04]	0,04 [0,02– 0,04] (p=0,13943)	0,05 [0,02– 0,06]* (p=0,01541)	0,04 [0,02– 0,04] (p=0,26731)	0,03 [0,02– 0,03] (p=0,52616)	0,03 [0,02– 0,03] (p=0,52647)

Примечание: * – статистическая значимость различий между опытом и контролем

Метаболизм сиалогликопротеинов в мукозном слое тонкой кишки у СНУ крыс при введении даларгина на фоне экспериментального аллоксанового диабета характеризовался ростом свободных сиаловых кислот на 10-й и 20-й дни опыта соответственно на 44,1% (p=0,0053) и 20,6% (p=0,0154) от контроля. При этом показатель олигосвязанных сиаловых кислот в динамике не отличался от значений интактных животных, а уровень белковосвязанных сиаловых кислот повышался на протяжении всего эксперимента. Рост сиалидазной активности в интестинальной слизи наблюдался на 10-й и 45-й дни воздействия, а именно на 67,6% и 91,2% по отношению к контролю. Интегральный показатель достоверно увеличивался на 30-й день введения даларгина на фоне метаболического стресса на 21,7% (рис. 1).

В группе СУ животных показатели обмена сиалогликопротеинов в интестинальном мукозном слое характеризовались снижением количества ССК к 20-му дню на 38,9% (p=0,0085) по сравнению с контрольным значением 0,36 [0,34;0,38] ммоль/кг сырой ткани. Количество олигосвязанных сиаловых кислот в динамике сочетанного воздействия не изменялось, а уровень белковосвязанных сиаловых кислот увеличивался максимально к 20-му и 30-му дням на 11,1 и 13,1% (p=0,0011) соответственно. При этом соотношение БССК/ССК+ОССК в динамике эксперимента не изменялось (рис. 1). Параллельно с этим отмечался достоверный максимальный рост сиалидазной активности в сравнении со значением интактных крыс на 45-й день, что составило 0,43 [0,41;0,48] ммоль/кг/ч (p=0,0309).

В группе СНУ крыс в стенке тонкой кишки количество свободных сиаловых кислот возрастало только к 10-му дню эксперимента на 27,8% (p=0,0231) от контроля, составив 0,18 [0,16;0,19] ммоль/кг сырой ткани. Концентрация олигосвязанных сиаловых кислот снижалась лишь на 30-й день опыта на 20,4% (p=0,0272) и была равна 1,68 [1,44;1,75] ммоль/кг, а уровень белковосвязанных сиаловых кислот достоверно уменьшался на 10-й и

45-й дни с 7,90 до 7,45 и 7,62 ммоль/кг сырой ткани соответственно. Метаболический оборот в обмене сиалогликопротеинов тонкой кишки у СНУ крыс подтверждают изменения показателя соотношения (БССК/ССК+ОССК), который снижался на 10-й день на 14,3%, а к 30-му дню возрастал на 20,7% ($p=0,0086$) (рис. 2). Одновременно отмечался достоверный рост сиалидазной активности на 45-й день опыта на 39,1%.

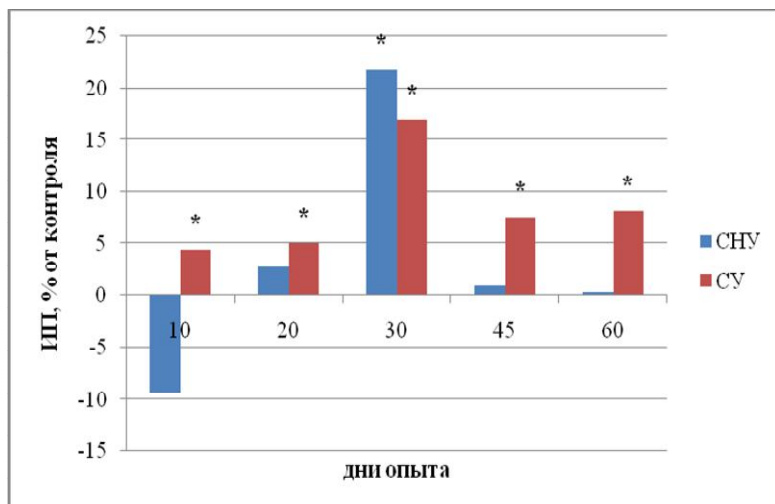


Рис. 1. Изменение интегрального показателя (БССК/ССК+ОССК) в слизистых наложениях тонкой кишки у СНУ и СУ животных при введении даларгина на фоне экспериментального диабета

Обозначения: СНУ – стрессонеустойчивые животные, СУ – стрессоустойчивые животные. Статистическая значимость между опытом и контролем: * – $p < 0,05$.

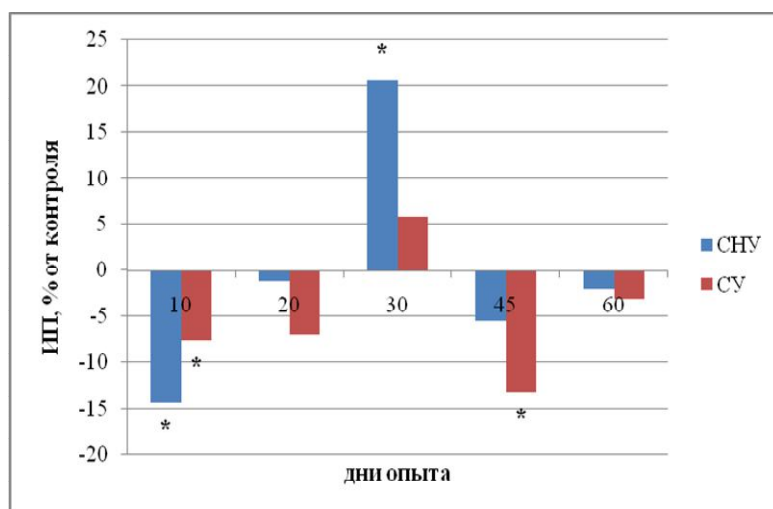


Рис. 2. Изменение интегрального показателя (БССК/ССК+ОССК) в стенке тонкой кишки у СНУ и СУ животных при введении даларгина на фоне экспериментального диабета

Обозначения: СНУ – стрессонеустойчивые животные, СУ – стрессоустойчивые животные. Статистическая значимость между опытом и контролем: * – $p < 0,05$.

В стенке тонкой кишки у СУ крыс отмечалось статистически значимое уменьшение свободных сиаловых кислот к 30-му дню сочетанного воздействия на 38,9% ($p=0,0114$). При этом показатель олигосвязанных сиаловых кислот превышал контрольное значение на 10-й день на 8,0% ($p=0,0062$). Уровень белковосвязанных сиаловых кислот статистически значимо снижался на 45-й и 60-й дни на 1,9% и 3,8% соответственно от исходного количества 7,90 [7,86; 7,94] ммоль/кг. На 10-й и 45-й дни опыта показатель соотношения (БССК/ССК+ОССК) уменьшался соответственно на 7,5% ($p=0,0157$) и 13,1% ($p=0,0209$), что визуализирует активность процессов распада анализируемых биополимеров (рис. 2).

В обмене плазменных сиалосодержащих гликопротеинов в исследуемых группах животных при введении даларгина на фоне метаболического стресса, вызванного аллоксаном, наблюдалось преобладание процессов синтеза над распадом в динамике наблюдения, кроме 20-го дня эксперимента. А в тканях тонкой кишки СНУ крыс анаболизм сиалогликопротеинов превалировал с 30-го дня опыта. Изменения в обмене сиалогликопротеинов в тканях тонкой кишки в различных по стрессоустойчивости группах животных, находящихся в условиях диабета с одновременным введением даларгина, носили неодинаковый характер: в слизистых наложениях преобладали процессы накопления изучаемых соединений, в особенности в группе СУ животных, а в стенке, наоборот, отмечалась активация реакций катаболизма сиалогликопротеинов в группе СНУ и в группе СУ крыс с 10-го дня динамики наблюдения.

Известно, что автономная нейропатия и состояние окислительного стресса при сахарном диабете приводят к нарушению обмена полиненасыщенных жирных кислот и возникновению дефицита производных арахидоновой кислоты, обладающих вазодилатирующей активностью, снижению уровня восстановленного глутатиона, а также окиси азота как естественных факторов антиоксидантной защиты органов желудочно-кишечного тракта [11]. Изученные нами на этом фоне выраженные биохимические сдвиги в метаболизме гликопротеинов тонкой кишки могут, вероятно, способствовать развитию интестинальной патологии при диабете. Одновременно с этим анаболическое действие даларгина на обмен сиалогликопротеинов может быть связано с повышенной чувствительностью дельта-опиоидных рецепторов у пациентов с данной нозологией. Литературные данные свидетельствуют о возможности их сопрягаться с аденилатциклазой и ингибировать ее [12], предупреждая увеличение цАМФ, но при этом способствовать возрастанию активности цГМФ, а это в свою очередь стимулирует пролиферацию клеток [13]. Вероятно, вышеописанные механизмы объясняют наблюдаемое в наших опытах интенсивное накопление сиалогликопротеинов в тканях тонкой кишки, что может сыграть не последнюю роль в лечебно-профилактических мероприятиях гастродуоденальной патологии

у лиц с оксидативным стрессом.

Список литературы

1. Заводник И.Б., Дремза И.К., Лапшина Е.А., Чещевик В.Т. Сахарный диабет: метаболические эффекты и окислительный стресс // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2011. Т. 28. №. 2. С. 83-94.
2. Чурилов Л.П., Утехин В.И. Метаболическая логистика стресса, сахарный диабет и труды Бернардо Альберто Усая // Педиатр. 2015. Т. 6. №. 3. С. 104-111.
3. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р. Соединительная ткань в детском возрасте: монография. Изд.2; испр. и доп. Ижевск, 2009. 144 с.
4. Максимова О.В., Чобитько В.Г., Калашников А.И., Родионова Т.И. Патология желудочно-кишечного тракта у больных сахарным диабетом // Достижения персонализированной медицины сегодня-результат практического здравоохранения завтра. 2016. С. 178.
5. Ляпина М.В. Клинико-функциональная характеристика тонкой кишки при метаболическом синдроме: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ижевск, 2013. 25 с.
6. Перцов С.С., Коплик Е.В., Симбирцев А.С., Калиниченко Л.С. Влияние ИЛ-1 β на поведение крыс в условиях слабой стрессорной нагрузки при тестировании в открытом поле // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009. Т. 148. № 11. С.488-490.
7. Крупина Н.А., Хлебникова Н.Н., Орлова И.Н., Попкова Е.В., Родина В.И., Крыжановский Г.Н. Эффекты хронического мягкого стресса у крыс Вистар и Август: поведение и содержание моноаминов в стриатуме // Патогенез. 2012. Т. 10, № 2. С. 50-58.
8. Пшенникова М.Г. Роль генетических особенностей организма в устойчивости к повреждающим воздействиям и в защитных эффектах адаптации // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2011. № 4. С. 7-16.
9. Оксужан А.В. Влияние даларгина на обмен сиалогликопротеинов в тканях желудка крыс с различной устойчивостью к стрессу при длительной иммобилизации // Аспирантский вестник Поволжья. 2011. №1-2. С. 199-201.
10. Протасова С.В. Особенности обмена гликозаминогликанов в коже и печени крыс с различной устойчивостью к стрессу: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ижевск, 2010. 26 с.
11. Окуневич И.В., Сапронов Н.С. Антиоксиданты: эффективность природных и синтетических соединений в комплексной терапии сердечно-сосудистых заболеваний // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2004. № 3. С. 1-17.
12. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Эндогенная опиоидная система и устойчивость сердца к

аритмогенным воздействиям // Кардиология. 2002. № 3. С. 51-57.

13. Трофимова С.Р. Суммарный коллаген и коллагенолитическая активность в аорте крыс при введении даларгина на фоне аллоксанового диабета // Клиническая биохимия: единство фундаментальной науки и лабораторной диагностики: материалы региональной научно-практической конференции, посвященной 70-летию П.Н. Шараева. Ижевск, 2010. С. 196-199.