УДК 612.014.462.5:612.75:612.349.7:612.453

ХАРАКТЕРИСТИКА ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ, ПРОТЕКАЮЩИМ В УСЛОВИЯХ ГИПОКОРТИЦИЗМА

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

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, Ижевск, Россия (426034, Ижевск, ул. Коммунаров, 281), e-mail danilova-stlab@yandex.ru

В статье представлены результаты исследования показателей обмена коллагена костной ткани у крыс с аллоксановым диабетом, а также при сочетании аллоксанового диабета с введением блокатора синтеза кортикостероидов. В ткани позвонка определяли содержание свободного гидроксипролина, суммарного коллагена, его нейтральносолерастворимой фракции, коллагенолитическую активность на 5, 15, 20, 30 и 45 дни эксперимента. В обмене коллагена крыс с аллоксановым диабетом в течение первых 30 дней эксперимента резорбтивные процессы преобладали над синтетическими; на 45 день опыта отмечалось снижение показателей, характеризующих активность катаболических процессов. Анализ показателей обмена костного коллагена у животных с аллоксановым диабетом, протекающим в условиях гипокортицизма, свидетельствует об угнетении процессов распада коллагена в губчатой костной ткани с одновременным усилением синтетических реакций.

Ключевые слова: костная ткань, коллаген, аллоксановый диабет, блокатор синтеза кортикостероидов.

CHARACTERIZATION OF COLLAGEN METABOLISM IN THE BONE TISSUE OF RATS WITH ALLOXAN DIABETES UNDER CONDITIONS OF HYPOCORTICOIDISM

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

Ishevsk State Medical Academy, Ishevsk, Russia (426034, Ishevsk, street Kommunarov, 281), e-mail danilova-stlab@yandex.ru

In this article were presented the results of the study indicators of the collagen metabolism in the bone tissue of rats with alloxan diabetes and combined alloxan diabetes with the introduction of the synthesis of the blocker of corticosteroids. In the tissue of the vertebrae were determined the levels of free hydroxyproline, total collagen, his neutralsaltsoluble fraction, collagenase activity at 5, 15, 20, 30 and 45 days of the experiment. In the exchange of collagen at rats with alloxan diabetes in the first 30 days of the experiment the rezorbtivee processes dominated over the synthetic; on the 45 day of the experiment was indicated the increase of activity of the catabolic processes. Analyses of metabolism bone collagen of animals with alloxan diabetes, under conditions of hypocorticoidism showed on the oppression of the catabolism collagen in the spongy bone with simultaneous strengthening of synthetic reactions.

Keywords: bone tissue, collagen, alloxanic diabetes, synthesis of corticosteroid blocker.

Сахарный диабет относится к наиболее распространенным эндокринопатиям. Развитие малообратимых изменений костной ткани, значительно снижающих качество жизни больных сахарным диабетом, определяет необходимость дальнейшего изучения механизмов формирования диабетической остеопатии [2]. Имеется предположение, что в основе остеопении при сахарном диабете лежит снижение костеобразования. Это может быть вызвано как дефицитом инсулина, который обладает анаболическим эффектом на метаболизм костной ткани и прямым стимулирующим влиянием на синтез коллагена [5], так и катаболическим влиянием избытка глюкокортикоидов на белковый обмен в костях, где эти гормоны тормозят синтез коллагена, снижая уровень мРНК проколлагена и ингибируя пролил- и лизилгидроксилазы [3]. Поскольку коллаген является основным компонентом

органического матрикса кости, то изменения в его обмене отражают общую направленность метаболизма костной ткани.

Целью данной работы явилось изучение изменений в обмене коллагена губчатой костной ткани при аллоксановом диабете, а также диабете, протекающем в условиях гипокортицизма.

Материалы и методы исследования

Эксперимент был проведен на 86 белых беспородных крысах-самцах массой 180–230 г, находящихся на стандартном рационе вивария, со свободным доступом к воде. При проведении опытов соблюдали положения Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным (Одобрительная форма комитета по биомедицинской этике выдана 24 февраля 2009 года, аппликационный № 154).

У животных 1-й группы моделировали экспериментальный диабет путем однократного подкожного введения аллоксана-тетрагидрата в дозе 170 мг/кг массы животного [6]. Аллоксан специфически токсичен к ß-клеткам поджелудочной железы почти всех позвоночных [5]. Под его действием активируются свободнорадикальные процессы, вызывая повреждение молекул ДНК в ß-клетках, нарушение синтеза проинсулина и гибель клеток [6]. Развитие диабета контролировали по снижению уровня инсулина и С-пептида в крови, а также по развитию стойкой гипергликемии.

Животным 2-й группы на фоне аллоксанового диабета вводили аминоглютетимид («ПЛИВА», Хорватия), ежедневно подкожно в дозе 50–100 мг/кг массы (по схеме) в течение 30 дней [3]. Аминоглютетимид – ингибитор стероидогенеза – блокирует ранние этапы биогенеза кортикостероидов, в результате чего нарушается образование конечных продуктов гормонопоэза и биологически активных предшественников [3]. Влияние аминоглютетимида оценивали по уровню 11-оксикортикостероидов в плазме.

Контролем служили интактные крысы, находящиеся на стандартном рационе вивария. Состояние обмена коллагена в губчатой костной ткани оценивали по содержанию в гомогенате тела второго поясничного позвонка:

- суммарного коллагена по количеству гидроксипролина [9],
- свободного гидроксипролина использованием парадиметиламинобензальдегида [9],
- «молодой» нейтральносолерастворимой фракции коллагена [8],
- коллагенолитической активности [10].

В крови определяли концентрацию:

- свободного гидроксипролина [9];
- инсулина методом радиоиммунологического анализа с использованием тест-набора «рио-ИНС-ПГ-^{125}I», Беларусь;

- С-пептида методом радиоиммунологического анализа с помощью тест-набора «IMMUNOTECH C-peptid IRMA», Чехия;

- глюкозы глюкозооксидазным методом при помощи стандартных наборов «Витал Диагностикс СПб», Россия.

- 11-оксикортикостероидов флюориметрическим методом по методике А.Г. Резникова (1980) с помощью прибора Флюорат-02-АФБЛ-Т.

Анализ показателей проводили на 5, 15, 20, 30 и 45 дни эксперимента.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6.1 фирмы StatSoft. Полученные результаты представили в виде медиан и интерквартильных интервалов. Оценку значимости полученных результатов осуществляли с использованием непараметрического критерия (U) Манна – Уитни. Различия между показателями считали статистически значимыми при уровне достоверности $p<0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

У животных с индуцированным диабетом отмечалась низкая концентрация С-пептида в сыворотке крови на протяжении всего периода наблюдений, при этом максимальное отличие от контрольных значений: 2,52 (2,31; 2,68) нг/мл наблюдалось на 20 день эксперимента, когда данный показатель снижался до 0,66 (0,6;0,72) нг/мл ($p<0,001$). Аналогичная тенденция прослеживалась в изменении содержания инсулина. В течение всего эксперимента отмечался высокий уровень гликемии (рис.1). Содержание 11-оксикортикостероидов в плазме крови возрастало с 20 дня аллоксанового диабета и достигало в этот период 358,1 (323,2; 447,6) мкг/л ($p<0,001$) против 213,2 (185,3; 282,3) мкг/л в контроле. В последующие сроки наблюдения показатель значимо превышал значения интактных животных, максимальный подъем отмечался на 30 день диабета, когда концентрация определяемых гормонов составила 961,6 (824,6; 1153,0) мкг/л ($p<0,001$).

Содержание свободного гидроксипролина в плазме снижалось на 15 день наблюдения до 13,4 (11,5; 13,4) мкмоль/л ($p<0,001$), в последующем до конца наблюдения значимо превышало значения интактных животных (17,6 (16,2; 18,0) мкмоль/л, достигая максимума на 30 день воздействия: 55,4 (51,6; 59,2) мкмоль/л ($p<0,05$).

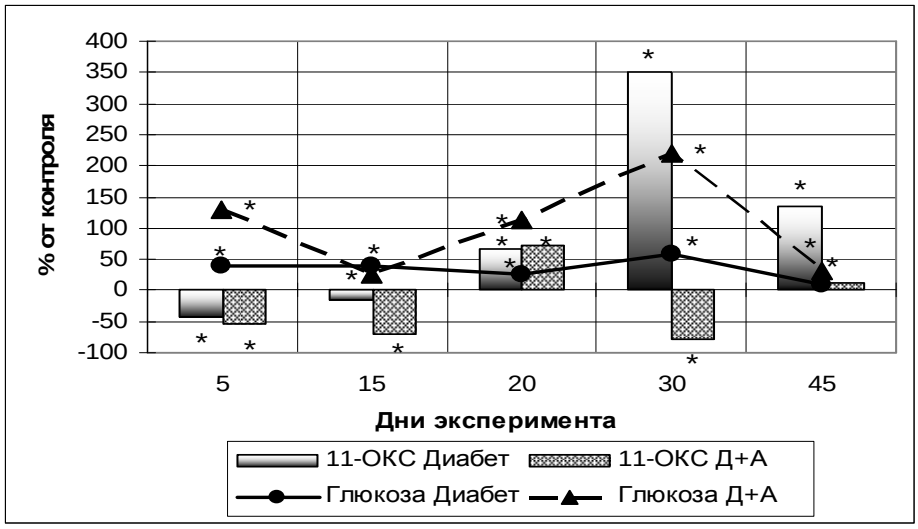

Рис. 1. Содержание глюкозы и 11-оксикортикостероидов в крови крыс с аллоксановым диабетом и крыс с диабетом, протекающим в условиях гипокортицизма

Примечание: * – p<0,05 при сравнении с контрольной группой; 11-ОКС – 11-оксикортикостероиды, Д+А – сочетанное воздействие: аллоксановый диабет+введение аминоглютетимида.

Метаболизм коллагена подразумевает наряду с постоянным биосинтезом, уравновешивающий его процесс катаболизма [8]. Изучение фракционного состава коллагена позволяет судить о характере изменений в обмене исследуемого биополимера. На ускорение синтеза коллагена указывает увеличение содержания суммарного коллагена и его растворимой фракции [1]. Катаболические процессы приводят к повышению коллагенолитической активности, содержания свободного гидроксипролина и снижению суммарного коллагена в тканях [8].

Течение аллоксанового диабета характеризовалось устойчивым уменьшением содержания нейтральносолерастворимой фракции коллагена в ткани 2-го поясничного позвонка, так на 5, 20 и 30 дни наблюдения ее уровень на 61,1 %, 55,7 % и 40,5 % (p<0,001) был ниже значений контрольной группы животных (табл.1).

Показатели резорбции изменялись следующим образом: коллагенолитическая активность в гомогенате ткани снижалась на 20 (-70,0 %; p<0,01) и 45 дни (-73,3 %; p<0,01), а содержание свободного гидроксипролина изменялось фазно. Так, увеличение его уровня в теле позвонка определялось на 15 (+55,2 %; p<0,001) и 30 (+77,4 %; p<0,05) дни, а снижение – на 20 (-55,7 %; p<0,01) и 45 дни (-50,1 %; p<0,001) экспериментального диабета (табл.1).

В результате указанных изменений в обмене биополимера содержание суммарного коллагена в ткани 2-го поясничного позвонка было снижено в ходе всего периода наблюдения. Наименьший уровень показателя отмечался на 20 день аллоксанового диабета, когда он на 36,1 % (p<0,001) был ниже данных интактных крыс (табл. 1).

Таблица 1

Показатели обмена коллагена в губчатой костной ткани крыс при аллоксановом диабете (Me (Q_{25}-Q_{75}))

Показатели	Контроль	Дни опыта				
		5	15	20	30	45
		n=8	n=8	n=8	n=8	n=10
КА, мкмоль/г/ч	1,27 (0,93; 1,61)	1,19 (0,93; 1,36)	1,61 (1,36; 1,69)	0,38 (0,25; 0,42) *	0,76 (0,51; 1,19) *	0,34 (0,17; 1,02) *
СО, ммоль/кг	0,86 (0,76; 0,95)	0,86 (0,76; 1,14)	1,33 (1,24; 1,48) *	0,38 (0,38; 0,57) *	1,53 (0,95; 1,91) *	0,43 (0,33; 0,57) *
НРК, ммоль/кг	12,49 (11,06;13,21)	4,86 (4,20; 6,48) *	11,16 (9,92; 14,30)	5,53 (4,20; 7,63) *	7,44 (6,10; 8,39) *	14,35 (12,40; 18,59)
СК, ммоль/кг	198,3 (194,4;206,0)	167,8 (160,2;175,4)*	152,6 (139,2;183,1)*	126,8 (114,4;152,6)*	177,4 (156,4;221,1)	182,9 (131,6;184,2)*

Примечание: * - $p<0,05$ при сравнении с контрольной группой;
НРК – нейтральносолерастворимый коллаген, «молодая» фракция, показатель синтеза; СК – суммарный коллаген; СО – свободный гидроксипролин – маркер распада коллагена, КА – коллагенолитическая активность.

Полученные результаты свидетельствуют о подавлении анаболических реакций, а также усилении катаболических процессов в обмене костного коллагена, что, вероятно, связано с дефицитом инсулина и гиперпродукцией глюкокортикоидных гормонов, для которых соединительная ткань служит одной из главных эффекторных тканей.

Введение блокатора синтеза кортикостероидов животным с аллоксановым диабетом сопровождалось снижением концентрации С-пептида в сыворотке крови в динамике эксперимента с 2,33 (2,04; 2,47) нг/мл (в контроле) до 1,29 (1,04; 1,55) нг/мл ($p<0,01$) к 30 дню исследований. Количество инсулина в плазме крови снижалось к 10 дню эксперимента и оставалось ниже контрольных показателей до конца эксперимента. При этом уровень С-пептида и инсулина в сыворотке крови крыс на 20 и 30 дни опыта был выше по сравнению с «изолированным» аллоксановым диабетом.

Содержание 11-оксикортикостероидов в плазме крови крыс уменьшалось на 5, 15 и 30 дни исследования до 97,6 (91,2; 195,0) мкг/л ($p<0,01$), 62,8 (60,5; 66,5) мкг/л ($p<0,001$) и 46,2 (39,4; 213,4) мкг/л ($p<0,01$) соответственно (рис.1). Рост концентрации изучаемых гормонов отмечался лишь однократно, на 20 день опыта, когда их уровень на 71,8 %

(p<0,001) превышал показатели интактных животных (213,2 (185,3; 282,3) мкг/л). Концентрация глюкозы в плазме крови при сочетанном воздействии была также увеличена во все сроки наблюдения (рис. 1). Однако в серии с сочетанным воздействием гипергликемия была более выражена, чем при изолированном диабете. Возможно, это связано с дополнительным угнетением выработки инсулина при введении аминоглютетимида [7].

Содержание свободного гидроксипролина в плазме возрастало на 15 и 30 дни сочетанного воздействия до 30,6 (28,7; 34,4) мкмоль/л (p<0,001) и 32,5 (24,8; 40,1) мкмоль/л (p<0,001) против 17,6 (16,2; 18,0) мкмоль/л в контроле.

При введении аминоглютетимида на фоне аллоксанового диабета, катаболические процессы в теле второго поясничного позвонка крыс были угнетены: содержание свободного гидроксипролина в ткани значительно снижалось в течение всего эксперимента, за исключением 20 дня (табл. 2). Наибольшее снижение данного показателя отмечалось на 45 день опыта, когда он на 44,6 % был ниже значений контроля (p<0,001).

Таблица 2

Изменения показателей обмена коллагена в теле второго поясничного позвонка крыс при сочетании аллоксанового диабета с введением аминоглютетимида (Me (Q_{25}-Q_{75}))

Показатели	Контроль n=10	Дни опыта				
		5	15	20	30	45
		n=8	n=8	n=10	n=8	n=10
КА, мкмоль/г/ч	1,27 (0,93; 1,61)	1,91 (0,55; 3,52)	0,25 (0,17; 0,76)*	0,76 (0,51;0,76)*	0,76 (0,17; 2,20)	2,29 (1,99; 2,58)*
СО, ммоль/кг	0,86 (0,76; 0,95)	0,52 (0,48; 0,67)*	0,67 (1,05; 1,43)*	0,76 (0,57; 0,95)	0,52 (0,33; 0,86)*	0,48 (0,38; 0,67)*
НРК, ммоль/кг	11,54 (10,01;13,06)	11,25 (10,01;13,02)	15,64 (14,30;17,45)*	14,49 (13,35;19,36)*	7,68 (6,48; 9,06)*	17,54 (17,35;24,31)*
СК, ммоль/кг	198,3 (194,4;206,0)	266,9 (246,0;291,8)*	242,2 (209,8;267,0)*	221,2 (209,8;251,7)*	222,2 (206,0;257,4)*	223,1 (194,5;240,3)

Примечание: * – p<0,05 при сравнении с контрольной группой;
НРК – нейтральносолерастворимый коллаген, «молодая» фракция, показатель синтеза; СК – суммарный коллаген; СО – свободный гидроксипролин – маркер распада коллагена, КА – коллагенолитическая активность.

Коллагенолитическая активность в исследуемых гомогенатах губчатой костной ткани также была угнетена в первые 20 дней воздействия (табл. 2), когда ее значение на 80,0 % (15 день; p<0,05) и 40,0 % (20 день; p<0,01) были ниже данных интактных животных. К 30 дню показатель не отличался от контроля и превышал его на 45 день на 80,1 % (p<0,01).

Уровень незрелой «молодой» нейтральносолерастворимой фракции устойчиво повышался в течение всего периода наблюдения, за исключением 30 дня: значимо возрастал на 15, 20 и 45 дни в сравнении с группой сравнения на 34,7 %, 25,6 % и 52,0% (р $p<0,001$) соответственно (табл. 2).

Содержание суммарного коллагена возрастало на 5 день опыта на 34,6 % (табл. 2) в сравнении со значениями интактных крыс ($p<0,001$) и оставалось повышенным в течение 30 дней введения аминоглютетимида: на 22,1 %, 11,5 % и 12,0 % ($p<0,01$) соответственно на 15, 20 и 30 дни воздействия.

Таким образом, полученные результаты указывают на усиление синтетических процессов в обмене коллагена губчатой костной ткани при сочетании аллоксанового диабета с введением аминоглютетимида, что может быть связано с уменьшением ингибирующего влияния глюкокортикоидов на функциональную активность остеобластов, синтез инсулиноподобного фактора-I и коллагена I типа [4].

Выводы

При аллоксановом диабете в течение первых 30 дней резорбтивные процессы преобладали над костеобразованием. В этот период в исследуемой ткани наблюдалось стойкое угнетение процессов синтеза коллагена, с 15 дня исследования отмечалась активация распада коллагена. На 45 день отмечалось снижение показателей, характеризующих активность катаболических процессов, что указывает на превалирование в этот период анаболических процессов в обмене коллагена.

Обмен коллагена костной ткани у животных с аллоксановым диабетом, протекающим в условиях гипокортицизма, характеризовался угнетением процессов распада, о чем свидетельствует снижение содержания свободного гидроксипролина на протяжении эксперимента, а также снижение активности коллагенолитических ферментов на 15 и 20 опыта. Одновременно с этим активно протекали процессы синтеза коллагена, что приводило к увеличению содержания нейтральносолерастворимого и суммарного коллагенов в гомогенате костной ткани, начиная с 5 дня опыта.

Список литературы

1. Бутолин Е.Г., Мосягин И.И., Савинова Н.В., Петров Ю.Л.. Современные представления об обмене коллагена и его регуляции: обзор // Биохимия соединительной ткани (норма и патология): Сборник научных статей, посвященный 70-летию кафедры биохимии ИГМА. – Ижевск, 2005. – С. 25-36.

2. Вартанян К.Ф. Патология костной ткани при сахарном диабете // Остеопороз и остеопения. – 1999. – № 4. – С.31-33.

3. Комиссаренко В.П., Резников А.Г. Ингибиторы функции коры надпочечных желез. – Киев.: Здоров’я, 1972. – 315 с.

4. Насонов Е.Л. Стероидный остеопороз // Русский медицинский журнал. – 1999. – Т. 7. – № 8. – С.377-384.

5. Один В.И. Аутоиммунный сахарный диабет. – С-Пб.: Изд-во Военно-медицинской академии, 2003. – 343 с.

6. Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г., Шорин Ю.П. Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллоксана. // Проблемы эндокринологии. – 1987. – № 4. – С. 65-68.

7. Савинова Н.А., Наумова Н.Г., Глазырин А.И., Петров Ю.А. Содержание инсулина и С-пептида в крови крыс с экспериментальным диабетом в условиях гипокортицизма // Материалы Всероссийской конференции «Компенсаторно-приспособительные процессы». – Новосибирск. – 2004. – С. 165.

8. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 376 с.

9. Шараев, 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. – Т. 81, № 6. – С.665-666.

10. Schalinatus, E. Activitas best immungbau collagenasen / E. Schalinatus, U. Behuke, H. Ruttloff // Nahrung. – 1978. – V.22, № 4. – S.401-408.

Рецензенты:

Мустафин И.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Казань.

Брындина И.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск.