

Вяткин В.А., Бутолин Е.Г., Савинова Н.В., Иванов В.Г., Данилова О.В.

## Влияние кальция на обмен коллагена в губчатой костной ткани у крыс с аллоксановым диабетом

ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск

Vyatkin V.A., Butolin E.G., Savinova N.V., Ivanov V.G., Danilova O.V.

### Calcium effect on collagen metabolism in the spongy bone tissue in alloxan-induced rats

#### Резюме

С целью выяснения влияния на обмен костного коллагена экзогенного кальция крысам с аллоксановым диабетом парентерально вводили глюконат кальция. В ходе экспериментальной работы проведен сравнительный анализ показателей метаболизма коллагена I типа у подопытных животных при введении кальция и крыс с аллоксановым диабетом. В группе исследуемых грызунов установлена интенсификация процессов метаболизма коллагена I типа в губчатой костной ткани с преобладанием анаболических процессов по сравнению с животными с экспериментальным диабетом.

**Ключевые слова:** кальция глюконат, PINP,  $\beta$ -CrossLaps, диабетическая остеопения, коллаген I типа

#### Summary

In order to determine the effect of exogenous calcium on bone collagen metabolism alloxan-induced rats parenterally administered calcium gluconate. During the experimental work carried out comparative analysis of the metabolism of collagen type I in experimental animals when administered calcium and rats with alloxan diabetes. In the group studied rodents installed intensification type I collagen metabolism in the spongy bone with a predominance of anabolic processes as compared to animals with experimental diabetes.

**Key words:** calcium gluconate, PINP,  $\beta$ -CrossLaps, diabetic osteopenia, type I collagen

#### Введение

К числу хронических осложнений СД относят различные формы диабетической остеопатии [1]. Многочисленными клиническими исследованиями подтверждено, что остеопения у больных СД всегда приводит к учащению случаев переломов и увеличению срока их заживления, и, следовательно, к снижению качества жизни [2].

Многие стороны рассматриваемой проблемы, вопреки серьезным успехам, достигнутым в области изучения патогенеза, диагностики и лечения СД, остаются недостаточно ясными. По данным литературы, частота поражения костной ткани (снижение минеральной плотности костной ткани (МПКТ)) в области поясничного отдела позвоночника и различных участках бедренной кости при СД колеблется в весьма широких пределах: 6,8-90% [2]. Не полностью выяснен и патогенез развития диабетической остеопении [3].

В настоящее время установлено, что соли кальция играют важную роль в первичной и вторичной профилактике остеопороза и необходимы в его комплексном лечении с большинством антиостеопоротических препаратов [4]. Тем не менее, информации о терапевтическом применении препаратов на основе солей кальция у больных с диабетической остеопатией недостаточно. В то же время

не выяснено влияние экзогенного кальция на метаболизм коллагена I типа, учитывая высокий потенциал взаимодействия данного биополимера с неорганическими и органическими компонентами костной ткани, а также его важнейшую роль в обеспечении прочностных свойств кости.

Аминотерминальный пропептид проколлагена I типа (PINP) является маркером формирования костной ткани и отражает интенсивность биосинтеза коллагена I типа [5]. В результате совокупного действия катаболических факторов, от молекулы коллагена I типа в ходе его распада отщепляются amino- и карбокситерминальные фрагменты, называемые N- (NTX-I) и C-концевыми телопептидами (CTX-I), связанными поперечными «сшивками» соответственно. CTX-I представлен двумя формами:  $\alpha$ -CTX и  $\beta$ -CTX.  $\beta$ -CTX в аминокислотной последовательности Глу-Лиз-Ала-Гис-Асп-Гли-Гли-Арг содержит  $\beta$ -изомеризованную аспарагиновую кислоту (син.:  $\beta$ -CrossLaps –  $\beta$ -isomerized carboxy-terminal cross-linking region of collagen type I,  $\beta$ -изомеризованный карбокситерминальный участок коллагена I типа с поперечными сшивками) и является специфическим маркером костной резорбции, отражая интенсивность распада коллагена I типа в относительно старой костной ткани [6].

**Материалы и методы**

Эксперимент проведён на 60 беспородных белых 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 воде и корму. Получена одобрительная форма локального этического комитета аппликационный № 371 от 23 июня 2013 года.

Инсулинзависимый сахарный диабет моделировали путём однократного подкожного введения аллоксана тетрагидрата («Sigma-Aldrich», США) в дозе 170 мг/кг массы тела животного [7]. Летальность в ходе эксперимента составила 39%. Крыс с аллоксановым диабетом поделили на 2 группы. Для выяснения влияния экзогенного кальция на обмен костного коллагена при сахарном диабете, животным на фоне аллоксанового диабета вводили внутримышечно кальция глюконат («Кальция глюконат-Виал», КНР), растворённый в 0,5 мл 0,9% растворе хлорида натрия в дозе 130 мг/кг массы тела животного через день [8]. Воспроизведение диабета контролировали по развитию гипергликемии и увеличению количества гликозилированного гемоглобина. Концентрацию глюкозы в плазме крови определяли глюкозооксидазным методом («Ольвекс Диагностикум»); уровень гликозилированного гемоглобина (HbA1c) в цельной крови – с применением тест-системы «Nycocard-HbA1c» на рефлектометре «Nycocard Reader II».

Контролем послужили 10 крыс, которым однократно ввели 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Животных выводили из эксперимента под кратковременным

эфирным наркозом на 21 и 28 дни. В теле 2 поясничного позвонка определяли: количество суммарного коллагена (СК) [9], P1NP (ИФА, ELISA; Cloud-Clone Corp., США) и  $\beta$ -CrossLaps (ИФА, ELISA; IDS SERUM CrossLaps®, Великобритания). Кроме того, в навесках образцов губчатой костной ткани массой 5 мг методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (на спектрометре «Spectro flame modulas», Германия) определяли уровень кальция. В плазме крови также измеряли концентрацию общего кальция унифицированным колориметрическим методом (набор реагентов CALCUM «FL-E», «Витал Диагностикс», Санкт-Петербург).

Количество СК выражали в миллимоль гидроксипролина на 1 кг сухой ткани (ммоль/кг), P1NP и  $\beta$ -CrossLaps – в пикомолях на 1 мл надосадка гомогената (пг/мл), концентрацию глюкозы и общего кальция в плазме крови – миллимолях на литр (ммоль/л), количество кальция в костной ткани – в молях на 1 килограмм ткани (моль/кг).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 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 животным привело к развитию гипергликемии и увеличению концентрации HbA1c. Уровень глюкозы в плазме крови натощак составил 194% ( $p=0,0002$ ) и 152% ( $p=0,0004$ ) от контроля (4,77 [4,35;

**Таблица 1. Влияние кальция на обмен коллагена I типа в губчатой костной ткани у крыс с аллоксановым диабетом на фоне введения глюконата кальция**

Показатель	Контроль n=10	Аллоксановый диабет		Аллоксановый диабет + кальция глюконат	
		21 день n=10	28 день n=10	21 день n=8	28 день n=8
СК, ммоль/кг	100,7 [91,5; 119]	176,2*** [155,6; 205,9]	105,3 [100,7; 118,9]	173,9** [144,2; 196,8]	240,3***;### [185,4; 274,6]
P1NP, пг/мл	61 [46,8; 81]	14,05** [0; 39,2]	16,2*** [4,3; 27,4]	143*; [122,8; 192,1]	119,4*; [85,8; 161,3]
$\beta$ -CrossLaps, пг/мл	0 [0; 2,5]	26,9*** [21,2; 32,4]	18,1*** [15; 19,5]	107,7***;## [83; 141,7]	98,3***;### [84,8; 125,9]

*Примечания:* 1) p – достоверность различий с контролем (\*) и между опытными группами «Аллоксановый диабет» и «Аллоксановый диабет + кальция глюконат» (#); (\*, # –  $p < 0,05$ ; \*\*, ## –  $p < 0,01$ ; \*\*\*, ### –  $p < 0,001$ ). 2) СК – суммарный коллаген; P1NP – аминоктерминальный пропептид проколлагена 1-го типа, маркер формирования костной ткани;  $\beta$ -CrossLaps ( $\beta$ -isomerized carboxy-terminal cross-linking region of collagen type 1) –  $\beta$ -изомеризованный карбокситерминальный участок коллагена 1-го типа с поперечными сшивками, маркер резорбции костной ткани.

Таблица 2. Концентрация кальция в плазме крови и в губчатой костной ткани у крыс с аллоксановым диабетом на фоне введения глюконата кальция

Показатель	Контроль n=10	Аллоксановый диабет		Аллоксановый диабет + кальция глюконат	
		21 день n=10	28 день n=10	21 день n=8	28 день n=8
Кальций в плазме крови, ммоль/л	2,31 [2,31; 2,5]	2,31 [2,12; 2,5]	2,25 [2,19; 2,31]	2,06***;## [1,92; 2,12]	2,04** [1,92; 2,26]
Кальций в костной ткани, моль/кг	5,33 [4,97; 5,85]	4,33* [3,93; 4,79]	3,81*** [3,6; 3,86]	3,69** [3,32; 4,72]	4,36** [3,45; 4,59]

Примечания: 1) p – достоверность различий с контролем (\*) и между опытными группами «Аллоксановый диабет» и «Аллоксановый диабет + кальция глюконат» (#); (\*, # – p<0,05; \*\*, ## – p<0,01; \*\*\*, ### – p<0,001).

5,08] ммоль/л) на 21 и 28 дни эксперимента соответственно. Количество HbA1c увеличилось на 35% (p=0,0002) и 39% (p=0,0003) по сравнению с контролем (4,15 [4,0; 4,3] %) соответственно на 21 и 28 дни наблюдения.

У крыс с аллоксановым диабетом на фоне введения кальция глюконата концентрация глюкозы и HbA1c на 21 день опыта выросла до 15,1 [11,7; 17,3] ммоль/л (p=0,008) и 5,8 [4,8; 6,1] % (p=0,0007) соответственно; на 28 день значения данных показателей были выше соответственно на 78% (p=0,0008) и 11% (p=0,0006) по сравнению с контролем. Характер изменений данных показателей позволяет говорить о развитии диабета у экспериментальных животных.

На усиление катаболических процессов в костной ткани у экспериментальных животных при парентеральном введении им кальция по сравнению с контролем указывает увеличение концентрации  $\square$ -CrossLaps на 21 и 28 дни наблюдения в теле 2 поясничного позвонка (таблица №1).

Интенсификация костной деструкции видна также по снижению количества кальция в губчатой костной ткани на протяжении всего эксперимента. Количество кальция в теле 2 поясничного позвонка у крыс с инсулинозависимым диабетом на фоне введения кальция глюконата было ниже на протяжении всего эксперимента по сравнению с контролем (таблица №2).

Вероятной причиной таких изменений представляется накопление в костной ткани конечных продуктов неферментативного гликозилирования белков (AGEs – advanced glycation end products) [10, 11]. Действие AGEs на клеточный метаболизм может быть внутриклеточным и внеклеточным, опосредованным через рецепторы к AGEs (RAGE – receptors of AGEs) [12]. взаимодействие AGE-RAGE вызывает активацию ядерного фактора каппа В (NF-kB), таким образом стимулируя остеокластогенез и, следовательно, костную резорбцию [11].

С другой стороны, более высокое количество PINP и СК на 21 и 28 дни наблюдения в теле 2 поясничного позвонка (таблица №1) у изучаемых животных по сравнению с контролем свидетельствует об активизации анаболизма в губчатой костной ткани. Данный феномен может быть обусловлен следующим: увеличение функциональной активности остеокластов и их количества посредством накопления AGEs может приводить к усилению синтеза и выделения в участке резорбции кости факторов дифференцировки остеобластов, таких как TGF- $\square$ , KMB-6 и кардиотропин-1, что в итоге приводит к росту количества остеобластов [13].

На 21 и 28 дни наблюдения концентрация  $\beta$ -CrossLaps в теле 2 поясничного позвонка у экспериментальных животных на фоне введения кальция глюконата была повышена соответственно  $\approx$  в 4 (p=0,004) и  $\approx$  5 раз (p=0,0004) соответственно (таблица №1).

Концентрация PINP на 21 и 28 дни наблюдения были выше соответственно в  $\approx$  10 (p=0,02) и  $\approx$  7 раз (p=0,0004) у грызунов с экспериментальным диабетом на фоне введения кальция в сравнении с животными с аллоксановым диабетом (таблица №1).

При сравнительном анализе изменений количества суммарного коллагена во 2 поясничном позвонке у крыс с аллоксановым диабетом при введении им глюконата кальция и аллоксан-индуцированных животных выявлено, что содержание изучаемого показателя у анализируемых животных повышалось на 128% (p=0,0004) на 28 день опыта (таблица №1).

Концентрация общего кальция в плазме крови подопытных животных, которым вводили глюконат кальция уменьшалась на 21 и 28 дни наблюдения соответственно на 10,8% (p=0,0002) и 11,7% (p=0,002) по сравнению с контролем (таблица №2). Сравнительный анализ значений данного показателя у крыс изучаемой группы и аллоксан-индуцированных грызунов выявил, что у последних концентрация общего кальция в плазме крови была выше на 12,1% (p=0,001) на 21 день эксперимента (таблица №2).

Парадоксальным представляется снижение концентрации общего кальция, выявленное в плазме крови исследуемых подопытных животных на 21, 28 дни опыта по сравнению с контролем и на 21 день наблюдения по сравнению с изучаемым показателем у грызунов с аллоксановым диабетом. Весьма вероятными причинами наблюдаемого феномена выступают, на наш взгляд, биологические эффекты кальцитонина. Несмотря на сотни исследований, физиологическая роль кальцитонина в полной мере остаётся не выясненной [14]. Тем не менее, установлены соответствующие биологические эффекты характерные для данного гормона в крови, костной ткани, центральной нервной системе, почках, дыхательной системе и желудочно-кишечном тракте [14]. В нашем случае, парентеральное введение глюконата кальция могло вызвать стимуляцию секреции кальцитонина, и в совокупности с эффектами AGEs обуславливать ускоренное выведение кальция через ЖКТ и почки. В этом свете снижение количества кальция в диафизе бедренной кости у изучаемых животных по сравнению с данным показателем у аллоксан-индуцированных крыс на 28 день эксперимента обусловлено, скорее всего, компенсирующим гипокальциемии действием паратгормона (ПТГ) [14]. Таким образом, мы допускаем, что у животных с экспериментальным диабетом на фоне парентерального введения кальция возможно увеличение концентрации в крови как кальцитонина, так и ПТГ. В свете представленного, развитие вторичного гиперпаратиреоза может быть вероятной причиной роста уровня  $\beta$ -CrossLaps в губчатой костной ткани поясничного позвонка [13] у грызунов экспериментальной группы №3 на 21 и 28 дни опыта по сравнению с животными с аллоксановым диабетом. Активация остеобластогенеза согласно описанным выше механизмам [13] может объяснять увеличение концентрации PINP в теле 2 поясничного позвонка на 21 и 28 дни

наблюдения у грызунов с экспериментальным диабетом при введении им кальция группы по сравнению с грызунами с аллоксановым диабетом.

Кроме того, в ряде экспериментальных работ *in vitro* на культурах костных клеток было продемонстрировано увеличение функциональной активности и количества остеобластов под действием кальцитонина, проявляющееся усилением продукции коллагена и минерализации. При этом предполагалась прямое действие кальцитонина на остеобласты [15]. Последнее обстоятельство, на наш взгляд, может объяснять рост концентрации PINP в теле 2 поясничного позвонка у исследуемых животных на 21 и 28 дни наблюдения по сравнению с животными с экспериментальным диабетом. То же справедливо и в отношении увеличения количества СК на 28 день наблюдения в теле 2 поясничного позвонка по сравнению с животными с аллоксановым диабетом.

## Заключение

Таким образом, у животных с экспериментальным диабетом при введении им кальция в губчатой костной ткани отмечается рост интенсивности как катаболических, так и анаболических процессов с преобладанием процессов синтеза на 21 и 28 дни эксперимента по сравнению с крысами с аллоксановым диабетом. ■

*Вяткин В.А., Буталин Е.Г., Савинова Н.В., Иванов В.Г., Данилова О.В., ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск; Автор, ответственный за переписку - Вяткин В.А. – очный аспирант кафедры биохимии ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск. Адрес для переписки: 426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281. Тел.: 8 912 759 1332, e-mail: vyatkinva@yandex.ru.*

## Литература:

1. Дедов И.И., Шестакова М.В., редакторы. Сахарный диабет: острые и хронические осложнения. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2011.
2. Abdulateer S.A., Sulaiman S.A.S, Hassali M.A.A., Subramaniam K., Sahib M.N. Osteoporosis and type 2 diabetes mellitus: what do we know, and what we can do? *Patient Prefer Adherence*. 2012; 6: 435-48. DOI: <http://dx.doi.org/102147/PPA.S32745>.
3. Abuhashish H.M., Al-Rejaie S.S., Al-Hosaini K.A., Parmar M.Y., Ahmed M.M. Alleviating effects of morin against experimentally-induced diabetic osteopenia. *Diabetol Metab Syndr*. 2013; 5: 5. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186/1758-5996-5-5>.
4. Рожинская Л.Я. Диагностика и лечение остеопороза. *Клиническая геронтология*. 2007; (2): – 37-46.
5. Krege J.H., Lane N.E., Harris J.M., P.D. Miller. PINP as a biological response marker during teriparatide treatment for osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2014; 25 (9): 2159-71. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-014-2646-0>.
6. Li M., Li Y., Zhang Z et al. Chinese Bone Turnover Marker Study: Reference Ranges for C-Terminal Telopeptide of Type I Collagen and Procollagen I N-Terminal Peptide by Age and Gender *PLoS ONE*. 2014; 9 (8): e103841. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0103841>.
7. Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Шорин Ю.П. Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллоксана. *Проблемы эндокринологии*. 1987; (4): 65-68.
8. Imanishi Y., Hall C., Sablosky M., Brown E.M., Arnold A. A New Method for In Vivo Analysis of Parathyroid Hormone–Calcium Set Point in Mice. *J. Bone Miner. Res*. 2002; 17 (9): 1656-61. DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.9.1656>.
9. Шараяев, П.Н., Богданов Н.Г., Ямолдинов Р.Н. Об

- обмене коллагена в коже при различной обеспеченности организма витамином К. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1976; 81 (6): 665-6.
10. Oei L., Rivadeneira F., Zillikens M.C., Oei E.H. *Diabetes, Diabetic Complications, and Fracture Risk*. *Curr Osteoporos Rep*. 2015; 13: 106-16. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11914-015-0260-5>.
  11. Vestergaard P. *Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients type 1 and type 2 diabetes – a meta-analysis*. *Osteoporos Int*. 2007; 18 (4): 427-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00198-006-0253-4>.
  12. 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): 1143-52. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-1817>.
  13. Jilka R.L., O'Brien C.A., Bartell S.M., Weinstein R.S., Manolagas S.C. *Continuous Elevation of PTH Increases the Number of Osteoblasts via Both Osteoclast-Dependent and -Independent Mechanisms*. *J. Bone Miner Res*. 2010; 25 (11): 2427-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.145>.
  14. Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., editors. *Principles of bone biology*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2002.
  15. Martin T.J., Sims N.A. *Calcitonin Physiology, Saved by a Lysophospholipid*. *J. Bone Miner. Res*. 2015; 30 (2): 212-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.2449>.