

Метаболизм коллагена в печени и поджелудочной железе пренатально алкоголизированного потомства крыс

КУРЧ Н.М.

к.биол.н., старший преподаватель кафедры биохимии и лабораторной медицины

АРЗАМАСОВА О.А.

с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО ОмГМА

аспирант кафедры биохимии и лабораторной медицины

ВЫСОКОГОРСКИЙ В.Е.

с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО ОмГМА

д.м.н., профессор, зав. кафедрой биохимии и лабораторной медицины

с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО ОмГМА

ГОУ ВПО Омская государственная медицинская академия Росздрава РФ,

г.Омск-644043, ул. Ленина, 12, e-mail: rector@omsk-osma.ru

У потомства алкоголизированных крыс выявлены биохимические признаки нарушения метаболизма коллагена в печени и поджелудочной железе, проявившиеся в увеличении концентрации свободного и белковосвязанного оксипролина в этих органах. Данные изменения сопровождались снижением уровня тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и ростом коллагенолитической активности.

Ключевые слова: пренатальная алкогольная интоксикация, свободный оксипролин, белковосвязанный оксипролин, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1

Введение

Хроническая алкогольная интоксикация вызывает в печени и поджелудочной железе патологические изменения различного характера, приводящие в итоге к развитию фиброза [1, 2]. Фиброз характеризуется накоплением во внеклеточном матриксе углеводов-белковых комплексов, включая коллаген, матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы [3]. Иницирующими факторами подобных преобразований выступает, в первую очередь, продукт окисления этанола — ацетальдегид, а также свободные радикалы, количество которых при алкогольной интоксикации резко возрастает. Эти соединения вызывают трансформацию звездчатых клеток печени и поджелудочной железы, активацию фибробластов посредством различных факторов роста. В результате звездчатые клетки и фибробласты начинают продуцировать большое количество компонентов экстрацеллюлярного матрикса [4]. При этом нарушается физиологическое равновесие между процессами биосинтеза и биodeградации коллагена, что приводит к его избыточному накоплению во внеклеточном матриксе.

При моделировании пренатальной алкогольной интоксикации также наблюдается увеличение продукции свободных радикалов на фоне истощения антиоксидантной системы [5, 6]. В результате этого повышается вероятность инициации процессов фиброгенеза в печени и поджелудочной железе. Однако сведений о патохимических механизмах развития фиброгенных процессов у пренатально алкоголизированного

потомства недостаточно, что и позволило нам провести экспериментальное исследование с целью выявления характера изменений метаболизма коллагена в печени и поджелудочной железе пренатально алкоголизированного потомства крыс.

Материал и методы исследования

Исследование проведено на 180 потомках белых беспородных самок крыс в различные сроки постнатального онтогенеза. Половозрелым самкам внутрижелудочно вводили этанол в дозе 4 г/кг в течение всего срока беременности. Потомство этих самок составило группу «Алкоголь». Другая группа самок получала эквивалентное количество физиологического раствора. Потомство этих самок составило группу «Контроль». Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом в возрасте 15, 30 и 60 суток.

Обмен коллагена в гомогенатах печени и поджелудочной железы оценивали по содержанию свободного и белковосвязанного оксипролина (БСОП) [8]. Уровень тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 определяли набором реагентов «BioSours International Inc. Human TIMP-1 ELISA». Коллагенолитическую активность в гомогенатах печени и поджелудочной железы оценивали с использованием в качестве субстрата коллаген («Технология-Стандарт») с последующим определением продукта распада этого белка — оксипролина [9].

Для статистической обработки данных использовали программу Statistica 6. Полученные результаты пред-

ставлены как $Me(Q1-Q3)$, где Me — медиана, $Q1$ — 25-й процентиль, $Q3$ — 75-й процентиль. Статистическая значимость различий сравниваемых величин оценивалась с помощью критерия Манна—Уитни (U). Критический уровень значимости различий результатов (p) принимался равным 0,05 [10].

Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании содержания свободного оксипролина (СОП) в ткани поджелудочной железы у крыс в возрасте 15 суток, алкоголизированных в пренатальном периоде, выявлено его повышение бо-

лее чем в 7 раз ($p = 0,001$) по сравнению с животными контрольной группы (табл. 1).

В последующие сроки уровень СОП несколько снижается, но остается существенно выше контрольных значений в возрасте 30 и 60 суток.

У животных контрольной группы повышенное содержание БСОП наблюдалось в возрасте 15 суток в сравнении с уровнем БСОП в возрасте 30 и 60 суток, что объясняется интенсивным ростом и развитием поджелудочной железы в раннем постнатальном периоде [2]. В дальнейшем уровень БСОП в данной группе снижается и сохраняется стабильным. У пренатально

Таблица 1

Уровень свободного и белковосвязанного оксипролина в поджелудочной железе животных, мг/г белка, ($Me(Q1-Q3)$)

Группа	СОП			БСОП		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	0,68 (0,42–0,89)	1,29 (1,11–1,47)	1,11 (0,52–1,37)	8,08 (5,48–8,91)	2,81 (2,08–3,13)	2,72 (2,00–3,59)
Алкоголь	4,8 (3,14–7,66) $pU = 0,001$	2,66 (2,27–3,55) $pU = 0,001$	3,23 (2,12–4,13) $pU = 0,019$	10,00 (9,20–13,00) $pU = 0,001$	7,61 (4,45–11,38) $pU = 0,001$	5,71 (4,63–6,89) $pU = 0,001$

Таблица 2

Коллагенолитическая активность в поджелудочной железе, мкмоль/ч г белка, ($Me(Q1-Q3)$)

Группа	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	74,25 (66,55–81,32)	128,99 (108,18–142,75)	89,75 (86,60–93,91)
Алкоголь	142,95 (95,07–235,95) $pU = 0,015$	188,57 (136,60–213,49) $pU = 0,032$	98,40 (93,17–105,85) $pU = 0,049$

Таблица 3

Уровень свободного и белковосвязанного оксипролина в печени, мкг/г белка ($Me(Q1-Q3)$)

Группа	СОП			БСОП		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	2,90 (1,09–5,85)	3,35 (1,46–6,4)	4,00 (1,20–6,10)	5,60 (4,13–9,11)	4,51 (3,20–9,44)	4,90 (3,45–9,00)
Алкоголь	8,30 (4,51–11,40) $pU = 0,002$	6,33 (4,78–10,00) $pU = 0,012$	6,36 (3,28–9,20) $pU = 0,005$	11,90 (7,30–16,27) $pU = 0,003$	10,09 (6,92–14,6) $pU = 0,005$	9,28 (6,78–15,21) $pU = 0,015$

Таблица 4

Коллагенолитическая активность в печени, мкмоль/ч г белка, ($Me(Q1-Q3)$)

Группа	Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	155,03 (115,10–179,12)	185,00 (152,90–199,45)	182,10 (151,32–262,13)
Алкоголь	282,10 (161,20–563,41) $pU = 0,002$	242,55 (215,38–271,60) $pU = 0,016$	142,95 (115,15–166,20) $pU = 0,025$

алкоголизованных животных уровень БСОП в постнатальном онтогенезе также имеет тенденцию к снижению, однако статистически достоверно превышает значения контрольных групп в возрасте 15 суток в 1,2 раза ($p = 0,001$), в возрасте 30 суток — в 2,7 раза ($p = 0,001$) и 60 суток — в 2,1 раза ($p = 0,001$).

Показатель общей коллагенолитической активности в ткани поджелудочной железы у пренатально алкоголизованных крыс в 15-суточном возрасте увеличен в 1,9 раза ($p = 0,015$) в сравнении с контрольными животными (табл. 2).

В последующие сроки наблюдения различия в сравнении с показателями группы «Контроль» уменьшаются, но остаются статистически значимыми.

Уровень тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы в гомогенатах поджелудочной железы (ТИМП-1) у алкоголизованных крыс в возрасте 15 суток не имел существенных отличий от уровня в контрольной группе (рис. 1).

В возрасте 30 суток отмечается рост данного показателя, который превышает контрольные значения на 146,2% ($p = 0,045$). В возрасте 60 суток в группе «Алкоголь» содержание ТИМП-1 ниже контрольных значений на 31,1% ($p = 0,010$).

В ткани печени пренатально алкоголизованных животных, как и в поджелудочной железе, уровень СОП на 15-е сутки развития выше контрольных значений в 2,9 раза ($p = 0,002$), на 30-е сутки жизни на 22% ($p = 0,012$) (табл. 3). В возрасте 60 суток содержание СОП в печени пренатально алкоголизованных животных остается повышенным на 59% ($p = 0,005$) по отношению к показателям контрольной группы.

Уровень БСОП в печени животных группы «Алкоголь» повышен в 2,1 раза ($p = 0,003$) в 15-е сутки жизни и на 30-е сутки жизни в 2,2 раза ($p = 0,005$).

относительно значений группы «Контроль». На 60-е сутки жизни содержание БСОП в печени пренатально алкоголизованных животных сохраняется повышенным по сравнению с группой «Контроль» в 1,5 раза ($p = 0,015$).

Высокое содержание свободного и белковосвязанного оксипролина в ткани печени потомства алкоголизованных крыс сопровождается увеличением общей коллагенолитической активности на 81% ($p = 0,002$) на 15-е сутки жизни и на 30-е сутки на 31% ($p = 0,016$) относительно значений группы «Контроль» (табл. 4).

На 60-е сутки жизни происходит снижение общей коллагенолитической активности в 1,3 раза ($p = 0,025$) относительно значений в группе «Контроль». При этом в печени животных группы «Алкоголь» отмечался высокий уровень ТИМП-1: на 15-е сутки развития на 26% ($p = 0,047$) и на 30-е сутки на 30% ($p = 0,034$). На 60-е сутки жизни содержание ТИМП-1 снижается на 16% ($p = 0,048$) по отношению к группе «Контроль» (рис. 2).

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет считать, что пренатальная алкогольная интоксикация сопровождается выраженными нарушениями обмена коллагена печени и поджелудочной железы.

Рост коллагенолитической активности, наблюдаемый нами во все сроки эксперимента, наряду с повышенным уровнем СОП у пренатально алкоголизованных животных свидетельствует об активации процессов катаболизма коллагена. Чрезмерная деградация может быть триггером нерегулируемого производства компонентов внеклеточного матрикса, характерного для развития фиброза [11], что выражается в увеличении уровня БСОП, выявленного в нашем исследовании. Усиление процессов фибриллообразования, по-видимому, связано с повышением функциональной активности клеток соединительной ткани в ответ на

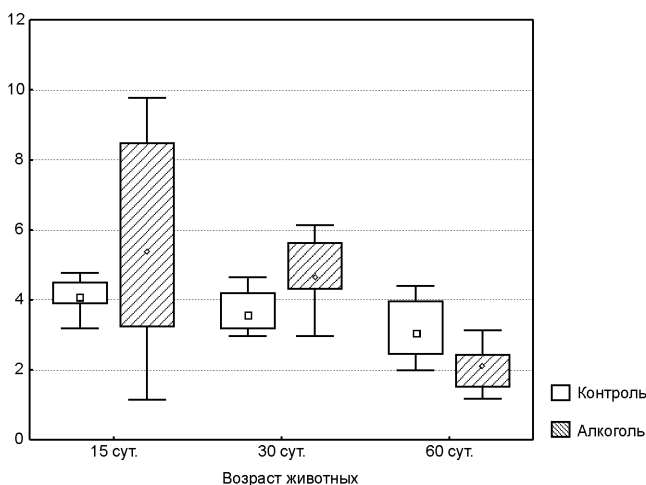


Рис. 1. Содержание ТИМП-1 в гомогенатах поджелудочной железы (мкг/г белка)

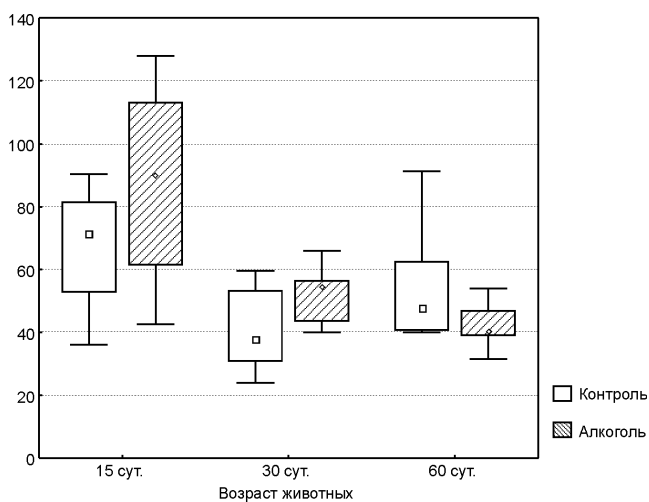


Рис. 2. Содержание ТИМП-1 в ткани печени (мкг/г белка)

повреждение гепатоцитов и панкреоцитов свободными радикалами на фоне истощения антиоксидательной системы, вызванного алкогольной интоксикацией. Такое усиление разнонаправленных процессов, по мнению В.В. Серова [12], наблюдается при remodelировании ткани и лежит в основе компенсаторных изменений, приводящих к нарушению свойственного соединительной ткани динамического равновесия между биосинтезом и катаболизмом коллагена.

При сопоставлении показателей коллагенолитической активности и содержанием ТИМП-1 в печени и поджелудочной железе у животных, алкоголизированных в пренатальном периоде, наблюдается неоднозначная картина. На фоне повышенной коллагенолитической активности уровень ТИМП-1 на ранних стадиях постнатального онтогенеза достоверно превышает контрольные значения, однако в возрасте 60 суток резко снижается. Такой дисбаланс, как правило, наблюдается в органах при различных патологических процессах, вызванных, в том числе, факторами алкогольного генеза [13].

Список литературы

1. Ellenrieder V., Schneiderhan W., Bachem M., Adler G. Fibrogenesis in the pancreas // *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* — 2004. — №49. — P. 40—46.
2. Fridman S.L. Liver fibrosis — from bench to bedside // *Hepatology.* — 2003. — №38. — P. 38—53.
3. Скворцов В.В., Тумаренко А.В. Гепатопротекция при терапии хронического гепатита алкогольной этиологии // *Consilium medicum.* — 2009. — Т. 11, №8. — С. 32—35.

4. Shimizu K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis // *J. Gastroenterol.* — 2008. — №43(11). — P.823—832.

5. Высокогорский В.Е., Самусева Н.Л., Мкртчян О.Э., Вальтер С.Ж. Интенсивность свободнорадикальных процессов и нарушение закономерностей органогенеза у пренатально алкоголизированного потомства // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* — 2003. — №1 (27). — С. 69—71.

6. Высокогорский В.Е., Самусева Н.Л. Роль глутатиона в антиоксидательной защите печени пренатально алкоголизированных крыс // *Материалы конф. биохимиков Урала, Поволжья и Западной Сибири «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии».* — Ижевск, 2001. — С. 100—102.

7. Люпо А.В., Омеляничик М.С., Чумакова О.В. Ингаляционное воздействие малых доз этанола при беременности на развитие потомства крыс // *Бюлл. эксперим. биологии и медицины.* — 1996. — №3. — С. 265—267.

8. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Кильдиярова Р.Р. и др. Соединительная ткань в детском возрасте. — Ижевск, 2009. — 144 с.

9. Шараев П.Н., Иванов В.Г., Рябов В.И. Биохимическое методы анализа показателей обмена биополимеров соединительной ткани. — Ижевск, 1989. — 15 с.

10. Петри А., Сэбин К. Наглядная статистика в медицине. — ГЭОТАР-МЕД, 2003. — 142 с.

11. Gutierrez-Ruiz M.C., Gomez-Quiroz L.E. Liver fibrosis: searching for cell model answers // *Liver Intern.* — 2007. — №10. — P. 434—439.

12. Серов В.В., Шехтер А.Б. Соединительная ткань. — М.: Медицина, 1981. — 312 с.

13. Wanless J.R., Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver diseases: a four — step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis // *Semin. Liver Dis.* — 2004. — №24. — P. 99—106.

14. Casini A., Cunningham M., Rojkind M., Lieber C. Acetaldehyde increases procollagen type 1 and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism // *Hepatology.* — 1999. — №13. — P. 758—765.

METABOLISM OF COLLAGEN IN THE LIVER AND PANCREAS IN PRENATAL ALCOHOL INTOXICATION RAT

KURCH N.M.

PhD, assistant of department of biochemistry and laboratory medicine with a course of clinical laboratory diagnostics the graduate education OmSMA

ARZAMASOVA O.A.

post-graduate of department of biochemistry and laboratory medicine with a course of clinical laboratory diagnostics the graduate education OmSMA

VYSOKOGORSKII V.E.

professor, head of Department of Biochemistry and Laboratory Medicine with a course of clinical laboratory diagnostics the graduate education OmSMA Omsk-644043, Lenin st. 12. E-mail: rector@omsk-osma.ru

Prenatal alcoholisation causes revealed biochemical signs of impaired metabolism of collagen in the connective tissue of the liver and pancreas, which resulted in increasing concentrations of free hydroxyproline and protein-binding hydroxyproline. These changes were accompanied by reduced levels of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and increased collagenolytic activity.

Key words: prenatal alcoholisation, free hydroxyproline, protein-binding hydroxyproline, inhibitor of matrix metalloproteinase-1