

УДК 577.118.352.4:616.53-004

ВМІСТ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОГО Ca^{2+} В КОЛОНОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Дробінська О. В., Кравченко О. О., Артеменко О. Ю., Остапченко Л. І.

Досліджено вміст іонів Ca^{2+} в цитозолі клітин товстого кишечника щурів в динаміці розвитку виразкового коліту. Встановлено зростання вільного внутрішньоклітинного Ca^{2+} у 2 рази порівняно з контролем. При цьому спостерігались деструктивно-ерозивні ушкодження слизової оболонки товстої кишки, які супроводжувались проявом гострих симптомів виразкового коліту. За умов застосування канцерогену рівень Ca^{2+} перевищував контрольні значення на 50%, 40%, 14% у відповідні терміни досліджень, що супроводжувалось потовщенням слизової оболонки, а на 8-10 тиждень аномальними новоутвореннями, які розташовувались переважно в проксимальному відділі товстого кишечника.

Ключові слова: цитоплазматичний кальцій, колоноцити, виразковий коліт.

ВСТУП

На сьогоднішній день одним з найпоширеніших захворювань серед населення України є рак товстої кишки. До факторів ризику, які сприяють розвитку цієї патології можна віднести виразковий коліт. Виразковий коліт (ВК) – хронічний запальний процес з дистрофічними та атрофічними деструктивними змінами слизової оболонки товстої кишки, що супроводжується порушеннями її секреторних і моторних функцій.

Одним із основних цитотоксичних факторів розвитку даної патології є порушення транспорту води та електролітів у товстому кишечнику. Здатність стимулювати секрецію натрію і хлору притаманна вільному внутрішньоклітинному кальцію [1, 2].

Іони Ca^{2+} виконують роль універсального внутрішньоклітинного месенджера, оскільки завдяки короткочасним змінам концентрації даних катіонів у цитозолі здійснюється регуляція таких важливих процесів, як експресія генів, диференціація та проліферація клітин, глікогеноліз, іонний транспорт [1, 3].

Порушення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу здатне спричинювати розвиток різноманітних патологічних змін в організмі, а довготривале підвищення концентрації Ca^{2+} призводить до апоптичної загибелі клітини [3].

Дослідження останніх років виявили вплив іонів Ca^{2+} на цитоскелет, нексуси та щільні міжклітинні контакти в епітелії [5,6,10]. Епітеліоцити кишечника мають багато іонних каналів, переносників та насосів, які локалізовані на люмінальній (апикальній) та базолатеральній мембранах і забезпечують ефективний транспорт води та іонів [7, 11]. Всмоктування води, електрогенної та електронейтральної абсорбції NaCl , активної сорбції K^+ та коротколанцюгових жирних кислот, які продукуються кишечною мікрофлорою, секреції NaCl , KCl , HCO_3^- та слизу є основними функціями епітеліальних клітин товстого кишечника, порушення яких призводить до розвитку коліту [7 – 9]. За останніми даними іони Ca^{2+} шляхом регуляції функціонування клітинних рецепторів

ВМІСТ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОГО Ca^{2+} В КОЛОНОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

беруть участь у активації і (або) пригніченні електронейтральної абсорбції. Кальцій також бере участь у регуляції транспорту K^+ та Cl^- , активуючи відповідні канали. Інгібування Ca^{2+} - залежних хлорних каналів часто пов'язують з дією токсинів та ентеровірусів, що спричинює діарею [9,11]. Зростання концентрації кальцію обмежує активність базолатеральних K^+ -каналів та посилює люмінальну секрецію Cl^- . Ca^{2+} є регулятором такої важливої функції колоноцитів, як карбахол-, гістамін- та простагландин-стимульована секреція слизу [11].

Стійке порушення кальцієвого гомеостазу спричинює розвиток клітинних патологій, що може бути пов'язаним з впливом даного месенджера на проліферацію клітин [7].

Метою роботи було дослідити вміст цитозольного кальцію в клітинах товстого кишечника щурів в динаміці розвитку виразкового коліту і на початкових етапах розвитку онкопатологій відповідної локалізації.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно Європейської конвенції.

Експерименти проводились на нелінійних білих щурах самцях масою 150–180 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Модель експериментального виразкового коліту створювали за методичними рекомендаціями [12]. Для цього питну воду піддослідних тварин замінили на 1% розчин сульфат натрієвої солі декстрану ($M_n=35000-50000$). Переродження клітин товстої кишки викликали згідно до [13]. Канцероген – диметилгідрозин вводили підшкірно кожен тиждень, після впливу натрієвої солі декстрану, протягом відповідних строків спостереження. Клітини товстої кишки виділяли за методом [14]. Вміст кальцію досліджували на 1, 3 і 7 добу розвитку виразкового коліту і на 2, 4, 6, 8 і 10 тиждень за дії канцерогенної речовини.

Концентрацію вільного цитозольного кальцію виміряли за допомогою зонду індо-1 (Sigma, США). Отримані колоноцити ($2 \cdot 10^7$ /мл) навантажували зондом (5 мкМ) протягом 30 хв. при 25°C , відмивали від надлишку зонду центрифугуванням (600 г, 15 хв.) та ресуспендували у буфері. Спектр флюорисценції індо-1 визначали на спектрофлюориметрі СДЛ-2 (ЛОМО, Росія), $\lambda_{\text{збудж}} - 350 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{випр.}} - 410 \text{ нм}$ та 495 нм. Концентрацію Ca^{2+} розраховували за двохвильовим параметром R [15]. Вміст Ca^{2+} виражали у процентах відносно контролю.

Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Слизовій оболонці товстої кишки притаманна фізіологічна здатність до швидкого відновлення завдяки балансу між проліферацією і злущуванням клітин [7]. В представленій роботі було оцінено стан слизової оболонки товстої кишки у процесі запалення та на ранніх етапах розвитку процесів переродження клітин. На 1-шу добу після ініціації виразкового коліту нами не виявлено морфологічних змін слизової оболонки товстої кишки. На 3-тю та 7-му добу експерименту встановлено типові гострі ерозивно-запальні ушкодження, почервоніння, геморагії та набряк, що супроводжувалось

характерними симптомами коліту, до яких належить діарея та домішки крові у випорожненнях. При введенні канцерогену спостерігалось певне зменшення проявів патологічних симптомів, але вже на 6-тий тиждень відмічались локальні джерела потовщення слизової оболонки кишечника. На 8-мий тиждень впливу канцерогену у 20% щурів, а на 10-тий тиждень у 40% щурів виявлено аномальні новоутворення, які на зовнішній стороні кишки мали вигляд щільних наростів правильної округлої форми діаметром від 1 до 5 мм і розташовувались переважно в проксимальному відділі товстого кишечника.

При визначенні концентрації вільного Ca^{2+} в клітинах слизової оболонки товстої кишки в динаміці досліджуваної моделі встановлено, що на першу добу впливу декстрану, який викликає запалення, сорбуючись на стінках кишечника, помітних змін порівняно з контролем виявлено не було. Симптоми, які зазвичай супроводжують дану патологію, теж не спостерігались.

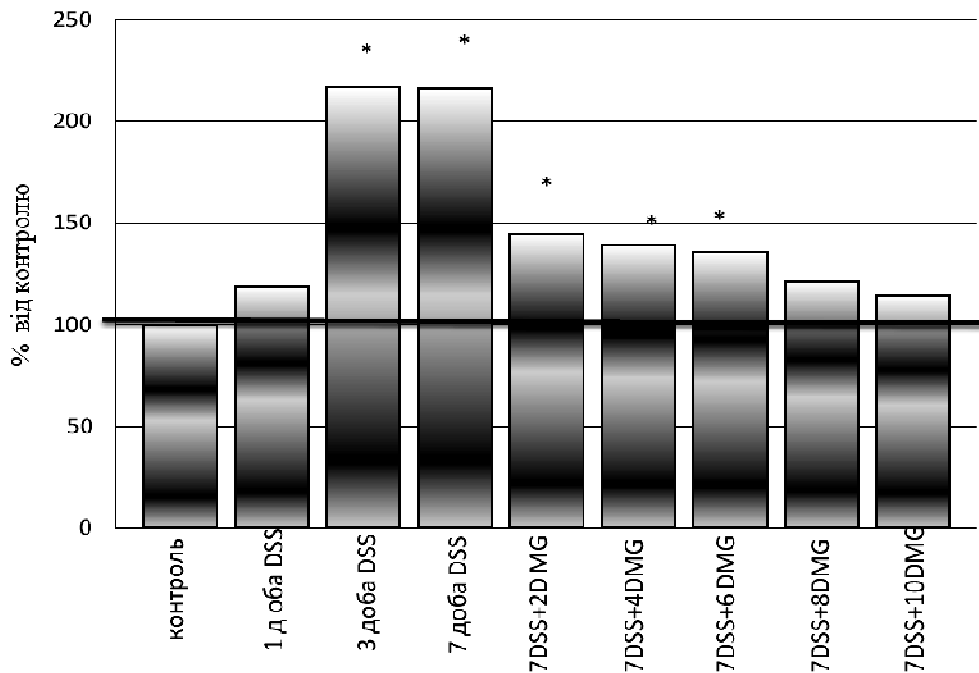


Рис. 1. Вміст цитозольного Ca^{2+} в колоноцитах щурів за розвитку виразкового коліту (1 доба ведення dextran sulfate sodium salt (DSS) – 7 доба DSS), та за дії канцерогену (7DSS+2 dimethylhydrazin (DMG) – 7DSS+10DMG). * – $P \leq 0,05$;

На третю і сьому добу введення декстрану вміст цитоплазматичного кальцію перевищував контрольні значення більш ніж в 2 рази. Треба відмітити, що в цей період спостерігається суттєве загострення симптомів коліту. Згідно з даними інших авторів у вищезазначені терміни відбувається активація кальцій-залежних хлорних каналів в результаті чого спостерігається порушення всмоктування води та діарея [11].

ВМІСТ ЦИТОПЛАЗМАТИЧНОГО Ca²⁺ В КОЛОНОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ВИРАЗКОВОГО КОЛІТУ

Подальше щотижневе підшкірне введення канцерогену (диметилгідразину) призводило до поступового зниження концентрації кальцію і зменшення зовнішніх проявів запалення. Через 2, 4- 10 тижнів після впливу декстрану і диметилгідразину рівень Ca²⁺ був на 50%, 40%, 14% відповідно вище контрольних значень.

Варто відмітити, що за дії запального фактору нами встановлено зростання вмісту внутрішньоклітинного Ca²⁺ більш ніж у 2 рази в порівнянні з фізіологічним контролем, тоді як ініціація процесів неконтрольованої проліферації клітин супроводжувалась поступовим зниженням рівня цитозольного Ca²⁺. Аалогічні дані були отримані іншими авторами, які встановили зростання вмісту кальцію за умов дії апоптогенних чинників на тимоцити [1].

ВИСНОВКИ

Таким чином, в результаті проведеної нами роботи було встановлено, що процеси розвитку виразкового коліту супроводжуються значним підвищенням рівня цитоплазматичного Ca²⁺, що може бути причиною порушення регуляторних внутрішньоклітинних процесів, які забезпечують нормальне функціонування клітин слизової оболонки товстого кишечника.

Список літератури

1. Кальций – регулятор метаболизма /Сборник научных трудов под ред. М.А. Медведева.- Томск.:Мед. И-тут, 1997. - С.152.
2. Ткачук В. А. Мембранные рецепторы и внутриклеточный кальций // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, №1. – С. 10-15.
3. Физико-химические основы патологии клетки / Под ред. Ю. А. Владимирова. – М.: МГУ, РГМУ, 1998. – 150с.
4. Гребінник Д. М. Кальцієвий гомеостаз на ранніх етапах апоптозу тимоцитів щурів // Автореф. дис.на здобуття наук ступ. к.б.н. – К.: КНУ ім. Т. Шевченка – 2005. – 20 с.
5. Carafoli E. Control of Ca²⁺ signaling: focus on the plasma membrane Ca²⁺ // Укр.біохім.журн. – 2005. – Т.77, № 2 (спеціальний випуск).
6. Grant C. Churchill, Monica M. Lurtz, and Charles F. Louis Ca²⁺ regulation of gap junctional coupling in lens epithelial cells // Am J Physiol Cell Physiol. – 2002. – Vol.281. – I. 3. – P. 972-C981,
7. Peter R. Holt, Nadir Arber, Balazs Halmos, Kenneth Forde Colonic Epithelial Cell Proliferation Decreases with Increasing Levels of Serum 25-Hydroxy Vitamin D // Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention – 2002. – Vol. 11 – P. 113-119
8. Капля А.А., Хижняк С.В., Кудрявцева А.Г., Папагеоргакопулу Н., Осинский Д.С. Изоферменты Na⁺, K⁺-АТФ –азы и Ca²⁺- АТФ-азы в злокачественных новообразованиях // Укр. біохім. журн. – 2006. – Т.78, №1. – С. 29-39.
9. Pomorski P. Calcium signaling and cytoskeleton// Укр.біохім.журн. – 2005. – Т.77, № 2 (спеціальний випуск).
10. S. Krisanaprakornkit, D. Jotikasthira and B.A. Dale Intracellular Calcium in Signaling Human β -Defensin-2 Expression in Oral Epithelial Cells // J. Dent. Res. – 2003. – Vol. 82, №11. – P. 877-882.
11. Karl Kunzelmann and Marcus Mall Electrolyte Transport in the Mammalian Colon: Mechanisms and Implications for Disease // Physiological Reviews – 2002. – Vol. 82, No. 1. – P. 245-289.
12. Brooke Sayer, Jun Lu, Christina Green, Johan D Söderholm, Mahmood Akhtar and Derek M McKay Dextran sodium sulphate-induced colitis perturbs muscarinic cholinergic control of colonic epithelial ion transport // British Journal of Pharmacology. – 2002. – Vol. 135. – P.1794 – 1800.

13. Jian-Guo Wang, Dong-Fei Wang, Bing-Jian Lv, Jian-Min Si A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium // World J Gastroenterol. – 2004. – Vol.10, №20, - P.2958-2962.
14. Roediger W. E. W., Truelove S. C. Methods of preparing isolated colonic epithelial cells (colonocytes) for metabolic studies // Gut. – 1979. – Vol. 20. – P. 484-488.
15. Gryniewicz, G., M. Poenie, and R. Y. Tsien.. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260. – P. 3440-3450.

Дробинская О.В., Кравченко О.А., Артеменко А. Ю., Остапченко Л.И. Сожержание цитоплазматического Ca²⁺ в колоноцитах крыс во время развития язвенного колита // Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского. - 2007. - Серия «Биология, химия». – Т. 20 (59), № 1. – С. 146-150.

Исследовано содержание ионов Ca²⁺ в цытозоле клеток толстого кишечника при развитии язвенного колита. Показано возрастание свободного внутриклеточного Ca²⁺ в 2 раза по сравнению с контролем. При этом наблюдались деструктивно-эрозивные повреждения слизистой оболочки толстого кишечника, которые сопровождались типичными симптомами язвенного колита. При действии канцерогена, влияющего на эпителиоциты соответствующей локализации, уровень Ca²⁺ превышал контрольные значения на 50%, 40% и 14% в соответствующие сроки исследования, что сопровождалось утолщением слизистой оболочки, а на 8-10 неделю аномальными новообразованиями, локализованными преимущественно в проксимальном отделе толстого кишечника.

Ключевые слова: цитоплазматический кальций, колоноциты, язвенный колит.

Drobinskaya O.V., Kravchenko O.A., Artemenko O.Yu., Ostapchenko L.I. Cytoplasmic Ca²⁺ content in rat colonocytes under ulcerative collits development // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series "Biology, chemistry". – 2007. – Vol. 20 (59), № 1. – P. 146-150.

Ion Ca²⁺ content was investigated in colonocyte cytosol under ulcerative colitis development. The increase of free endocellular Ca²⁺ in 2 times is shown in comparison with the control. Destructive-erosive injuries of colon mucosa and typical colitis symptoms were determined in the same conditions. At action of the carcinogen the level of Ca²⁺ exceeded control values on 50 %, 40 % and 14 % in corresponding terms of the research that was accompanied by a thickening of a mucous, and for 8-10 week abnormal local infiltrations, localized mainly in proximal colon.

Keywords: cytoplasmic Ca²⁺, colonocytes, ulcerative collits.