

Л.И. Корытов^{1, 2}, Л.А. Гребёнкина¹, М.И. Сусликова²

ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ТОРМОЖЕНИЯ СКОРОСТИ ВСАСЫВАНИЯ ГЛЮКОЗЫ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия

² ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия

Исследовано содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиокислительная активность (АОА) сыворотки крови в условиях моделирования хронического иммобилизационного стресса. Активация ПОЛ сопряжена с торможением скорости всасывания глюкозы. Курсовое введение 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцината (ЭМОС) в дозе 10 мг/кг приводило к изменению содержания первичных и конечных продуктов ПОЛ и повышению АОА сыворотки. Введение ЭМОС при иммобилизационном стрессе приводило к увеличению скорости всасывания глюкозы до показателей контрольной группы.

Ключевые слова: стресс, перекисное окисление липидов, 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцинат, глюкоза, всасывание

ONE OF THE POSSIBLE MECHANISMS OF GLUCOSE ABSORPTION SLOWING DURING IMMOBILIZATION STRESS

L.I. Korytov^{1, 2}, L.A. Grebyonkina¹, M.I. Suslikova²

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

An experimental study was performed on outbred male rats. In the first series of chronic experiments we studied the process of glucose absorption in an isolated loop of a jejunum in 12 rats. In the second series we studied the changes of lipid peroxidation during immobilization with the introduction of MFB and without in 18 rats in each group. Rats were operated in a special way. During all the days of immobilization there is an increased DK in serum of rats, reaching maximum on the seventh day of daily one hour immobilization.

Lipid peroxidation products (conjugated dienes, malonicdialdehyde) and antioxidant activity of serum in chronic immobilization stress (1 hour a day during 7 days) and glucose absorption in a jejunum were investigated. Activation of lipid peroxidation (LPO) and its correlation with inhibition of glucose absorption rate were revealed. 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (EMHPS) administration of a 10 mg/kg a day dose for 7 days resulted in primary and end lipid peroxidation product decrease and increase in blood serum antioxidant activity. Under EMHPS correction, the glucose absorption rate approached the control group level in chronic immobilization stress. Activation of lipid peroxidation was suggested as one of the possible mechanisms of glucose absorption reduction during stress. Activation of the POL can be one of the decline reasons of the glucose absorption process during stress.

Key words: stress, lipid peroxidation, 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate, glucose, absorption

Согласно современным представлениям, основным механизмом всасывания глюкозы в тонкой кишке является ее вторичный активный транспорт с участием натрий-глюкозного ко-транспортера – SGLT1, локализованный в мембране щеточной каймы кишечных клеток, а облегченная диффузия играет незначительную роль. Na⁺-зависимая система более устойчива к различным экспериментальным воздействиям, но эта система энергозатратна. В связи с этим целью настоящей работы является экспериментальная проверка изменений скорости транспорта всасывания глюкозы при иммобилизационном стрессе и роли активации ПОЛ в этих изменениях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальное исследование выполнено на беспородных крысах-самцах в лаборатории патофизиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» и на кафедре нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России. Животные приобретены в лицензированном vivарии ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», а эксперимент проведен в соответ-

ствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Работа была одобрена этическим комитетом ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России.

Стресс моделировали путем жесткой фиксации четырех конечностей животного к столику в положении животного на спине в течение 1 часа ежедневно в одни и те же утренние часы на протяжении 7 дней. Проведены 2 серии опытов. В первой серии хронических опытов изучали процесс всасывания глюкозы в изолированной петле тощей кишки на 12 крысах, оперированных по нашему способу [8]. По этому способу после вскрытия брюшной полости на передней стенке желудка выполняют кисетный шов в виде круга, диаметром 4 мм, в центре которого рассекают стенку желудка и через полость желудка в просвет тонкого кишечника вводят катетер-проводник с шариком на конце до места формирования энтероэнтероанастомоза, пересекают тонкую кишку с брыжейкой. После выделения изолированного участка тонкой кишки длиной 20 см на катетере-проводнике с шариком на конце закрепляют болюс-трубку и формируют энтероэнтероанастомоз на болюс-трубке по типу «конец в конец», проверяют герметичность анастомоза после накладывания одноряд-

ных узловых серозно-мышечно-подслизистых швов. С помощью катетер-проводника болюс-трубку удаляют через отверстие в желудке и затягивают кисетный шов. На проксимальном и дистальном концах изолированного участка тонкой кишки закрепляют фистульные трубки. Использование болюса-трубки позволяет оптимизировать наложение швов на стенки кишки, сохранять её нормальный просвет и интраоперационно проверять состоятельность и герметичность сформированного анастомоза. Оперированные животные могут использоваться в хронических опытах в течение нескольких недель. В этой серии проведены 3 варианта хронических опытов по изучению скорости всасывания глюкозы: 1) в условиях практически свободного поведения животных, предварительно приученных к опыту (контроль); 2) при ежедневной одночасовой иммобилизации 4 конечностей крысы в положении на спине; 3) при ежедневной одночасовой иммобилизации с введением препарата ЭМОС. Курсовое введение препарата в дозе 10 мг/кг в/м начинали за 3 дня до иммобилизации и продолжали на протяжении всего времени иммобилизации животных. Длительность опытов в 2-м и 3-м вариантах ограничивалась 10 днями.

Концентрация глюкозы в оттекающем перфузате в порциях за 15 минут в течение 1 часа определялась гексокиназным методом [5]. В качестве субстрата использовали глюкозу в концентрации 40 мМ. Скорость всасывания свободной глюкозы (СВГ) в контроле и при фиксации вычисляли по формуле:

$$J = C_{\text{вх}} \times V_{\text{вх}} / 15 - C_{\text{вых}} \times V_{\text{вых}} / 15 \text{ [4]}.$$

Во второй серии изучали изменения показателей ПОЛ при иммобилизации с введением ЭМОС и без введения препарата по 18 крыс соответственно в каждой группе. Животных этой серии выводили из опыта поэтапно путем декапитации под эфирным наркозом сразу после одночасовой иммобилизации в 1-е, 3-и и 7-е сутки стресса. В качестве контроля использованы 6 крыс-самцов, не подвергнутых иммобилизации. После декапитации животных в первой серии в сыворотке крови проводили определение диеновых конъюгатов (ДК), малонового диальдегида (МДА) и антиоксидантной активности сыворотки крови (АОА) [2, 3, 6]. Повышение в сыворотке крови ДК является достаточным критерием для заключения об активации ПОЛ [7].

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 с использованием непараметрических методов. Результаты статистического анализа представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала (Q_{25} – Q_{75}). Корреляционные зависимости характеризовали с помощью ранговой корреляции по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении процесса всасывания глюкозы при хроническом одночасовом ежедневном иммобилизационном стрессе на протяжении 10 дней получены факты снижения скорости всасывания этого субстрата в тощей кишке крыс с максимум на 7-й день эксперимента (рис. 1).

На основании полученных фактов и данных литературы [1, 10, 11, 13, 14] мы предположили, что из возможных механизмов торможения скорости всасы-

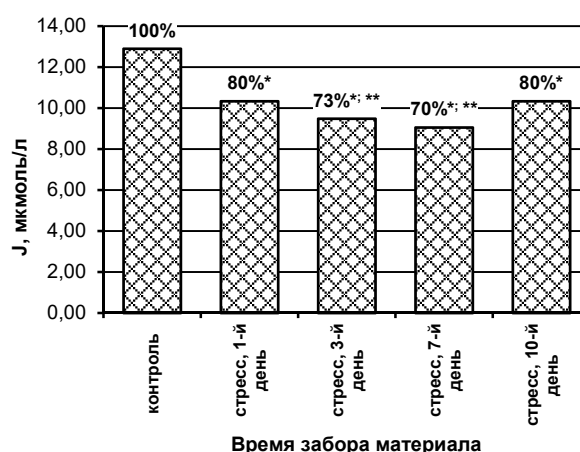


Рис. 1. Скорость всасывания глюкозы за один час опыта в контроле и при стрессе: J – скорость всасывания глюкозы (мкмоль/л); * – различия статистически значимы, по сравнению с контролем ($p < 0,05$); ** – различия статистически значимы, по сравнению с 1-м днем стресса в соответствующих временных интервалах ($p < 0,05$).

вания глюкозы в тонком кишечнике на фоне стресса наблюдается усиление процессов ПОЛ. В этой связи проведена вторая серия опытов.

Получены данные (рис. 2), которые однозначно указывают на то, что во все дни иммобилизации отмечается повышение ДК в сыворотке крови крыс, достигавшее максимума на 7-й день ежедневной часовой иммобилизации животных. Уровень ДК на 7-й день повысился почти вдвое (196,7%), по сравнению с контролем (100%). Снижение скорости всасывания глюкозы в этот же день иммобилизации также было максимально и составило около 30% от данных контроля. Содержание МДА в сыворотке крови значимо повышалось во все дни стресса, однако не так значительно, как ДК. Самый высокий уровень МДА также наблюдался к 7-му дню стресса и составил 128% от уровня контрольных данных.

Для оценки значимости полученных данных проведен корреляционный анализ. Выявлена сильная прямая корреляционная зависимость ($r > 0,75$; $p < 0,05$) между уровнями ДК и МДА в 1-й и 3-й дни стресса. Отмечена сильная обратная корреляционная зависимость между уровнем ДК и скоростью всасывания глюкозы на 1-й ($r = -0,94$) и 3-й ($r = -0,88$) дни стресса и сильная обратная корреляционная зависимость между уровнем МДА и скоростью всасывания глюкозы во все дни иммобилизации: $r = -0,82$ (1-й день), $r = -0,89$ (3-й день), $r = -0,94$ (7-й день) ($p < 0,05$).

Полученные факты (рис. 2) однозначно указывают на то, что применение ЭМОС в условиях стрессорного воздействия ведет к снижению содержания как первичных, так и конечных продуктов ПОЛ и повышению антиоксидантной активности сыворотки крови, и поэтому была проведена серия опытов по изучению скорости всасывания глюкозы с курсовым введением ЭМОС на фоне стресса. Результаты опытов, которые однозначно указывают на приближение скорости всасывания изучаемого субстрата к контрольным данным в более ранние сроки, приведены на рисунке 3.

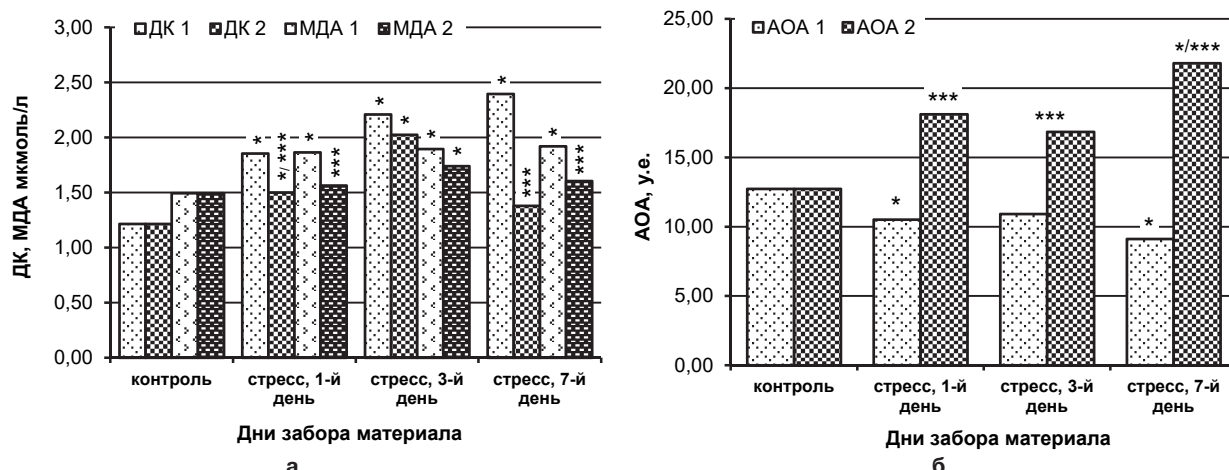


Рис. 2. Динамика уровня дневных конъюгатов, малонового диальдегида (а) и антиоксидантной активности (б) в сыворотке крови в контрольных опытах и в условиях стресса без введения ЭМОС и на фоне введения препарата: * – различия статистически значимы, по сравнению с контролем ($p < 0,05$); *** – различия статистически значимы, по сравнению с опытами без введения препарата в соответствующем временном интервале ($p < 0,05$); ДК 1, МДА 1, АОА 1 – уровни ДК, МДА и АОА в контроле и при стрессе без введения препарата ОСЭМ; ДК 2, МДА 2, АОА 2 – уровни ДК, МДА и АОА в контроле и при стрессе на фоне введения препарата.

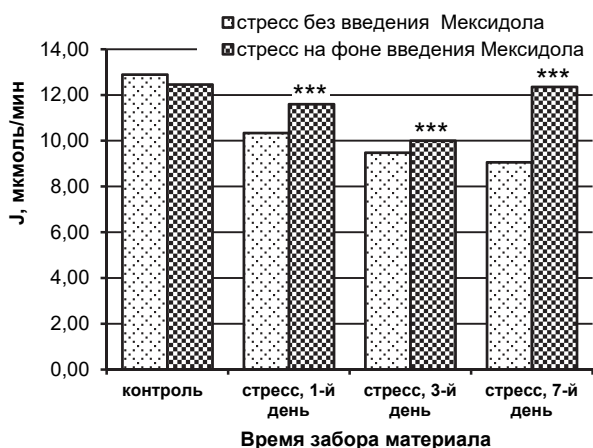


Рис. 3. Сравнение скорости всасывания глюкозы за один час при иммобилизации без введения антиоксидантного препарата и на фоне курсового введения ЭМОС: J – скорость всасывания глюкозы (μmol/L); *** – различия статистически значимы, по сравнению с опытами без введения препарата в соответствующем временном интервале ($p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании сопоставления динамики между повышением продуктов ПОЛ и торможением всасывания глюкозы при хронической одночасовой иммобилизации, а также эффектов при введении 2-этил-6-метил-3-оксипиридина сукцината на фоне стресса считаем, что активация ПОЛ вполне может быть одной из причин снижения процесса всасывания глюкозы при стрессе. По данным литературы известно, что активация ПОЛ приводит к дефициту макроэргов [9, 13], и тем самым угнетается доминирующий механизм активного транспорта всасывания глюкозы [4]. Из других возможных механизмов снижения скорости всасывания глюкозы при стрессе может встречаться гиперкальцемия – за счет уменьшения продукции кальцитонина щитовидной железой, так как повышение уровня кальция в перфузионном растворе вызывает торможение скорости всасывания глюкозы [11, 12].

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные психотропные эффекты и механизм действия // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 2–12.

Voronina TA (2001). Mexidol antioxidant. The main psychoactive effects and the mechanism of its action [Antioxidant meksidol. Osnovnye psikhotropnye efekty i mekhanizm deystviya] *Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya*, 1 (1), 2–12.

2. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лабораторное дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.

Gavrilov VB, Mishkorudnaya MI (1983). Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxide content in blood plasma [Spektrofotometricheskoe opredelenie soderzhaniya gidroperekisey lipidov v plazme krovi]. *Laboratornoe delo*, (3), 33–36.

3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопросы медицинской химии. – 1987. – № 1. – С. 118–122.

Gavrilov VB, Gavrilova AR, Mazhul LM (1987). The analysis of methods of determining products of lipid peroxidation in serum with the thiobarbituric acid test [Analiz metodov opredeleniya produktov perekisnogo okisleniya lipidov v syvorotke krovi po testu s tiobarbiturovoy kislotoy]. *Voprosy meditsinskoy khimii*, (1), 118–122.

4. Громова Л.В., Груздков А.А. Относительная роль различных механизмов всасывания глюкозы в тонкой кишке при физиологических условиях // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1993. – Т. 79. – № 6. – С. 65–72.

Gromova LV, Gruzdkov AA (1993). The relative role of different mechanisms of glucose absorption in the small intestine under physiological conditions [Otnositel'naya rol' razlichnykh mekhanizmov vsasyvaniya glyukozy v

tonkoy kishke pri fiziologicheskikh usloviyakh]. *Fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*, 79 (6), 65-72.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 496 с.

Kamyshnikov VS (2000). Clinical and biochemical laboratory diagnosis manual [Spravochnik po kliniko-biokhimicheskoy laboratornoy diagnostike], (1), 496.

6. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка АОА плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59–60.

Klebanov GI, Babenkova IV, Teselkin YO (1988). Evaluation of blood plasma antioxidant activity with the use of egg yolk lipoproteins [Otsenka AOA plazmy krovi s primeneniem zheltokhnykh lipoproteidov]. *Laboratornoe delo*, (5), 59-60.

7. Колесникова Л.И., Долгих В.В., Прохорова Ж.В., Гребёнкина Л.А., Власов Б.Я., Ильин В.П. Особенности состояния системы «перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты» и обмена кальция у детей подросткового возраста при эссенциальной гипертензии // Педиатрия. – 2010. – Т. 89. – № 3. – С. 10–14.

Kolesnikova LI, Dolgikh VV, Prokhorova ZV, Grebyonkina LA, Vlasov BY, Iljin VP (2010). Features state of the system "lipid peroxidation – antioxidant protection" and of calcium metabolism in adolescents with essential hypertension [Osobennosti sostoyaniya sistemy «pere-kisnogo okisleniya lipidov – antioksidantnoy zashchity» i obmena kal'tsiya u detey podrostkovogo vozrasta pri essentsial'noy gipertenzii]. *Pediatriya*, 89 (3), 10-14.

8. Корытов Л.И., Сусликова М.И. Способ моделирования энтероэнтероанастомоза у мелких лабораторных животных: Патент № 2535411 Рос. Федерация; МПК G09B N2328 / Корытов Л.И., Сусликова М.И.; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет; № 2012153031, заявл. 07.12.2012, опубл. 10.12.14, Бюл. № 34. – 15 с.

Korytov LI, Suslikova MI (2014). The modeling method of enteroenteroanastomosis in small laboratory animals: Patent N 2535411 of the Russian Federation [Sposob modelirovaniya enteroenteroanastomoza u melkikh laboratornykh zhivotnykh. Patent № 2535411 Ros. Federatsiya].

9. Маслова М.Н. Молекулярные механизмы стресса // Российский физиологический журнал имени И.М. Сеченова. – 2005. – Т. 91. – № 11. – С. 1320–1328.

Maslova MN (2005). Molecular stress mechanisms [Molekulyarnye mekhanizmy stressa]. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*, 91 (11), 1320-1328.

10. Мексидол в клинике и эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – М.: Издательство РАМН, 2006. – Прил. 1. – 252 с.

Mexidol in the treatment and experiment (2006) [Meksidol v klinike i eksperimente]. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*, (1), 252.

11. Шептицкий В.А., Гуска Н.И. Са²-зависимое всасывание глюкозы в тонкой кишке крыс при антиортостатическом стрессе // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1996. – № 3. – С. 125–131.

Sheptitskiy VA, Guska NI (1996). Ca²-dependent absorption of glucose in the small intestine of rats under antiorthostatic stress [Ca²-zavisimoe vsasyvanie glyukozy v tonkoy kishke krysa pri antiortostaticheskom stresse]. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*, (3), 125-131.

12. Шептицкий В.А., Попану Л.В., Чебан Л.Н. Физиологически обоснованные подходы к поддержанию пищеварительно-транспортных функций тонкой кишки в саногенных лимитах при стрессе с помощью нутритивных факторов // Buletinul ASM. Stiinteleveții. – 2011. – Т. 315, № 3. – С. 42–50.

Sheptitskiy VA, Popanu LV, Cheban LN (2011). Physiologically-based approaches to the maintenance of digestive and transport functions of the small intestine in sanogenic limits under stress with nutritional factors [Fiziologicheski obosnovannye podkhody k podderzhaniyu pishchevaritel'no-transportnykh funktsiy tonkoy kishki v sanogennykh limitakh pri stresse s pomoshch'yu nutritivnykh faktorov]. *Buletinul ASM. Stiinteleveții*, 315 (3), 42-50.

13. Aikens J, Dix TA (1991). Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *Journal of Chemical Biology*, 266 (23), 15091-15098.

14. Shepherd EJ, Helliwel PA, Mace OJ, Morgan EL, Patel N, Kellett GL (2004). Stress and glucocorticoid inhibit apical GLUT2-trafficking and intestinal glucose absorption in the rat small intestine. *Journal of Physiology (L.)*, 560 (1), 281-290.

Сведения об авторах Information about the authors

Корытов Леонид Иннокентьевич – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 20-76-36; e-mail: KorytovLI@yandex.ru)

Korytov Leonid Innokentyevich – Doctor of Medical Sciences, Professor, Leading Research Officer of the Laboratory of Pathophysiology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Professor of the Department of Hominal Physiology of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, Timiryazev str., 16; tel.: +7 (3952) 20-76-36; e-mail: KorytovLI@yandex.ru)

Гребёнкина Людмила Анатольевна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Grebyonkina Lyudmila Anatolyevna – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Pathophysiology of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Сусликова Мария Игоревна – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (664003, г. Иркутск, ул. Красного Восстания, 1)

Suslikova Maria Igorevna – Candidate of Medical Sciences, Senior Lecturer of the Department of Hominal Physiology of Irkutsk State Medical University (664003, Irkutsk, Krasnogo Vosstaniya str., 1)