

УДК 616.379 – 008.64: 612.015.39: 611.711: 611.08

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

ДИНАМИКА ОБМЕНА КОЛЛАГЕНА 1-ГО ТИПА В ТРАБЕКУЛЯРНОЙ КОСТИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

С применением метода твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) выполнено исследование специфических маркёров метаболизма коллагена 1-го типа в губчатой костной ткани у крыс с диабетом. В качестве экспериментальной выбрана хорошо воспроизводимая модель аллоксанового диабета, в результате проведения которой у подопытных животных развивается состояние, сходное по метаболическим проявлениям с сахарным диабетом 1-го типа. Выявлено ускорение метаболического оборота изучаемого белка в динамике эксперимента с одновременным угнетением анаболических и активацией катаболических процессов к 28 дню диабета. В связи с вероятностью развития трудно корректируемых патологических изменений в костной ткани, нередко наблюдающихся при сахарном диабете, определены основные тенденции метаболических процессов, связанных с обменом коллагена в условиях экспериментального диабета.

Ключевые слова: коллагенолитическая активность, гидроксипролин, аллоксановый диабет, диабетическая остеопатия, маркёры костного метаболизма, карбокситерминальный телопептид коллагена 1-го типа, аминотерминальный пропептид проколлагена 1-го типа.

Сахарный диабет (СД) – группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом дефекта секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов. Хроническая гипергликемия при диабете сочетается с повреждением, дисфункцией и развитием недостаточности различных органов [1]. Являясь одним из наиболее распространенных хронических заболеваний, СД является реальной угрозой здоровью и качеству жизни населения всех стран мира [2].

Очевидна высокая социально-экономическая значимость этого заболевания: уровень инвалидизации больных, несмотря на высокое качество используемых при лечении СД препаратов и создание системы диабетологической помощи, существенно не снижается [3], при этом основная тяжесть прямых расходов, направленных на борьбу с СД, приходится на расходы, связанные с развитием его осложнений [4].

Одним из хронических осложнений СД является диабетическая остеопатия [5], проявляющаяся от умеренно выраженного остеопороза до спонтанных переломов трубчатых костей [6]. Патологические механизмы развития диабетической остеопатии у больных с СД до конца не изучены [7], однако в патогенезе развития данного осложнения установлено следующее: снижение выработки остеобластами коллагена и щелочной фосфатазы, необходимых для образования костного матрикса и его минерализации, вызванное абсолютным дефицитом инсулина; снижение стимуляции остеобластов, опосредованное через инсулиноподобные факторы роста (ИФР); усиление резорбции костной ткани остеокластами, вызванное накоплением продуктов гликозилирования по причине хронического прямого влияния высоких концентраций глюкозы [8]. Показано, что у больных СД значительно снижен синтез коллагена, усилено выделение с мочой пиридинолина, дезоксипиридинолина (производные поперечных волокон коллагена, специфичные для костей и хрящевой ткани) и гидроксипролина (производное пролина, вещество, почти исключительно содержащееся в коллагене). Однако необходимо учесть, что гидроксипролин образуется при распаде коллагена, локализуяющегося в различных тканях, а не только в костной, поэтому изменение уровня данного показателя следует рассматривать как косвенный признак развития каких-либо изменений в костях.

Кость – это постоянно обновляемая ткань, и в костной ткани непрерывно сосуществуют два основных процесса: резорбция и формирование ткани. Ряд веществ, связанных с этими процессами, рассматриваются как маркёры костного метаболизма [9]. По отношению к основному органическому компоненту костной ткани – коллагену 1-го типа, помимо перечисленных выше, относятся следующие вещества-аналиты: amino- и карбокситерминальный пропептиды проколлагена I типа (P1NP и P1CP соответственно, маркёры формирования) [10; 11], amino- и карбокситерминальный телопептиды коллагена 1-го типа, связанные с поперечными сшивками (NTX и CTX (CROSSLAPS) соответственно, маркёры резорбции) [10; 12]. Уровень указанных маркёров в диагностических целях определяется в крови различными иммунохимическими методами.

Ввиду опасности развития малообратимых или необратимых осложнений в костной ткани очевидна необходимость дальнейшего изучения патогенетических феноменов остеопатических процессов при СД, что возможно благодаря экспериментальным моделям этого заболевания.

Моделирование СД у лабораторных животных проводят с помощью разнообразных методик, в числе которых широкое применение получила аллоксановая модель. Многочисленными исследованиями установлено, что введение крысам аллоксана вызывает состояние, сходное по проявлениям с инсулинзависимым СД, а именно: вызывает развитие стойкой гипергликемии и гипоинсулинемии [13; 14].

Целью нашего исследования явилось изучение динамики изменения метаболизма коллагена губчатой костной ткани у крыс с аллоксановым диабетом.

Материалы и методы исследований

Эксперимент проведён на 72 белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г с соблюдением принципов гуманного обращения с животными, изложенными в Хельсинской декларации (2000). Животных содержали на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и корму.

Исследовали две группы животных. Контрольную группу составили 10 интактных крыс, которым однократно ввели 0,5 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия. Опытную группу составили 65 крыс с аллоксановым диабетом. Аллоксановый диабет индуцировали путем однократного подкожного введения аллоксана тетрагидрата (Sigma-Aldrich, США) в дозе 170 мг/кг веса животного по методу Н.А. Пальчиковой [15]. Летальность в ходе эксперимента составила 40 %. Воспроизведение диабета контролировали по совокупности показателей: уровня глюкозы в плазме крови глюкозооксидазным методом («Ольвекс Диагностикум») и уровня гликозилированного гемоглобина в цельной крови (тест-система Nycocard-HbA_{1c} на рефлектометре Nycocard Reader II). Животных выводили из эксперимента под кратковременным эфирным наркозом на 7, 14, 21, 28 дни опыта.

В гомогенатах тела 2-го поясничного позвонка (губчатая костная ткань) определяли: количество суммарного коллагена (СК) [16], P1NP (ИФА, ELISA; Cloud-Clone Corp., США), β -CrossLaps (ИФА, ELISA; IDS SERUM CrossLaps[®], Великобритания). Количество СК выражали в миллимоль гидроксипролина на 1 кг массы сухой ткани (ммоль/кг), P1NP и β -CrossLaps – в пикомоль на 1 мл насадка гомогената (пг/мл).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0 фирмы Stat Soft. В группах выборки определяли медиану (Me) и межквартильный интервал (25 %; 75 %). Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна–Уитни с критическим уровнем 0,05.

Результаты и их обсуждение

Введение аллоксана животным вызвало развитие гипергликемии и увеличение уровня гликозилированного гемоглобина. Уровень глюкозы в плазме крови натошак к 7 дню исследования составил 215 % от контроля ($p = 0,0004$), постепенно снижаясь до 152 % ($p = 0,0004$) от контроля к 28 дню эксперимента. Уровень гликозилированного гемоглобина увеличивался в динамике исследования на 16 % ($p = 0,0002$), 28 % ($p = 0,0006$), 35 % ($p = 0,0002$), 39 % ($p = 0,0003$) по сравнению с контролем к 7, 14, 21, 28 дням эксперимента соответственно. Характер изменений данных двух показателей позволяет говорить о развитии диабета у животных.

Взаимодействие процессов синтеза и распада коллагена определяет состояние его обмена и количественно характеризуется уровнем метаболитов данного белка. На преобладание синтетических процессов указывает увеличение уровня P1NP [10; 11] и СК [17]. Превалирование процессов деградации характеризуется повышением уровня β -CrossLaps [10; 12] и снижением СК [17; 18].

В наших опытах количество СК в теле 2-го поясничного позвонка изменялось следующим образом: увеличение на 18,57 % ($p = 0,03$) и на 74,11 % ($p = 0,0006$) к 14 и 21 дням эксперимента соответственно по сравнению с контролем сменялось последующим снижением до исходного уровня к 28 дню опыта (достоверных различий с контролем по данному показателю не выявлено). Характер изменений в динамике уровня иммуноактивных маркёров метаболизма коллагена неоднозначен. Уровень P1NP к 14 дню опыта вырос на 234 пг/мл ($p = 0,0004$) в сравнении с контролем, не отличался от последнего к 21 дню исследования и снизился до 17,2 пг/мл ($p = 0,03$) к 28 дню эксперимента. Зна-

чений показателя β -CrossLaps отличных от нуля в группе контроля и на 7 день наблюдения не выявлено. Достоверный рост данного маркера выявлен на 14 (62,25 пг/мл; $p = 0,008$), 21 ($p = 0,00007$), 28 ($p = 0,0003$) дни аллоксанового диабета. Колебания уровней данных показателей отображены на рисунке, который наглядно демонстрирует стадийность изменения показателей соотношения «синтез–распад коллагена».

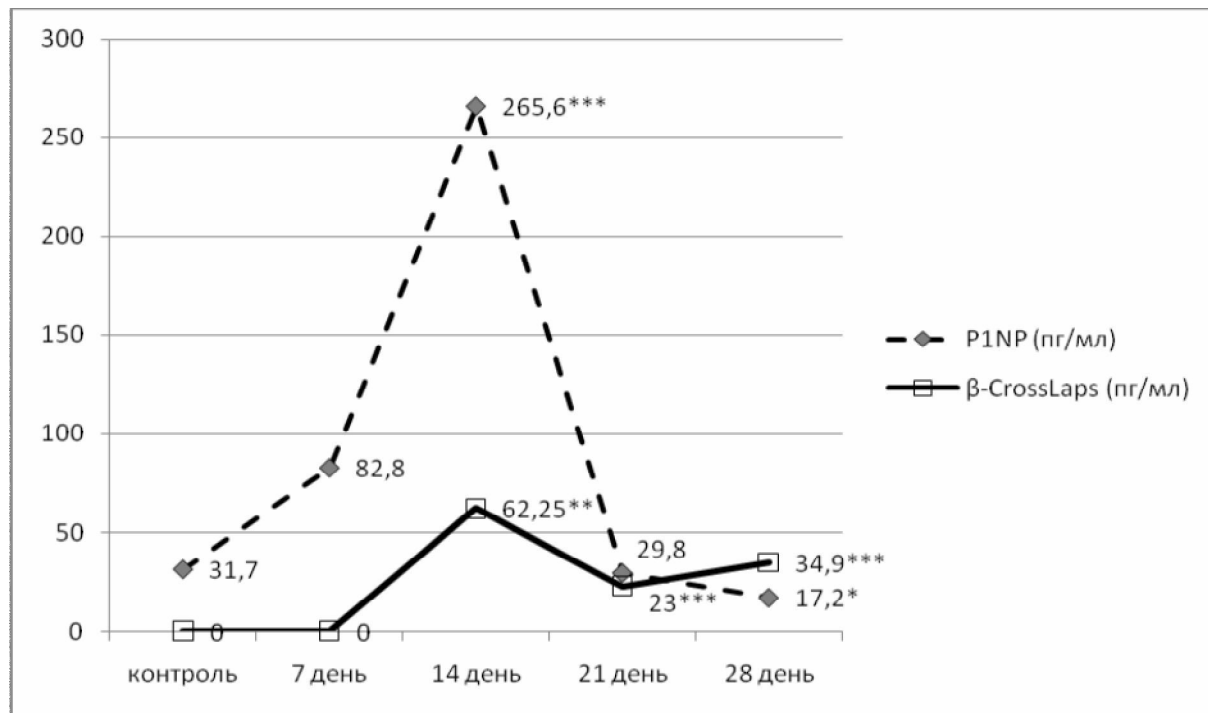


Рис. Колебания уровней маркеров обмена коллагена в губчатой костной ткани, Ме:
 p – достоверность различий с контролем (* – $p < 0,05$ ** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$)

В патогенезе поражения костной ткани при сахарном диабете существенную роль играет избыток глюкокортикоидных гормонов [19]. Глюкокортикоиды усиливают костную резорбцию, что приводит к снижению костной массы [20]. Этим можно объяснить увеличение содержания β -CrossLaps на 14, 21 и 28 дни наблюдения.

С другой стороны, по данным литературы, глюкокортикоиды снижают всасывание кальция в кишечнике. При этом наблюдаются снижение синтеза кальций-связывающего белка, дефицит витамина D и ускоренное разрушение в слизистой рецепторных зон к кальцитриолу [21]. Дефицит витамина D, приводящий к рахиту, вызывает у крыс увеличение числа остеобластов и ускорение синтеза коллагена остеобластами [16].

Угнетение анаболических процессов к 28 дню опыта, видимое по снижению уровня P1NP на 45,74 % ($p = 0,03$), может объясняться пониженным образованием инсулиноподобного фактора роста I (ИФР-I) [5], что опосредовано гипоинсулинемией, которая наблюдается при аллоксановом диабете [13; 14; 17].

Выводы

Полученные экспериментальные данные говорят о нарастании интенсивности костной резорбции к 14, 21, 28 дням опыта и усилении процессов анаболизма коллагена к 14 дню диабета, сменяющимся их угнетением к 28 дню эксперимента, что позволяет сделать вывод об интенсификации метаболической активности, а также выявить тенденцию к угнетению остеогенеза в трабекулярной кости у крыс с аллоксан-индуцированным диабетом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Сахарный диабет и артериальная гипертензия. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 344 с.
2. Дедов И.И. Сахарный диабет: развитие технологий в диагностике, лечении и профилактике (пленарная лекция) // Сахарный диабет. 2010. № 3. С. 6-13.
3. Сунцов Ю.И., Маслова О.В., Дедов И.И. Скрининг осложнений сахарного диабета как метод оценки лечебно-профилактической помощи больным // Проблемы эндокринологии. 2010. № 1. С. 3-8.
4. Дедов И.И., Сунцов Ю.И., Кудрякова С.В. Экономические проблемы сахарного диабета в России // Сахарный диабет. 2000. № 3. С. 56-58.
5. Шишкин А.Н., Мануленко В.Н. Диабетическая остеопатия // Вестн. Санкт-Петербургского ун-та. Сер. 11, Медицина. 2008. №3. С. 70-79.
6. Мкртумян А.М., Хасанова Э.Р., Балаболкин М.И. Коррекция нарушенного костного метаболизма и фосфорно-кальциевого обмена при диабетической остеопении // Сахарный диабет. 2000. № 2. С. 17-21.
7. Мануленко В.В., Шишкин А.Н., Мазуренко С.О. Клинические особенности развития остеопатии у больных сахарным диабетом 2-го типа // Вестн. Санкт-Петербургского ун-та. Сер. 11: Медицина. 2009. № 2. С. 7-13.
8. Жолдышбеков Е.Ж., Жолдышев Б.Н., Мадумаров М.Г. Костно-суставные изменения при сахарном диабете // Вестн. КРСУ. 2010. Т. 10, № 7. С. 133-136.
9. Гречишкин А.К., Свешников А.А. Минеральная плотность костной ткани у больных с диабетическими поражениями нижних конечностей (обзор литературы) // Гений Ортопедии. 2009. № 1. С. 121-127.
10. Торопцова Н.В., Никитинская О.А. Прогноз эффективности терапии с помощью биохимических маркеров костного метаболизма // Украинский ревматологический журн. 2011. Т. 3, № 45. С. 35-38.
11. Побел Е.А., Бенгус Л.М., Дедух Н.В. Маркёры костного метаболизма при сращении переломов длинных костей // Остеопороз и остеопатии. 2012. № 2. С. 25-32.
12. Gerdhem P., Ivaska K.K., Alatalo S.L. et al. Biochemical markers of bone metabolism and prediction of fracture in elderly women // J. Bone Miner Res. 2004. Vol. 19, № 3. P. 386-393. doi: 10.1359/JBMR.0301244.
13. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // Diabetologia. 2008. Vol. 51, № 2. P. 216-226.
14. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas // Physiol. Res. 2001. Vol. 50. P. 536-546.
15. 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.
16. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически изменённой соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 376 с.
17. Савинова Н.В., Переведенцева С.Е. Влияние хронического стресса на изменение фракционного состава коллагена костной ткани крыс с аллоксановым диабетом // Сб. научных статей, посвящ. 70-летию кафедры биохимии ГОУ ВПО ИГМА. Ижевск: Ижев. гос. медицинская академия, 2005. С. 141-145.
18. Данилова О.В. Обмен коллагена костной ткани крыс при воздействии преднизолоном в условиях экспериментального диабета: дис. ... канд. мед. наук. Уфа, 2010. 144 с.
19. Ткач С.Н., Щербак А.В. Поражение костно-суставной системы при сахарном диабете // Клиническая медицина. 1986. № 5. С. 21-26.
20. Руководство по остеопорозу / под ред. Л.И. Беневоленской. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2003. 524 с.
21. Поровознюк В.В., Мазур И.П. Костная система и заболевания пародонта. Киев: Книга Плюс, 2004. 446 с.

Поступила в редакцию 09.07.14

V.A. Vyatkin, E.G. Butolin, O.V. Danilova, S.E. Perevedenceva
**DYNAMICS OF COLLAGEN I METABOLISM IN THE TRABECULAR BONE
OF ALLOXAN-INDUCED RATS**

Using the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the authors have studied the specific markers of collagen I in the cancellous bone of diabetic rats. As an experimental model the authors chose the well reproducible model of alloxan diabetes, because of which experimental animals undergo a condition similar to insulin-dependent diabetes by its metabolic manifestations. Acceleration of metabolic turnover of the studied protein in the experiment with simultaneous inhibition of anabolic and activation of catabolic processes has been detected by the 28th day of diabetes. Due to the likelihood of little reversible pathological changes in bone tissue, often observed in diabetes, the authors have identified the key trends of metabolic processes associated with the collagen exchange in experimental diabetes.

Keywords: collagenolytic activity, hydroxyproline, alloxan diabetes, diabetic osteopathy, markers of bone metabolism, C-terminal telopeptide of type I collagen, procollagen I N-terminal propeptide.

Вяткин Василий Алексеевич,
аспирант кафедры биохимии
E-mail: vyatkinva@yandex.ru

Бутолин Евгений Германович,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биохимии
E-mail: butolin@igma.udm.ru

Данилова Ольга Владимировна,
кандидат медицинских наук,
старший преподаватель кафедры биохимии
E-mail: danilova-stlab@yandex.ru

Переведенцева Светлана Евгеньевна,
кандидат медицинских наук,
доцент кафедры биохимии
E-mail: biochim@igma.udm.ru

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная
медицинская академия»
426000, Россия, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281

Vyatkin V.A.,
postgraduate student of the Department of biochemistry
E-mail: vyatkinva@yandex.ru

Butolin E.G.,
Doctor of Medicine, Professor,
Head of the Department of biochemistry
E-mail: butolin@igma.udm.ru

Danilova O.V.,
Candidate of Medicine, Senior Lecturer
of the Department of biochemistry
E-mail: danilova-stlab@yandex.ru

Perevedenceva S.E.,
Candidate of Medicine, Associate Professor
of the Department of biochemistry
E-mail: biochim@igma.udm.ru

Izhevsk State Medical Academy
Kommunarov st., 281, Izhevsk, Russia, 426000