

А. О. Мірошніченко, В. П. Ляшенко, С. М. Лукашов

## Вплив стресу різного генезу на накопичення кальцію в печінці та її функціональну активність

*Изучали динамику содержания кальция в печени крыс под воздействием алиментарного и иммобилизационного видов стресса. С целью оценки функционального состояния печени проводилась одновременная регистрация содержания холестерина в сыворотке крови. Обнаружено, что в данных условиях происходит накопление кальция в указанном органе, что положительно коррелирует со степенью холестеринемии. При длительном действии стрессоров наблюдаемое явление наиболее выражено в группе животных, подверженных иммобилизационному стрессу, в сравнении с группой животных, находившихся под влиянием алиментарного стресса. Приводятся сведения, показывающие, что динамическое насыщение печени кальцием является отражением стадий протекания стресса. Предполагается, что кальций служит триггером биосинтеза холестерина в клетках печени при стрессе. Таким образом, продемонстрирована адаптационная реакция печени и возможный механизм возникновения гиперхолестеринемии в условиях стресса различного генеза.*

### ВСТУП

Відомо, що стрес – це захисно-адаптаційна неспецифічна відповідь організму на будь-який фактор, що порушує його гомеостаз. При цьому має значення кількість та якість стресора, що визначають патерн нейроендокринної реакції [11, 14, 16]. Важливе місце у вторинному опосередкуванні цієї реакції займає кальцій, який запускає відповідний ферментативний каскад [21, 24 25]. Безпосередню участь у відповіді на стрес бере печінка [17, 20] як центральний орган усіх видів обміну речовин в організмі, зокрема обміну холестерину, а також як головний постачальник вільних радикалів [2, 9]. Незважаючи на великий потік інформації щодо проблеми стресу, його роль у порушенні кальцієвого гомеостазу у печінці вивчена недостатньо. Нез'ясованим також залишається питання про ступінь патогенності різних стрес-факторів. Тому метою нашої роботи було вивчення динаміки вмісту кальцію у печінці інтактних тварин та тварин, які знаходилися

під впливом стресу різного генезу, а також дослідження функціонального стану їх печінки за вмістом холестерину у сироватці крові.

### МЕТОДИКА

Дослідження проводили на нелінійних щурах-самцях масою 125 – 275 г, вік яких на початку експерименту був 2 міс. Щурів поділили на три групи. Тварини I групи (n=31) були контрольними. У тварин II групи (n=56) викликали аліментарний стрес у вигляді гіперхолестеринемії (ГХЕ) щодобовим доданням до їжі холестерину (0,5 г/кг), метилтіоурацилу (0,1 г/кг), солей жовчних кислот (100 мг/кг). Метилтіоурацил пригнічує функцію щитовидної залози, що сприяє розвитку ГХЕ через зниження основного обміну. Солі жовчних кислот стимулюють виділення жовчі, яка поліпшує розщеплення та всмоктування жирів у шлунково-кишковому тракті. У тварин III групи (n=49) викликали імобілізаційний стрес обмеженням життєвого прос-

тору до 8 – 10 см<sup>2</sup> на одну особину. Цей стресор відноситься до класу психоемоційних і реалізується через виражену активацію вегетативної й ендокринної систем. Відомо також, що вплив стресових агентів виявляється набагато сильніше під дією кондиціонуючих факторів, одним із яких є NaCl. Тому тваринам цієї групи до звичайного харчового раціону додавали NaCl з розрахунку 2 г/кг.

Експеримент тривав 21 тиж з реєстрацією результатів кожні 3 тиж. У контрольній групі тварин результати реєстрували через такі самі інтервали часу, що дало змогу відрізнити зміни, пов'язані з тривалістю експерименту, від змін, які викликані дією стресу. Через вказані проміжки часу тварин декапітували, розтинали черевну порожнину та забирали печінку, в якій визначали вміст кальцію за методом атомно-абсорбційної спектрометрії [13]. Функціональний стан печінки досліджували за зміною вмісту холестерину в сироватці крові, який визначали за допо-

могою метода Ілька [10]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили із застосуванням критерію t Стьюдента та кореляційного аналізу.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження вмісту кальцію в печінці щурів наведено на рис. 1. У тварин I групи вміст кальцію в печінці збільшувався від початку експерименту до 15-го тижня та знижувався на 18-му і 21-му тижнях, що пов'язано з нормальними фізіологічними процесами, які зумовлені тривалістю експерименту.

Встановлено, що концентрації кальцію в печінці щурів, які зазнавали дії обох видів стресу, перевищували відповідні контрольні значення. При цьому динаміку накопичення кальцію в печінці цих тварин можна розглядати у зв'язку з розвитком стадій стресу. Отримано переконливі свідчення того, що на

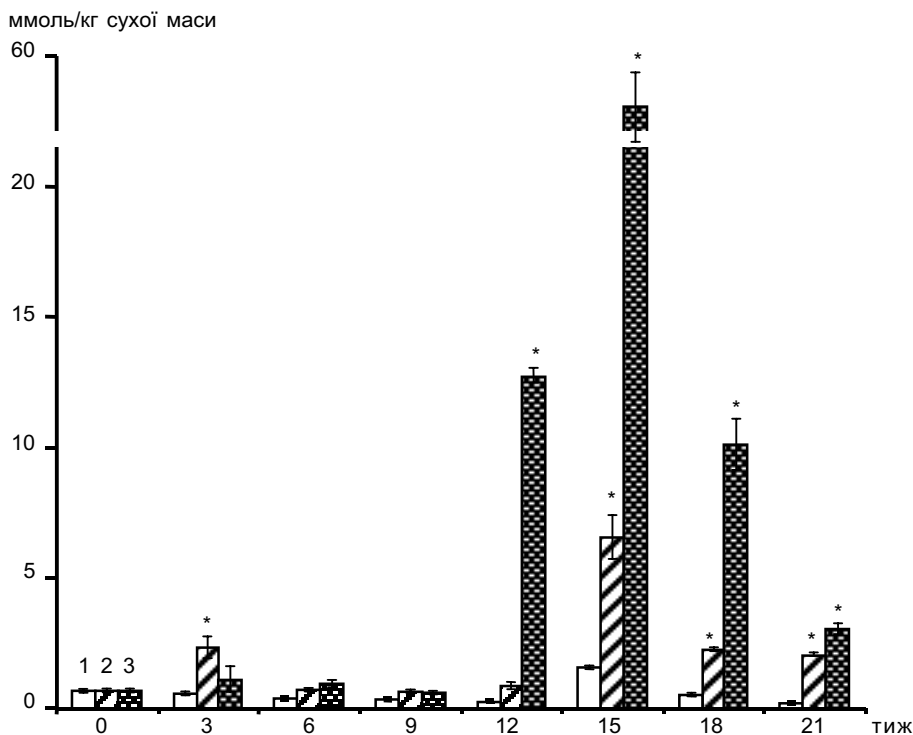


Рис. 1. Динаміка вмісту кальцію в печінці щурів: 1 – контроль, 2 – аліментарний стрес, 3 – іммобілізаційний стрес. \* P<0,05 порівняно з контролем.

першій стадії стресу (стадія тривоги) відбувається активація симпатичної нервової системи та гіпоталамо-гіпофізарно-надниркового ендокринного комплексу [11, 16]. Оскільки кальцій є вторинним посередником взаємодії медіаторів симпато-адреналової системи з  $\alpha$ -адренорецепторами гепатоцитів [12, 18, 25], то, ймовірно, саме цим частково викликано різке збільшення порівняно з контролем вмісту кальцію в печінці на 3-й тиждень. Іншою причиною даного явища є підсилення перекисного окиснення ліпідів мембран клітин печінки та зниження вмісту антиоксидантів, що спостерігається на першій стадії стресу [7]. Це, на думку деяких авторів [6], призводить до утворення іонофорів відносно  $\text{Ca}^{2+}$  та протонів, внаслідок чого підвищується проникність клітинних мембран для цих іонів, і кальцій акумулюється в клітинах. На другій стадії стресу, стадії резистентності, мобілізуються захисні сили організму при збереженні головної ролі симпатичної нервової системи та відповідних зсувів гормонального фону [11, 16]. Це дає підстави говорити, що збільшення вмісту тканинного кальцію з 3-го по 12-й тиждень експерименту відбувається більшою мірою за рахунок внутрішньоклітинного, а не позаклітинного  $\text{Ca}^{2+}$ . Для збереження гомеостазу на певному рівні клітинам печінки необхідно встановити початкову концентрацію кальцію [3, 4]. Тому, певно, на 6-му і 9-му тижнях активуються системи його виведення з клітини, завдяки чому вміст кальцію в печінці в цей період знижується порівняно з результатами на 3-му тижні. Подальша дія стресових факторів призводить, ймовірно, до стадії виснаження зі зменшенням функціональних резервів та атрофією кіркової речовини надниркових залоз, що в результаті зумовлює перевагу парасимпатичної нервової системи [14, 16]. Така ситуація призводить до “енергетичного краху” і руйнування ферментативних реакцій. Тому найбільше накопичення кальцію в печінці спостерігається на 15-му тижні, що може бути викликано як порушенням роботи іонних каналів і входом  $\text{Ca}^{2+}$  у клітину, так і виснаженням систем

виведення його з клітини. У даний час перевантаження клітин кальцієм може спровокувати їх загибель, що підтверджується результатами багатьох електронно-імуноцитохімічних досліджень [15, 19]. Після 15-го тижня експерименту концентрація кальцію в печінці тварин, які зазнавали дії стресу, знижується. Можливо, на цьому етапі досягається пік процесів деструкції гепатоцитів і, як наслідок, масивний вихід кальцію в міжклітинний простір з наступним розвитком “тканинного остеопорозу” (18 та 21 тиж).

У разі порівняння тканинного насичення печінки кальцієм у тварин II і III груп (див. рис. 1) виявляється, що на 12 - 18-му тижнях накопичення кальцію значно вище у тварин III групи, які зазнавали іммобілізаційного стресу, ніж у тварин, які знаходилися під впливом аліментарного стресу. Так, у цей термін у тварин II групи вміст кальцію перевищував контрольні значення у 4 рази, а в III групі - у 33 рази. Таким чином, іммобілізаційний стрес, що пов'язаний з перезбудженням центральних нервових структур, сильніше змінює гомеостаз кальцію, ніж аліментарний стрес, який порушує обмін речовин в організмі, зокрема обмін холестерину.

Відомо, що печінка виконує в організмі багато функцій, серед яких участь у травленні, обміні речовин, гемодинаміці. Значна також захисна роль цього органа. Поряд з цим найважливішою функцією печінки є підтримання гомеостазу холестерину в організмі [8, 9]. Тому рівень холестерину у сироватці крові може бути одним з показників функціональної активності печінки. Аналіз динаміки вмісту холестерину у сироватці крові (рис. 2) показує, що у тварин контрольної групи він зазнає незначних коливань протягом усього дослідження. Це, мабуть, пов'язано зі зміною потреби організму у холестерині під час проведення експерименту. Слід зазначити, що незначне коливання вмісту холестерину у щурів I групи знаходиться в межах норми для тварин цього віку та статі (52 - 82 мг%). У тварин II і III груп реєструється незначне збільшення вмісту холестерину з 3-го по 9-й тиж-

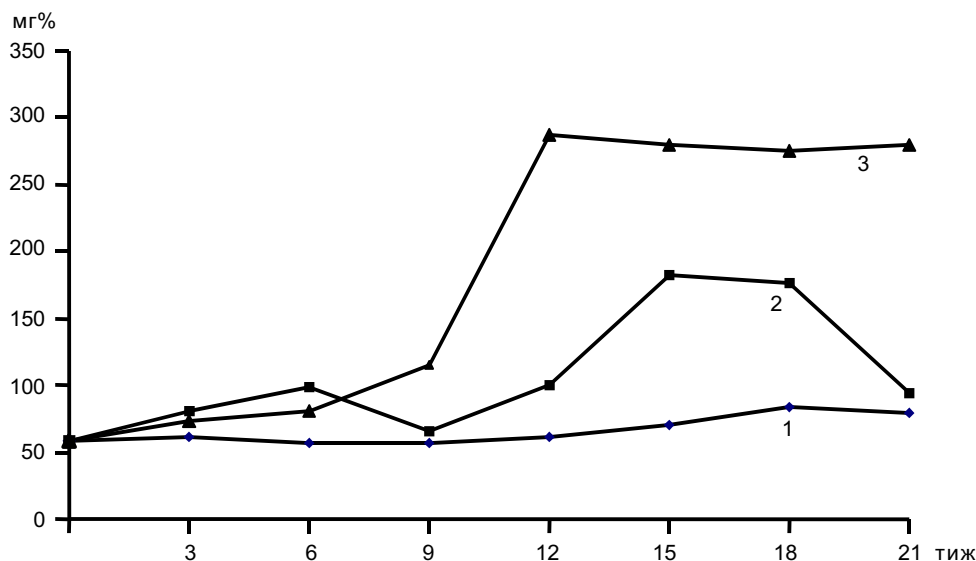


Рис. 2. Динаміка вмісту холестерину в сироватці крові щурів: 1 – контроль, 2 – аліментарний стрес, 3 – іммобілізаційний стрес.

день експерименту та значне збільшення його концентрації на 12 – 21-й тиждень ( $P < 0,05$ ). Це яскраво свідчить про те, що дія стресу викликає стійку ГХЕ тільки з 12-го тижня. Причому в тварин II групи концентрація холестерину з 12-го по 21-й тиждень перевищувала контроль удвічі, а в III групі – у 4 рази. Як показано [5, 8], причинами розвитку ГХЕ є, по-перше, збільшення надходження в організм екзогенного холестерину, по-друге, прискорення синтезу холестерину у печінці, по-третє, зниження виведення холестерину з організму та його утилізації. Крім того, при збільшенні надходження холестерину в організм з їжею, його синтез в печінці пригнічується. Цей факт свідчить на користь переваги у тварин II групи першого шляху виникнення ГХЕ, а у тварин III групи – другого шляху. Процеси уповільнення виведення холестерину з організму можуть спостерігатися як у II, так у III групі [26].

Порівняння динаміки вмісту кальцію в печінці та холестерину в сироватці крові у кожній із дослідних груп виявило, що на початкових тижнях моделювання стресу повільне накопичення кальцію у вказаному органі корелює з незначним і плавним підвищенням концентрації холестерину в сироватці

крові ( $r=0,98$  у II групі,  $r=0,93$  у III групі). Це явище відповідає описаному раніше першим двом стадіям стресу. При продовженні дії стресорів значне накопичення кальцію в печінці з наступним “тканинним остеопорозом” цього органа корелює з вираженою ГХЕ ( $r=0,95$  у II групі,  $r=0,90$  у III групі), що відповідає стадії виснаження стресу. При цьому на останній стадії стресу у тварин III групи найбільш істотно накопичення кальцію в печінці поєднувалося з найвираженішою ГХЕ порівняно з відповідним вмістом кальцію в печінці та холестерину у сироватці крові тварин II групи. Логічно припустити, що кальцій відіграє тригерну роль у запуску та інтенсифікації необхідних для біосинтезу холестерину ферментативних реакцій.

Повідомлялося [8], що холестерин є потужним стабілізатором ліпідного бішару клітинних мембран, котрий підвищує їх резистентність до електропробою та дезінтеграції. Отже, можна розглядати ГХЕ як захисну реакцію організму, котра перешкоджає руйнуванню клітин під впливом стресу. З цього витікає, що найбільш виражена ГХЕ при іммобілізації свідчить про найвищу патогенність даного стресора порівняно з аліментарним фактором у вигляді харчування,

збагаченого холестерином. Однак слід підкреслити, що за умов збільшення стійкості клітинних мембран холестерин одночасно підвищує їх в'язкість [8], знижує реакційну спроможність клітин [8], гальмує роботу  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз [1], що поглиблює перевантаження клітин кальцієм.

Зазначимо, що в нашому досліді визначався загальний вміст холестерину у сироватці крові. Тому неможливо зафіксувати його розподілення за ліпопротеїдними фракціями. Але в літературі повідомлялося, що за умов стресу підвищується продукція ліпопротеїдів дуже низької щільності в печінці [9], а також знижується виведення ліпопротеїдів низької щільності внаслідок зменшення кількості апо-В-чутливих рецепторів [22, 23]. Обидва класи ліпопротеїдів, концентрації яких можуть підвищуватися при стресі є атерогенними [5, 8]. У розглянутих нами випадках це можна буде впевнено стверджувати тільки після проведення подальших досліджень.

Таким чином, виявлене порушення кальцієвого гомеостазу в печінці за умов стресу різного генезу підтверджує залучення цього органа до адаптивної реакції організму. При цьому тривала дія стресових факторів призводить до функціональних, а у перспективі - до структурних ушкоджень печінки. Неспецифічна відповідь організму, одним із компонентів якої є підвищення вмісту холестерину в сироватці крові, найбільш виражена при іммобілізаційному стресі, ніж аліментарному. Сума викладених фактів свідчить на користь тригерної ролі кальцію у синтезі холестерину в печінці.

**A.A.Myroshnichenko, V.P.Lyashenko,  
S.N.Lukashev**

#### **EFFECTS OF STRESSES OF DIFFERENT GENESIS ON ACCUMULATION OF CALCIUM IN LIVER, AND ITS FUNCTIONAL ACTIVITY**

The dynamics of calcium content in the liver under alimentary and immobilizing stresses was studied. To

evaluate the functional state of the liver we conducted a simultaneous recording of the cholesterol level in the serum. Calcium has been shown to be accumulated in that organ, and it correlated positively with the level of cholesteremia. At a prolonged action of the stressors calcium accumulation was more significant in animals under immobilizing stress, as compared with those under alimentary one. The dynamic saturation of the liver with calcium was shown to reflect the stages of the stress. We suggest that calcium serves the trigger for the synthesis of cholesterol in the cells of the liver at stress. Thus, an adaptive reaction of the liver, and a possible mechanism of the hypercholesteremia initiation under stresses of different genesis have been demonstrated.

*Dnipropetrovsk national university*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Вавілова Г.Л., Прокопенко О.М., Харламова О.М., Сагач В.Ф. Участь L-аргініну в корекції активності мембранних транспортних ферментів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ - та  $\text{Na}^+$ -АТФаз за умов експериментальної гіперхолестеринемії // *Фізіол. журн.* - 2000. - **46**, № 1. - С. 25-31.
2. Гулак П.В., Дудченко А.М., Зайченко В.В. Гепатозит: функціонально-метаболические свойства. - М.: Наука, 1985. - 272 с.
3. Данилов Г.Е., Брындына И.Г., Исакова Л.С. и др. Стабильные гомеостатические константы и эндокринный статус при хроническом нейрогенном стрессе // *Арх. клин. и эксперим. медицины.* - 2000. - **9**, № 1. - С. 71-74.
4. Дьячук Г.И. Возможные пути регуляции кальциевого обмена // *Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова.* - 1991. - **77**, № 11. - С. 117-123.
5. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липопротеиды, дислипидемии и атеросклероз. -Л.: Медицина, 1984. -168 с.
6. Левицкий Д.О. Кальций и биологические мембраны. - М.: Наука, 1990. - 124 с.
7. Логинов А.С., Митюшин Б.Н. Внутриклеточная активация кислорода и молекулярные механизмы автоокислительного повреждения печени // *Вест. РосАМН.* - 1994. - № 5. - С. 3-8.
8. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э. М. Холестериноз. - М.: Медицина, 1983. - 352 с.
9. Никитин Ю.П., Курилович С.А., Давидик Г.С. Печень и липидный обмен. - Н.: Наука, 1985. - 190 с.
10. Рафая Н., Варник Г. Лабораторное измерение липидов, липопротеинов и аполипопротеинов. - М.: Фармаакус Принт, 1997. - 429 с.
11. Робу А.И. Стресс и гипоталамические гормоны. - К.: Штиинца, 1989. - 220 с.

12. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.
13. Славин У. Атомно-абсорбционная спектроскопия. – Л.: Химия, 1989. – 296 с.
14. Соколов Е.И. Эмоции, гормоны и атеросклероз. – М.: Наука, 1991. – 294 с.
15. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз. – М.: Наука, 1995. – 243 с.
16. Фурдуй Ф.И. Современные представления о физиологических механизмах развития стресса. – В кн.: Механизмы развития стресса. – 1987. – С. 8-33.
17. Янчук П.И., Цыбенко В.И. Нейрогуморальные механизмы гипоталамической регуляции кровообращения и тканевого дыхания в печени // Арх. клин. и эксперим. медицины. – 2000. – 9, № 1. – С. 135–137.
18. Barritt G.J., Hughes B.P. The nature and mechanism of activation of the hepatocyte receptor-activated  $Ca^{2+}$ -inflow system // Cell Signal. – 1991. – 3, №4. – P. 283–282.
19. Barros L.F., Stutzin A., Calixto A. et al. Non-selective cation channels as effectors of free radical-induced rat liver cell necrosis // Hepatology. – 2001. – 33, №1. – P. 114–122.
20. Bhattacharya S. Mechanisms of signal transduction in the stress response of hepatocytes // Int. Rev. Cytol. – 1998. – 184. – P. 109–156.
21. Fujisawa H. Regulation of the activities of multifunctional  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases // J. Biochem. – 2001. – 129, №2. – P. 193-199.
22. Hussain M.M., Strickland D.K., Barillan A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family // Annu. Rev. Nutr. – 1999. – 19. – P. 141–172.
23. Rhoads D., Brissette L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 1999. – 31, №9. – P. 915-931.
24. Rottingen J., Iversen J.G. Ruled by waves? Intracellular calcium signaling // Acta Physiol Scand. – 2000. – 169, №3. – P. 203-219.
25. Tordjmann T., Combettes L., Berthon B. et al. Hormone-mediated calcium responses of rat and human hepatocytes. Study of multicellular systems by videomicroscopy // Gastroenterol Clin Biol. – 1995. – 19, №12. – P. 980-990.
26. Yu K.C., Cooper A.D. Postprandial lipoproteins and atherosclerosis // Front. Biosci. – 2001. – 6. – P. 332–354.

*Дніпропетров. нац. ун-т М-ва освіти України*

*Матеріал надійшов до редакції 12.03.2002*