

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА БИОПОЛИМЕРОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В ПЕЧЕНИ КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Ломаева С.В.^{1,2}, Гетте И.Ф.¹, Булавинцева Т.С.¹, Переведенцева С.Е.³, Данилова И.Г.^{1,2}

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, г. Екатеринбург

² Институт медицинских клеточных технологий, г. Екатеринбург

³ Ижевская государственная медицинская академия, г. Ижевск

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – изучить особенности обмена биополимеров матрикса печени и плазмы крови крыс при аллоксановом диабете.

Материал и методы. Сахарный диабет у крыс моделировали однократным подкожным введением аллоксана тетрагидрата в дозе 170 мг/кг массы тела животного (для верификации модели определяли в крови содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина, проводили морфометрическое исследование поджелудочной железы). Через 1 мес в плазме крови определяли концентрацию гликозаминогликанов, свободного гидроксипролина, уровень гиалуронидазной и коллагенолитической активности. В гомогенате печени крыс определяли концентрацию суммарного коллагена, гликозаминогликанов, их фракций, уровень гиалуронидазной и коллагенолитической активности.

Результаты. На 30-е сут после введения аллоксана в плазме крови и печени крыс наблюдалось возрастание уровня всех исследуемых показателей, причем накопление гликозаминогликанов в печени происходило преимущественно за счет несультативированной фракции.

Заключение. Развитие экспериментального диабета у животных сопровождается активацией как процессов распада, так и синтеза исследуемых биополимеров. В печени крыс отмечается накопление суммарного коллагена и гликозаминогликанов, что, вероятно, служит причиной фиброзных изменений в исследуемом органе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гликозаминогликаны, коллаген, печень, аллоксановый диабет.

Введение

Сахарный диабет (СД) I типа является тяжелым прогрессирующим аутоиммунным заболеванием, сопровождающимся повышенным апоптозом и гибелью островковых клеток поджелудочной железы, что приводит к нарушению ее морфологии и развитию стойкой инсулиновой недостаточности.

Одним из патогенетических процессов при СД является нарушение обмена биополимеров соединительной ткани [1, 2]. Преобладающее действие контринсулярных гормонов может сопровождаться ускоренным распадом белков межклеточного матрикса с использованием высвобождающихся аминокислот в процессе глюконеогенеза. Аутоиммунные реакции в отношении гликозилированных протеинов также мо-

гут вносить вклад в деструктивные процессы [3]. В то же время при изучении количества биополимеров межклеточного матрикса в некоторых тканях при СД отмечают повышенное содержание коллагена и гликозаминогликанов, что сопровождается развитием фиброза и микроангиопатий [2, 4].

Проведенные ранее морфологические исследования показывают наличие значительных деструктивных процессов в печени и органах лимфопозза крыс через 30 сут после введения аллоксана [5]. Обнаружено, что в печени в этот срок эксперимента развиваются очаговые некрозы гепатоцитов [6], что, вероятно, связано с усилением процессов свободнорадикального окисления, развивающихся вследствие накопления высвобождающихся из адипоцитов свободных жирных кислот. Известно, что продукты перекисного окисления способны активировать звездчатые клетки

✉ Ломаева Светлана Владимировна, тел./факс 8 (343) 374-00070, тел. 8-912-469-7942; e-mail: lomaeva-sv@yandex.ru

печени, являющиеся основными продуцентами коллагена [7, 8].

Цель исследования – изучить особенности обмена биополимеров матрикса печени и плазмы крови при аллоксановом диабете.

Материал и методы

Исследования проводили на 18 белых беспородных крысах-самцах, содержащихся в виварии на обычном рационе при свободном доступе к воде, в соответствии с рекомендациями международных этических комитетов по гуманному обращению с лабораторными животными (директива Совета ЕС от 24.11.1986 86/609ЕЕС и положения Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации, 1996).

Животные, сходные по весу, полу и возрасту, были разделены на две группы методом случайной выборки. Опытную группу составили восемь крыс, которым однократно подкожно вводили аллоксана тетрагидрат (Fluka Chemica, Швеция) в дозе 170 мг/кг массы тела животного для моделирования инсулинзависимого сахарного диабета [9]. Перед инъекцией аллоксана животных не кормили в течение 10 ч. Контрольным крысам (10 животных) вводили эквивалентное количество физиологического раствора.

Животных выводили из эксперимента утром натощак на 30-е сут опыта. В обеих группах в плазме крови крыс определяли концентрацию глюкозы (глюкозооксидазный метод, ООО «Витал Диагностикс СПб», Россия) и гликозилированного гемоглобина HbA1c (Био-Ла-Тест, PLIVA, Чехия). Подготовку образцов ткани поджелудочной железы для морфометрического исследования осуществляли на автоматическом процессоре Leica EG 1160 с последующей заливкой в парафин. Срезы толщиной 3 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Гомори, определяли количество островков Лангерганса и β -клеток. Состояние обмена биополимеров соединительной ткани в гомогенате ткани печени крыс изучали по следующим показателям: концентрация суммарного коллагена (СК) с использованием парадиметиламинобензальдегида по методу П.Н. Шараева и соавт. [10], суммарных гликозаминогликанов (ГАГ) по карбазольной реакции Дише в модификации П.Н. Шараева [10], сульфатированных (сГАГ) и несulfатированных фракций ГАГ (нсГАГ) по методу S. Schiller в модификации Л.А. Конновой [11], уровень коллагенолитической активности (КА) по методу E. Schalinatus в модификации П.Н. Шараева и соавт. [10] и гиалуронидазной активности (ГА) по методу П.Н. Шараева [12].

В плазме крови животных исследовали содержание свободного гидроксипролина (СО), ГАГ, КА и ГА.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 6,0 for Windows фирмы StatSoft (США). Сначала применяли методы описательной статистики с построением гистограмм для оценки распределения изучаемых показателей в группах и выбора метода сравнения средних. Поскольку распределение параметров изучаемых показателей в группах носило характер, отличный от нормального, оценку значимости различий полученных данных в сравниваемых выборках проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни для двух независимых групп. Для отображения среднего значения и варибельности изменений использовали медиану Me , нижний Q_{25} и верхний Q_{75} квартили. Критический уровень значимости статистических гипотез p в данном исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным, на 30-е сут после введения аллоксана в группе опытных животных развивался инсулинзависимый сахарный диабет, о чем свидетельствовал повышенный уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови крыс. Так, концентрация глюкозы в плазме крови экспериментальных животных превышала контрольные показатели на 78,2% ($p = 0,0008$). Содержание HbA1c в крови крыс на 30-е сут эксперимента было выше контроля на 45,0% ($p = 0,0008$) (табл. 1). Морфометрическое исследование поджелудочной железы указывало на выраженный деструктивный характер изменений в эндокринной части поджелудочной железы: наблюдалось снижение количества панкреатических островков до 0,3 (0,2; 0,3) в 1 мм^2 (на 40% меньше контроля, $p = 0,0004$) на фоне отсутствия изменений в ее экзокринной части, количество β -клеток было ниже показателей контрольной группы в 3,47 раза ($p = 0,0004$).

Таблица 1

Показатели плазмы крови и морфометрия поджелудочной железы крыс при аллоксановом диабете (Me (Q_{25} ; Q_{75}))		
Исследуемые показатели	Контрольная группа ($n = 10$)	Опытная группа ($n = 8$)
<i>Плазма крови</i>		
Глюкоза, ммоль/л	5,5 (5,2; 6,2)	9,8 (8,7; 10,9)* $p = 0,0008$
HbA1c, мкмоль/гHb	6,0 (5,2; 6,8)	8,7 (7,7; 8,8)* $p = 0,0008$
<i>Поджелудочная железа</i>		
Количество панкреатических островков в 1 мм^2	0,5 (0,5; 0,6)	0,3 (0,2; 0,3)* $p = 0,0004$

Количество β-клеток на 1 мм² островка | 5026,5 (4684,3; 6503,1) | 1446,1 (1277,8; 1475,2)*
 $p = 0,0004$

Примечание. Здесь и в табл. 2: *n* – количество животных в группе; * – $p < 0,05$ при сравнении с контрольной группой.

В ранее проведенных гистохимических исследованиях [6] показано, что токсическое действие аллоксана проявляется на 3-и–7-е сут после его введения и направлено в первую очередь на островковые клетки поджелудочной железы. Наблюдающиеся в более поздние сроки системные деструктивные процессы связаны с развитием стойкой гипергликемии на фоне резкого снижения количества инсулинсинтезирующих клеток.

Известно, что преобладание реакций катаболизма в соединительной ткани сопровождается выходом продуктов этих реакций в кровь и характеризуется повышением уровня ГАГ, СО, коллагенолитической и гиалуронидазной активности в плазме крови [13]. В экспериментах (табл. 2) содержание суммарных ГАГ и гидроксипролина в крови животных было выше контрольных значений на 85,6% ($p = 0,0008$) и 19,3% ($p = 0,0025$) соответственно. Уровень ГА в плазме крови крыс с аллоксановым диабетом возрастал в 1,7 раза ($p = 0,0008$), коллагенолитическая активность превышала контрольные показатели в 2,5 раза ($p = 0,0004$).

Таблица 2

Показатели обмена биополимеров соединительной ткани в крови и печени крыс при аллоксановом диабете (Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅))		
Исследуемые показатели	Контрольная группа (n = 10)	Опытная группа (n = 8)
<i>Плазма крови</i>		
СО, мкмоль/л	8,8 (8,7; 8,8)	10,5 (9,5; 11,4) * $p = 0,0025$
КА, мкмоль/г·ч	0,02 (0,01; 0,02)	0,05 (0,05; 0,06) * $p = 0,0004$
ГАГ, мкмоль/л	46,7 (36,7; 66,7)	86,7 (80,0; 90,0) * $p = 0,0008$
ГА, мкмоль/(л·ч)	53,3 (40,0; 53,3)	90,0 (85,3; 93,3) * $p = 0,0008$
<i>Печень</i>		
СК, ммоль/кг	24,4 (21,3; 25,0)	33,6 (33,6; 36,6) * $p = 0,0004$
КА, мкмоль/(л·ч)	0,9 (0,9; 0,9)	1,1 (0,9; 1,3) * $p = 0,0456$
ГАГ, ммоль/кг	14,3 (11,7; 18,0)	21,0 (20,7; 21,3) * $p = 0,0008$
сГАГ, ммоль/кг	8,3 (6,1; 10,5)	10,0 (9,4; 11,1) * $p = 0,0406$
нсГАГ, ммоль/кг	5,9 (4,5; 7,4)	11,0 (10,2; 11,3) * $p = 0,0008$
ГА, мкмоль/(л·ч)	3,8 (3,4; 4,2)	5,5 (3,4; 5,9) * $p = 0,0460$

В гомогенате печени опытной группы животных (табл. 2) на фоне высокой концентрации суммарного коллагена (на 37,7% выше относительно контроля;

$p = 0,0004$) наблюдался повышенный уровень КА (на 22,2%; $p = 0,0456$). Параллельно с этим отмечалось увеличение содержания суммарных ГАГ с 14,3 (11,7; 18,0) до 21,0 (20,7; 21,3) ммоль/кг ($p = 0,0008$), а также превышение гиалуронидазной активности уровня контрольных значений на 44,7% ($p = 0,0460$). Концентрация сГАГ в печени опытных крыс была выше на 20,5% ($p = 0,0406$), в то время как содержание нсГАГ превышало контроль на 86,4% ($p = 0,0008$), что указывало на преимущественное накопление гиалурононвой кислоты.

Полученные изменения свидетельствуют об одновременной активации как процессов распада, так и синтеза исследуемых биополимеров с преобладанием последних в межклеточном матриксе печени. Диабетическое поражение печени связано прежде всего с ее жировой инфильтрацией с последующим некрозом и апоптозом гепатоцитов в результате активации процессов перекисного окисления липидов [7]. Известно, что основными клетками, продуцирующими компоненты экстрацеллюлярного матрикса в поврежденной печени, являются звездчатые клетки Ито, портальные фибробласты и миофибробласты из красного костного мозга, причем главная роль принадлежит звездчатым клеткам [8]. Клетки Ито при разрушении гепатоцитов пролиферируют, приобретают фенотип фибробластов и усиленно синтезируют коллаген, протеогликаны и другие элементы межклеточного матрикса, способствуя фиброзированию печени [14]. Известно, что на первых этапах развития грануляционно-фиброзной ткани повышение содержания ГАГ происходит в основном за счет гиалурононвой кислоты [15]. Стойкая гипергликемия, сопровождающаяся гликозилированием белков, может являться дополнительной причиной накопления биополимеров межклеточного матрикса в процессе развития фиброза, так как коллагеназа обладает низкой активностью в отношении гликозилированного коллагена [1, 3].

Выводы

1. Развитие экспериментального диабета у крыс приводит к усилению обмена биополимеров межклеточного матрикса, о чем свидетельствует как ускоренное расщепление, так и накопление исследуемых биополимеров.

2. В плазме крови животных с аллоксановым диабетом наблюдается повышение уровня суммарных ГАГ, гидроксипролина, коллагенолитической и гиалуронидазной активности, что отражает преобладание катаболических реакций в соединительной ткани.

3. Нарушение процесса ремоделирования компонентов межклеточного матрикса печени сопровожда-

ется возрастанием концентрации суммарного коллагена и гликозаминогликанов (преимущественно за счет несulfатированной фракции), что, вероятно, служит причиной фиброзных изменений в исследуемой ткани.

Работа выполнена в рамках молодежного проекта Уральского отделения Российской академии наук 13-4-НП-589 и научного проекта Уральского отделения Российской академии наук 12-П-4-1059.

Литература

1. Балаболкин М.И. Сахарный диабет. М.: Медицина, 1994. 304 с.
2. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 376 с.
3. Один В.И. Атоиммунный сахарный диабет. СПб.: ВМедА, 2003. 344 с.
4. Подгребельный А.Н., Смирнова О.М., Дедов И.И. Роль фибробластов в развитии сахарного диабета и его осложнений // Проблемы эндокринологии. 2005. Т. 51, № 2. С. 14–22.
5. Гетте И.Ф., Данилова И.Г., Булавинцева Т.С. Коррекция деструктивных изменений соединительных тканей активацией макрофагального звена иммунной системы при аллоксановом диабете // Вестн. Урал. мед. акад. науки. 2009. Т. 25, № 2. С. 274–275.
6. Медведева С.Ю., Булавинцева Т.С., Данилова И.Г., Гетте И.Ф., Сенцов В.Г. Токсическое действие аллоксана в динамике развития аллоксанового диабета // Вестн. Урал. мед. акад. науки. 2012. Т. 40, № 3. С. 30–33.
7. Sanyal A.J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Rizzo W.B., Contos M.J., Sterling R.K., Luketic V.A., Shiffman M.L., Clore J.N. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance with mitochondrial abnormalities // Gastroenterology. 2001. V. 120, № 5. P. 1183–1192.
8. Бабак О.Я. Проблема фиброгенеза неалкогольной жировой болезни печени // Сучасна гастроентерологія. 2007. Т. 36, № 4. С. 4–10.
9. 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.
10. Шараев П.Н., Кильдиярова Р.Р., Стрелков Н.С. Соединительная ткань в детском возрасте. Ижевск: ИГМА, 2009. 142 с.
11. Коннова Л.А. Фракционный состав кислых гликозаминогликанов аорты кролика при развитии гиперхолестеринемии // Вопр. мед. химии. 1978. Т. 24, № 5. С. 591–595.
12. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В., Сосулина Л.Л. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях // Клинич. и лаб. диагностика. 1996. № 3. С. 21–22.
13. Булгакова В.С. Углевод-белковые комплексы при алкогольной интоксикации на фоне экспериментальной гипергликемии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2008.
14. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. М.: ГЭОТАР медицина, 1999. 859 с.
15. Ким Р.Х., Ольшевский Е.Г., Маркина Л.Г., Абрамов Ю.В., Володина Т.В., Козельцев В.Л., Быков В.А. Влияние мелатонина на заживление ран и некоторые биохимические характеристики грануляционно-фиброзной ткани крыс // Вопр. мед. химии. 2000. Т. 46, № 1. С. 14–17.

Поступила в редакцию 11.04.2013 г.

Утверждена к печати 09.10.2013 г.

Ломаева Светлана Владимировна (✉) – канд. биол. наук, науч. сотрудник лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, науч. сотрудник центральной лаборатории экспериментальных биотехнологий Института медицинских клеточных технологий (г. Екатеринбург).

Гетте Ирина Фёдоровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург).

Булавинцева Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник лаборатории морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН (г. Екатеринбург).

Переведенцева Светлана Евгеньевна – канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии ИГМА (г. Ижевск).

Данилова Ирина Георгиевна – д-р биол. наук, зав. лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии УрО РАН, гл. науч. сотрудник центральной лаборатории экспериментальных биотехнологий Института медицинских клеточных технологий (г. Екатеринбург).

✉ Ломаева Светлана Владимировна, тел./факс 8 (343) 374-00-70, тел. 8-912-469-7942; e-mail: lomaeva-sv@yandex.ru

THE EXCHANGE OF CONNECTIVE TISSUE BIOPOLYMERS IN THE LIVER OF ALLOXAN DIABETIC RATS

Lomaeva S.V.^{1,2}, Gette I.F.¹, Bulavintseva T.S.¹, Perevedentseva S.E.³, Danilova I.G.^{1,2}

¹ Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

² Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation

³ Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. Study of the exchange of liver and blood plasma biopolymers of alloxan diabetic rats.

Materials and Methods. Diabetes mellitus was modeled in rats by single subcutaneous injection of alloxan tetrahydrate (170 mg per 100 g body weight). Blood glucose, glycosylated hemoglobin were controlled and morphometric study of the pancreas was carried out for the verification of the model. A month later, concentration of glycosaminoglycans, free hydroxyproline and the level of hyaluronidase and collagenolytic activity in plasma were determined. The total concentration of collagen, glycosaminoglycans, and their fractions, the level of hyaluronidase and collagenolytic activity in rat liver homogenate were measured.

Results. The level of all the parameters of interest in the liver and blood plasma increased on 30 day after alloxan injection, the accumulation of glycosaminoglycans in the liver occurred mainly due to unsulfonated fraction.

Conclusion. The development of experimental diabetes in rats is accompanied by activation of both decay processes and synthesis of biopolymers studied. Accumulation of total collagen and glycosaminoglycans was observed in rats' liver, which probably lead to the fibrosis changes in it.

KEY WORDS: glycosaminoglycans, collagen, liver, alloxan diabetes.

Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 38–42

References

- Balabolkin M.I. *Diabetes mellitus*. Moscow, Medicine Publ., 1994. 304 p. (in Russian).
- Slutsky L.I. *Biochemistry of normal and diseased connective tissue*. Leningrad, Medicine Publ., 1969. 376 p. (in Russian).
- Odin V.I. *Autoimmune diabetes mellitus*. St. Petersburg, Military Medical Academy Publ., 2003. 344 p. (in Russian).
- Podgrebelny A.N., Smirnova O.M., Dedov I.I. *Problems of Endocrinology*, 2005, vol. 51, no. 2, pp. 14–22 (in Russian).
- Gette I.F., Danilova I.G., Bulavintseva T.S. *Herald of Ural Medical Academic Science*, 2012, vol. 40, no. 2, pp. 274–275 (in Russian).
- Medvedeva S.Y., Bulavintseva T.S., Danilova I.G., Gette I.F., Sentsov V.G. *Herald of Ural Medical Academic Science*, 2012, V. 40, no. 3, pp. 30–33 (in Russian).
- Sanyal A.J., Campbell-Sargent C., Mirshahi F., Rizzo W.B., Contos M.J., Sterling R.K., Luketic V.A., Shiffman M.L., Clore J.N. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance with mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 2001, vol. 120, no. 5, pp. 1183–1192.
- Babak O.Y. *Modern gastroenterology*, 2007, vol. 36, no. 4, pp. 4–10 (in Ukrainian).
- Palchikova N.A., Selyatitskaya V.G., Shorin Y.P. *Problems of Endocrinology*, 1987, no. 4, pp. 65–68 (in Russian).
- Sharaev P.N., Kildiyarova R.R., Strelkov N.S. *The connective tissue in children*. Izhevsk, IGMA Publ., 2009. 142 p.
- Konnova L.A. *Questions of medical chemistry*, 1978, vol. 24, no. 5, pp. 591–595 (in Russian).
- Sharaev P.N., Strelkov N.S., Gunchev V.V., Sosulina L.L. *Clinical and laboratory diagnostics*, 1996, no. 3, pp. 21–22 (in Russian).
- Bulgakova V.S. *Carbohydrate-protein complexes with alcohol intoxication on the background of experimental hyperglycemia*. Author. dis. cand. med. sci. Chelyabinsk, 2008. 22 p. (in Russian).
- Sherlock S., Dooley J. *Diseases of liver and biliary tract*. Moscow, GEOTAR Medicine Publ., 1999. 859 p. (in Russian).
- Kim R.H., Olszewski E.G., Markina L.G., Abramov Y.V., Volodina T.V., Kozeltsev V.L., Bykov V.A. *Questions of medical chemistry* 2000, V. 46, no. 1, pp. 14–17 (in Russian).

Lomaeva Svetlana V. (✉), Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation.

Gette Irina F., Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation.

Bulavintseva Tatyana S., Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation.

Perevedentseva Svetlana E., Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russian Federation

Danilova Irina G., Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Institute of Medical Cell Technology, Ekaterinburg, Russian Federation.

✉ **Lomaeva Svetlana V.**, Ph./Fax +7 (343) 374-00-70, Ph. +7-912-469-7942; e-mail: lomaeva-sv@yandex.ru