

СОДЕРЖАНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В КОМПАКТНОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

В.А. ВЯТКИН^{1*}, М.В. СОБЕННИКОВА², О.М. КАНУННИКОВА³, Е.Г. БУТОЛИН⁴, В.Г. ИВАНОВ⁵, Н.В. САВИНОВА⁶

¹ очный аспирант кафедры биохимии ГБОУ ВПО ИГМА Минздрава России;

² инженер ФТИ УрО РАН;

³ доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фазовых превращений ФТИ УрО РАН;

⁴ д.м.н., зав. кафедрой клинической и лабораторной диагностики ФПК ПП ГБОУ ВПО ИГМА;

⁵ к.м.н., доцент кафедры клинической и лабораторной диагностики ФПК ПП ГБОУ ВПО ИГМА;

⁶ к.м.н., доцент кафедры биохимии ГБОУ ВПО ИГМА.

Большая социально-экономическая значимость сахарного диабета состоит в ранней инвалидизации больных. В ряду хронических осложнений сахарного диабета стоят патологические изменения в костной ткани. Целью нашей работы явилось исследование изменений в количестве кальция и фосфора — основных неорганических составляющих кости — в компактной костной ткани у аллоксан-индуцированных крыс на разных этапах диабета. Эксперимент проведён на 70 белых беспородных крысах-самцах массой от 180 до 220 г. С применением метода атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой определены содержания кальция и фосфора в образцах — навесках диафиза бедренной кости массой 5 мг. В гомогенатах образцов определена активность щелочной фосфатазы. Весь перечень измерений проведён на 7, 14, 21 и 28 дни эксперимента. В ходе работы выявлены изменения в содержании кальция на 7, 14 и 28 дни наблюдения и в содержании фосфора на протяжении всего эксперимента с максимумом изменений на 7 день опыта: на 25% ($p=0,00002$) и на 15% ($p=0,002$) соответственно по сравнению с контрольными значениями (медианы: 1,9 мг — кальций, 0,73 мг — фосфор). Установлена сильная прямая корреляционная связь между содержанием кальция и фосфора ($r=0,086$; $p<0,01$). Также выявлено угнетение действия щелочной фосфатазы на 28 день эксперимента.

Ключевые слова: концентрация кальция, концентрация фосфора, диабетическая остеопатия, компактная костная ткань, щелочная фосфатаза, аллоксановый диабет, атомно-эмиссионная спектроскопия.



ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени сахарный диабет (СД) приобрёл угрожающие масштабы: по данным государственного регистра на январь 2011 года число больных в России составляет более 3,3 млн. человек, 9,1% из которых страдают СД 1-го типа, однако есть опасения, что действительная распространённость СД в 3 раза выше [1]. Высокая смертность и ранняя инвалидизация больных в связи с развитием осложнений делают очевидной высокую социальную значимость заболевания [2]. К числу хронических осложнений СД относят различные формы диабетической остеопатии [3].

Говоря о развитии патологических изменений в костной ткани у больных СД, нельзя не отметить, что многие аспекты данной проблемы остаются неясными: частота поражений костно-суставного аппарата колеблется в весьма широких пределах [4], не до конца ясными остаются патогенетические механизмы развития остеопатических процессов [5]. Так, в рандомизированном контролируемом одномоментном исследовании, проведённом Шепелькевич А. П., установлено снижение минеральной плотности костной ткани (МПКТ) в области шейки бедра у 20% обследованных пациентов с СД 1-го типа [6]. В другом одномоментном исследовании, проанализированном в обзоре Hofbauer et al, остеопения в той же области выявлена у 44% больных с инсулинзависимым СД [5].

В ряде экспериментальных работ с грызунами также наблюдались изменения в минеральном составе костной ткани. В опыте с аллоксан-индуцированными крысами линии Спрег-Дуоли в бедренной кости общее содержание минеральных компонентов (взвешивание золы после выгорания органических компонентов кости) и количество кальция (измерения колориметрическим методом) к исходу пятой недели эксперимента снизилось соответственно на 14,82% и 16,27% по сравнению с контролем [7]. В опытах с аллоксан-индуцированным сахарным диабетом у крыс на 30 день наблюдения зафиксировано снижение количества кальция

(измерения титриметрическим методом по де Ваарду) в бедренной кости на 21,4% по сравнению с контролем [8].

Минеральная фаза компактной костной ткани представлена, в основном, фосфорно-кальциевыми неорганическими солями, содержание которых составляет 45-49% от массы кортикальной кости и придаёт ей механическую жёсткость и прочность [9, 10]. Потеря минеральных составляющих кости приводит к остеопении и снижению её прочностных характеристик, что подтверждено в работах с экспериментальным диабетом на крысах [7, 8, 11]. Однако планомерные исследования на предмет изменения содержания минеральных составляющих в костной ткани на разных этапах диабета отсутствуют. В связи с этим **целью данной работы является исследование изменений содержания кальция и фосфора в компактной костной ткани в динамике экспериментального СД.**

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведён на 70 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г. с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенных в Хельсинской декларации (2000). Животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к корму и воде. Получена одобрительная форма локального этического комитета № 371 от 23 июня 2013 года.

Исследовали 2 группы животных. Контрольную группу составили 10 интактных крыс, которым однократно вводили 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Опытную группу составили 60 крыс с аллоксановым диабетом.

Аллоксановый диабет индуцировали путём однократного подкожного введения аллоксана тетрагидрата («Sigma-Aldrich», США) в дозе 170 мг/кг веса животного по методу Н.А. Пальчиковой [12]. Летальность в ходе эксперимента составила 40%. Воспроизведение диабета контролирова-

* e-mail: vyatkinva@yandex.ru

ли по совокупности показателей: уровня глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом («Ольвекс Диагностикум», Россия) и уровня гликозилированного гемоглобина в цельной крови (тест-система «Nycocard-HbA_{1c}» на рефлектотометре «Nycocard Reader II», Великобритания). Животных выводили из эксперимента под кратковременным эфирным наркозом на 7, 14, 21, 28 дни опыта.

Количество кальция (Ca) и фосфора (P) определяли методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой на спектрометре «Spectro flame modulas» [Методические указания]. Погрешность в измерениях составляет $\pm 0,1$ мг. Объектами анализа являлись гидролизаты навесок диафиза бедренной кости массой 5 мг.

В гомогенатах бедренной кости определяли активность щелочной фосфатазы унифицированным методом по «конечной точке» (ЩФ, «ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА-ВИТАЛ-02», «Витал Диагностика», Россия).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.1 фирмы Stat Soft. В группах выборки определяли медиану (Me) и межквартильный интервал (25%; 75%). Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни с критическим уровнем 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение аллоксана крысам вызвало развитие гипергликемии и увеличение уровня гликозилированного гемоглобина. Концентрация глюкозы в плазме крови опытных крыс превышала её уровень у контрольных животных (4,77 [4,35; 5,08] ммоль/л) на протяжении всего периода эксперимента, максимально отличаясь от контроля на 7 день опыта – на 115% ($p=0,0004$). Уровень гликозилированного гемоглобина увеличивался в динамике исследования на 16% ($p=0,0002$), 28% ($p=0,0006$), 35% ($p=0,0002$), 39% ($p=0,0003$) по сравнению с контролем (4,15 [4,0; 4,3] %) на 7, 14, 21, 28 дни эксперимента соответственно. Характер изменений полученных показателей позволяет говорить о развитии диабета у экспериментальных животных, что согласуется с данными литературы [8, 12, 13].

Активность ЩФ в гомогенатах диафиза бедренной кости увеличилась на 321% к 7 дню эксперимента ($p=0,01$), снижаясь до 0 нмоль/л*с к 28 дню опыта ($p=0,0007$). (Табл. 1).

Изменения в содержании кальция и фосфора в бедренной кости у аллоксан-индуцированных крыс носят однонаправ-

ленный характер. Количество кальция уменьшалось на 7, 14 и 28 дни эксперимента соответственно на 25% ($p=0,00002$), 22% ($p=0,00004$) и 18% ($p=0,00001$) по сравнению с контролем, а содержание фосфора снижалось на 15% ($p=0,002$), 12% ($p=0,002$), 10% ($p=0,006$) и 10% ($p=0,003$) по сравнению с контролем на 7, 14, 21 и 28 дни опыта соответственно. При этом на протяжении всего эксперимента отмечалась сильная прямая корреляция между содержанием кальция и фосфора ($r=0,086$; $p<0,01$). (табл. 1).

Наблюдаемые нами явления могут объясняться следующим образом. В ряду патогенетических факторов, индуцирующих развитие остеопении у больных СД, стоит образование и накопление конечных продуктов неферментативного гликозилирования белков (AGEs — advanced glycation end products) в костной ткани [14]. Действие AGEs на клеточный метаболизм может быть внутриклеточным и внеклеточным, опосредованным через рецепторы к AGEs (RAGE — receptors of AGEs) [15]. С одной стороны, гликирование костного коллагена приводит к снижению количества поперечных «сшивок» в его структуре, тем самым нарушая процесс минерализации и фиксации минеральных компонентов в матриксе костной ткани. В то же время, взаимодействие AGE-RAGE вызывает активацию ядерного фактора каппа В (NF-kB), таким образом стимулируя остеокластогенез и, следовательно, костную резорбцию [14]. Подтверждением того факта, что при осложнениях СД RAGE являются звеном в реализации патологических эффектов AGEs служит эксперимент, проведённый на мышах, лишённых RAGE, в котором показано снижение активности резорбции, увеличение костной массы и МПКТ [16]. Другой вероятной причиной изменения минерального состава костной ткани при СД 1-го типа может быть дефицит витамина Д, приводящий к потере кальция и фосфатов с мочой [17, 18]. Указанные обстоятельства могут объяснять уменьшение содержания кальция и фосфора в костной ткани при экспериментальном диабете.

Роль щелочной фосфатазы (ЩФ) в процессах остеогенеза заключается в увеличении локальной концентрации фосфатов, необходимого для формирования центров кристаллизации, за счёт отщепления фосфатных остатков от фосфорорганических эфиров и фосфопротеинов [10]. Информация об изменении уровня данного показателя при инсулинзависимом СД носит противоречивый характер. Показано достоверное увеличение активности ЩФ у больных СД как за счёт высокого уровня печеночной и кишечной изоформ, так и в связи с высокой активностью костной изоформы данного фермента [13]. Между тем, выявлено существенное снижение активности ЩФ в бедренной кости при стрептозототициномом диабете у грызунов [19].

Увеличение количества остеобластов, наблюдающееся при дефиците витамина Д [20], объясняет усиление синтеза ЩФ, и, следовательно, рост её активности на 7 день опыта (табл. 1).

Угнетение ферментативной деятельности ЩФ в гомогенатах костной ткани на 28 день эксперимента (табл. 1) с одной стороны может быть обусловлено дефицитом инсулиноподобного фактора роста-1, опосредованного наблюдающейся при экспериментальном диабете инсулинопенией [8, 21], с другой — угнетением функции остеобластов в связи с накоплением AGEs [14].

ВЫВОДЫ

Впервые выявлено, что аллоксановый диабет у крыс сопровождается снижением содержания фосфора в компактной костной ткани с пиком изменения на 7 день опыта.

Таблица 1
Содержание кальция и фосфора у крыс с аллоксановым диабетом, Ме [25%;75%]

Показатель	Кальций, мг	Фосфор, мг	Активность ЩФ, нмоль/л*с
Контроль (n=10)	1,9 [1,73; 1,96]	0,73 [0,71; 0,74]	208,15 [24; 316,8]
Аллоксановый диабет, 7 день (n=10)	1,42 [1,37; 1,6]***	0,62 [0,59; 0,68]**	876,55 [288; 1200]*
Аллоксановый диабет, 14 день (n=8)	1,49 [1,22; 1,59]***	0,64 [0,56; 0,67]**	37,8 [0; 96]
Аллоксановый диабет, 21 день (n=8)	1,79 [1,41; 1,88]	0,66 [0,58; 0,69]**	201,95 [24; 666]
Аллоксановый диабет, 28 день (n=10)	1,55 [1,32; 1,61]***	0,66 [0,56; 0,7]**	0 [0; 12]***

Примечание: р — достоверность различий с контролем (* — $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$).

Аллоксановый диабет у крыс приводит к снижению количества кальция в компактной кости с максимумом изменения на 7 день эксперимента.

В динамике аллоксан-индуцированного диабета впервые выявлен фазный характер изменения активности ЩФ в компактной костной ткани, характеризующийся увеличением активности фермента на 7 день опыта и угнетением — на 28 день эксперимента.

SUMMARY

Introduction: *Most of the socio-economic importance of diabetes is an early disability of patients suffering from it. Among the chronic complications of diabetes, there are also abnormal changes in bone tissue.*

Aim: *The aim of our work was to study the changes in the amount of calcium and phosphorus (the main inorganic constituents of bone) in a compact bone tissue in alloxan-induced diabetes in rats at different stages of the disease.*

Materials and Methods: *The experiment was conducted on 70 white mongrel male rats weighing 180 to 220 g. Using the method of atomic emission spectroscopy with inductively coupled plasma we determined the content of calcium and phosphorus in the samples — femoral shafts weighting 5 mg. In homogenates of samples, we determined the activity of alkaline phosphatase. The entire list of measurements was repeated at 7, 14, 21 and 28 days of experiment.*

Results: *The work revealed the decreases in the content of calcium at 7, 14 and 28 days of observation and phosphorus throughout the experiment with maximum changes on the 7th day of the experiment: 25% ($p = 0.00002$) and 15% ($p = 0.002$), respectively, compared with control values (median: 1.9 mg - calcium, 0.73 mg - phosphorus). There was a strong direct correlation between calcium and phosphorus ($r = 0.086$; $p < 0.01$) and an inhibition of activity of alkaline phosphatase on day 28 of the experiment.*

Conclusions: *For the first time, we show that alloxan diabetes in rats is accompanied by a decrease in phosphorus and calcium content of the compact bone with a maximum change at day 7 of the experiment. There are phase changes in the activity of alkaline phosphatase characterized by an increase at day 7 and inhibition by day 28 of the experiment.*

Keywords: *calcium, phosphorus, diabetic osteopathy, compact bone tissue, alkaline phosphatase, alloxan diabetes, atomic emission spectroscopy.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Сахарный диабет в цифрах: действительность и прогнозы [доступ от 25.12.2014]. Доступ по ссылке <http://диабет.рф/about-diabetes/risk-factors/diabetes-in-figures>.

2. Шишкова Ю.А., Суркова Е.В., Мотовилин О.Г., Майоров А.Ю. Качество жизни при сахарном диабете: определение понятия, современные подходы к оценке, инструменты для исследования. Сахарный диабет. 2011;(3):70-75. [Shishkova J.A., Surkova E.V., Motovilov O.G., Mayorov A.Yu. Quality of life diabetes mellitus: definitions, modern research approaches, tool for evaluation. Diabetes mellitus. 2011;(3):70-75].

3. Шишкин А.Н., Мануленко В.Н. Диабетическая остеопатия. Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер.11. 2008;(3):70-79. [Shishkin A.N., Manulenko V.V. Diabetic osteopathy. Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Ser.11 2008;(3):70-79].

4. Дедов И.И., Шестакова М.В., редакторы. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011.

5. Hofbauer L.C., Brueck, C.C., Singh S.K., Dobnig H. Osteoporosis in Patients With Diabetes Mellitus. J. Bone Miner. Res. 2007;22(9):1317-1328. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/JBMR.070510>.

6. Шепелькевич А.П. Состояние показателей костного метаболизма у пациентов с сахарным диабетом 1-го типа. Военная медицина. 2012;25(4):42-50. [Shepelkevich A.P. Condition of indicators of a bone metabolism at patients with diabetes of the 1st type. Voennaya medicina. 2012;25(4):42-50].

7. Qi W, Zhang Y, Yan Y.B., Lei W, Wu ZX, Liu N, Lie S, Shi L, Fan Y. The protective effect of cordymin, a peptide purified from the medicinal mushroom *Cordyceps sinensis* on diabetic osteopenia in alloxan-induced rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013 Aug. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/985636>.

8. Савинова Н.В. Изменение показателей обмена коллагена костной ткани при аллоксановом диабете и стрессе [диссертация на соискание ученой степени]. Казань: Казанский государственный медицинский университет; 2004.

9. Щербак И.Г. Биологическая химия: Учебник. СПб.: Издательство СПбГМУ; 2005.

10. Савинова Н.В., Переведенцева С.Е., Виленская М.П., Вольхина И.В., Бутолин Е.Г. Биохимия минерализованных тканей и соединительнотканного матрикса: уч. пособие. Бутолин Е.Г., редактор. Ижевск; 2012.

11. Sirasanagandla S.R., Karkala S.R.P., Potu B.K., Bhat KMR. Beneficial effect of *Cissus quadrangularis* Linn. on osteopenia associated with streptozotocin-induced diabetes mellitus in male Wistar rats. Adv Pharmacol Sci. 2014 Apr. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/483051>.

12. Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Шорин Ю.П. Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллоксана. Проблемы эндокринологии. 1987;(4):65-68. [Palchikova N.A., Selyatickaya-VG, Shorin Yu.P. Kolichestvennaya ocenka chuvstvitel'nosti ehksperimental'nykh zhivotnykh k diabetogennomu dejstviyu alloksana. Problemy ehndokrinologii. 1987;(4):65-68].

13. Данилова О.В. Обмен коллагена костной ткани крыс при воздействии преднизолоном в условиях экспериментального диабета [диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук]. Уфа; 2010.

14. Vestergaard P. Diabetes and Bone. J Diabetes Metab. 2011;S:1. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2155-6156.S1-001>.

15. Goh S., Cooper M.E. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2008;93(4):1143-1152. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1817>.

16. Zhou Z, Immel D, Xi C, Bierhaus A, Feng X, Mei L, Nawroth P, Stern DM, Xiong W. Regulation of osteoclast function and bone mass by RAGE. J. Exp. Med. 2006;203(4):1067-1080. DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20051947>.

17. Поровознюк В.В., Мазур И.П. Костная система и заболевания пародонта. К.: Книга Плюс; 2004.

18. Vestergaard P. Diabetes and bone fracture: risk factors for old and young. Diabetologia. 2014;57(10):2007-2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-014-3338-1>.

19. Hie M., Shimono M., Fujii K., Tsukamoto I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. Bone. 2007; 41(6):1045-1050. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.08.030>. PubMed PMID: 17916452.

20. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина; 1969.

21. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia. 2008;51(2):216-226.