

МЕТАБОЛИЗМ ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ ПЕЧЕНИ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПОТОМСТВА АЛКОГОЛИЗИРОВАННЫХ КРЫС

При моделировании пренатальной алкогольной интоксикации у потомства крыс выявлены биохимические признаки нарушения метаболизма компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани печени и поджелудочной железы, проявившиеся в увеличении концентрации глюкуроновой кислоты, гликозаминогликанов, свободного и белковосвязанного оксипролина, активности β -глюкуронидазы, что сопровождалось снижением уровня тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 и ростом коллагенолитической активности. Вероятными пусковыми факторами данных изменений являлись интенсификация оксидативного стресса и истощение резервов глутатион-опосредованной антиоксидантной системы.

Ключевые слова: пренатальная алкогольная интоксикация, окислительный стресс, глутатион, гликоконьюгаты, межклеточный матрикс.

Интерес к вопросам пренатальной алкогольной интоксикации, приводящей к развитию алкогольного синдрома плода (АСП), обусловлен чрезвычайно высокой чувствительностью эмбриона и плода к воздействию различных токсических факторов. В основе развития АСП лежит повреждающее действие алкоголя и более токсичного продукта его распада — ацетальдегида [1]. Пренатальная этаноловая интоксикация оказывает мембранотоксическое действие, вызывает нарушение реакций окислительного фосфорилирования, синтеза РНК, развитие алкогольной гипогликемии, нарушение трансплацентарного переноса эссенциальных аминокислот, цинка и др. [2]. При этом у плода происходит нарушение тканевой репарации и развитие дистрофических процессов в различных органах.

Известно, что хроническая алкогольная интоксикация в эксперименте на взрослых половозрелых крысах сопровождается активацией свободнорадикального окисления [3] и приводит к увеличению в печени содержания углевод-белковых комплексов [4]. Кроме того, имеются данные об избыточном накоплении фибриллярного коллагена в интерстиции и рост внеклеточного матрикса различных органов под действием этаноловой интоксикации [5].

Особенности реакций соединительной ткани и участие углевод-белковых комплексов в развитии последствий пренатальной алкогольной интоксикации малоизучены и в литературе практически не освещены. В связи с этим проведено экспериментальное исследование с целью выявления метаболических изменений компонентов межклеточного матрикса в печени и поджелудочной железе потомства алкоголизированных крыс в различные сроки постнатального онтогенеза.

Материал и методы исследования

Исследование выполнено на 278 потомках белых беспородных крыс в различные сроки постнатального онтогенеза. Для моделирования пренатальной алкогольной интоксикации половозрелым самкам ежесуточно интрагастрально вводили раствор этанола в дозе 4 г/кг массы животного в течение всего срока гестации. Потомство, полученное от этих самок, составило группу «Алкоголь». Самки контрольной группы получали эквивалентное количество физиологического раствора. Потомство данных самок составило группу «Контроль». Животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации под эфирным наркозом в возрасте 15, 30 и 60 суток.

Содержание глюкуроновой кислоты (ГК), гликозаминогликанов (ГАГ) определяли карбазольной реакцией Диле в модификации П. Н. Шараева, активность β -глюкуронидазы путем определения высвобождаемого из 4-нитрофенил- β -D-глюкуронида окрашенного 4-нитрофенола. Обмен коллагена в гомогенатах указанных органов оценивали по содержанию свободного и белковосвязанного оксипролина. Уровень тканевого ингибитора металлопротеиназы-1 (ТИМП-1) определяли набором реагентов «BioSours International Inc. Human TIMP-1 ELISA». Коллагенолитическую активность оценивали с использованием в качестве субстрата коллагена (Фирма «Технология-Стандарт») с последующим определением продукта распада этого белка — оксипролина.

Интенсивность свободно-радикальных процессов в печени изучалась с помощью хемилюминесцентного (ХЛ) анализа. В процессе хемилюминесценции фиксировали спонтанную ХЛ, а после инициации — максимальную амплитуду быстрой, медленной вспыш-

Таблица 1

Уровень ГК и ГАГ в ткани печени и поджелудочной железы,
мг/г белка, Ме (Q1-Q3)

Группы	Печень			Поджелудочная железа		
	Возраст животных			Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
	Глюкуроновая кислота					
Контроль	1,04 (0,58-1,13)	1,35 (1,02-1,53)	1,12 (0,98-1,34)	2,01 (1,65-2,30)	2,82 (2,23-3,65)	2,28 (1,79-2,64)
Алкоголь	1,89 (1,23-2,19) p = 0,001	1,78 (1,32-2,29) p = 0,041	0,53 (0,46-0,69) p = 0,001	9,28 (7,30-12,01) p = 0,001	22,12 (10,89-29,02) p = 0,001	2,16 (1,88-2,53) p = 0,796
	Гликозаминогликаны					
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
	Гликозаминогликаны					
Контроль	2,26 (2,0 – 2,91)	1,60 (1,22-3,30)	1,54 (1,46-1,65)	7,03 (6,28-8,74)	5,28 (3,56-8,83)	4,45 (3,71-7,30)
Алкоголь	4,42 (3,62-5,25) p = 0,002	3,86 (3,14-8,38) p = 0,003	2,57 (1,92-2,98) p = 0,005	48,84 (27,58-76,93) p = 0,001	14,12 (10,69-16,74) p = 0,001	14,80 (10,41-19,04) p = 0,001

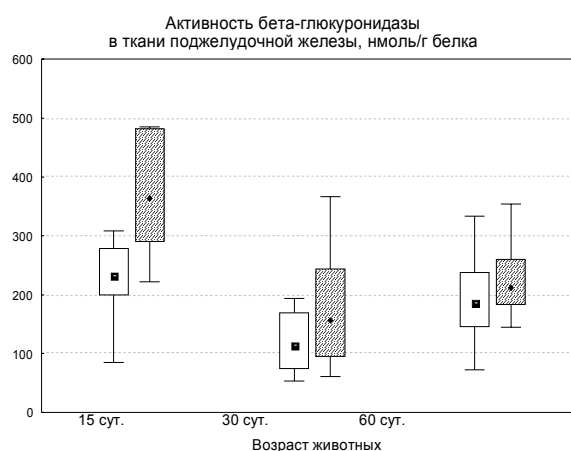
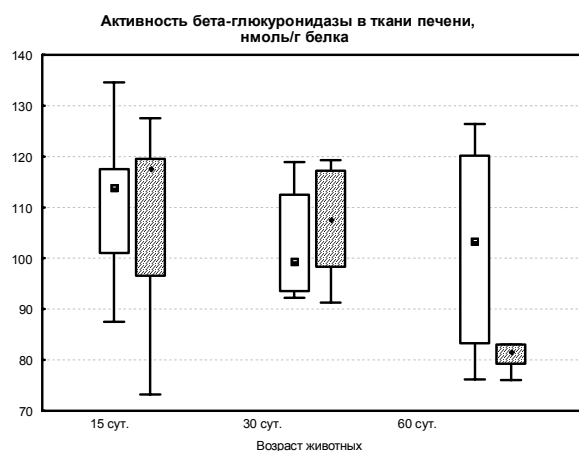


Рис. 1. Активность β -глюкуронидазы в ткани печени и поджелудочной железы:
□ — контроль, ▨ — алкоголь

ки свечения, а также латентный период. Активность глутатионредуктазы определяли по методу E. Rack-er (1955), глутатион-S-трансферазы по методу W. H. Habid et al. (1974). Уровень восстановленного глутатиона измеряли по методу J. Sedlak et al. (1968). Содержание карбонилированных белков в гомогенатах печени и поджелудочной железы устанавливали с помощью метода A. Z. Reznick в модификации E. E. Дубининой.

Результаты и их обсуждение

При изучении метаболизма компонентов соединительной ткани печени и поджелудочной железы был выявлен ряд изменений. У пренатально алкоголизированного потомства в ранние сроки постнатального онтогенеза отмечается увеличение содержания ГК и ГАГ как в печени, так и в поджелудочной железе. В дальнейшем уровень ГК в данных органах существенно снижается, достигая контрольных значений. Содержание ГАГ также имеет тенденцию к снижению, но тем не менее сохраняется статистически значимое увеличение данного показателя в сравнении с контрольной группой (табл. 1).

Изменения уровня ГК и ГАГ сопровождается неоднозначными колебаниями активности β -глюкуронидазы — фермента, принимающего участие в ката-

болизме гликозаминогликанов. В гомогенатах печени алкоголизированного потомства в возрасте 15 и 30 суток значимой разницы со значениями контрольной группы не наблюдалось (рис. 1). В возрасте 60 суток активность β -глюкуронидазы в печени снизилась на 78,5 % относительно контрольных показателей.

В ткани поджелудочной железы отмечалась несколько иная тенденция. В возрасте 15 суток активность фермента превышала контрольные цифры на 54,2 %. Однако в более поздних сроках наблюдения активность β -глюкуронидазы в гомогенатах поджелудочной железы не имела статистически значимых отличий от значений в группе «Контроль».

Полученные данные свидетельствуют об интенсификации процессов накопления ГК и ГАГ в межклеточном матриксе соединительной ткани печени и поджелудочной железы. Снижение уровня ГК в ткани печени, сопровождаемое снижением активности β -глюкуронидазы, вероятно, связано со снижением интенсивности процесса распада протеогликановых структур, а также с отвлечением ГК на реакции конъюгации с различными токсическими продуктами [6]. В ткани поджелудочной железы у потомства алкоголизированных крыс уровень ГК и ГАГ во все сроки наблюдения превышает контрольные значения. Высокий уровень ГК и ГАГ на фоне повышенной активности β -глюкуронидазы может свидетельствовать об

Таблица 2

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

Группы	Печень			Поджелудочная железа		
	Возраст животных			Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
	Свободный оксипролин					
Контроль	2,90 (1,09 – 5,85)	3,35 (1,46 – 6,4)	4,00 (1,20 – 6,10)	0,68 (0,42 – 0,89)	1,29 (1,11 – 1,47)	1,11 (0,52 – 1,37)
Алкоголь	8,30 (4,51 – 11,40) p = 0,002	6,33 (4,78 – 10,00) p = 0,012	6,36 (3,28 – 9,20) p = 0,005	4,8 (3,14 – 7,66) p = 0,001	2,66 (2,27 – 3,55) p = 0,001	3,23 (2,12 – 4,13) p = 0,019
Группы	Белковосвязанный оксипролин					
	Возраст животных			Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
	Белковосвязанный оксипролин					
Контроль	5,60 (4,13 – 9,11)	4,51 (3,20 – 9,44)	4,90 (3,45 – 9,00)	8,08 (5,48 – 8,91)	2,81 (2,08 – 3,13)	2,72 (2,00 – 3,59)
Алкоголь	11,90 (7,30 – 16,27) p = 0,003	10,09 (6,92 – 14,6) p = 0,005	9,28 (6,78 – 15,21) p = 0,015	10,00 (9,20 – 13,00) p = 0,001	7,61 (4,45 – 11,38) p = 0,001	5,71 (4,63 – 6,89) p = 0,001

Таблица 3

Коллагенолитическая активность
в ткани печени и поджелудочной железе,
мкмоль/г белка·ч, Me (Q1-Q3)

Группы	Печень			Поджелудочная железа		
	Возраст животных			Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток	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)	74,25 (66,55 – 81,32)	128,99 (108,18 – 142,75)	89,75 (86,60 – 93,91)
Алкоголь	282,10 (161,20 – 563,41) p = 0,002	242,55 (215,38 – 271,60) p = 0,016	142,95 (115,15 – 166,20) p = 0,025	142,95 (95,07 – 235,95) p = 0,015	188,57 (136,60 – 213,49) p = 0,032	98,40 (93,17 – 105,85) p = 0,049

усилении процессов деградации протеогликанов, что согласуется с имеющимися сведениями о тормозящем действии этанола, ацетальдегида на синтез ГАГ и протеогликанов *in vitro* [7].

В качестве показателей обмена коллагена в гомогенатах печени и поджелудочной железы определяли содержание свободного (СОП) и белковосвязанного оксипролина (БСОП). В ткани печени пренатально алкоголизированного потомства отмечается статистически значимое превышение уровня СОП и БСОП по сравнению с подобными показателями в контрольных группах во все сроки эксперимента (табл. 2). При исследовании в сроки эксперимента СОП и БСОП в ткани поджелудочной железы у пренатально алкоголизированных крыс также выявлено их существенное повышение по сравнению с животными контрольной группы. При этом изменения в показателях метаболизма коллагена сохранялись в течение продолжительного периода постнатального онтогенеза.

Высокое содержание СОП и БСОП в ткани печени потомства алкоголизированных крыс сопровождается увеличением общей коллагенолитической активности в ткани печени и поджелудочной железы в 15- и 30-суточном возрасте (табл. 3). На 60-е сутки развития коллагенолитическая активность в печени снижается в 1,3 раза относительно значений в группе «Контроль», тогда как в поджелудочной железе сохраняется значимое превышение контрольных значений. На фоне роста коллагенолитической активности отмечается высокий уровень ТИМП-1 в

печени и поджелудочной железе на ранних стадиях постнатального онтогенеза (рис. 2). Однако в возрасте 60 суток наблюдается резкое снижение содержания ТИМП-1 относительно значений в контрольной группе.

Полученные результаты показателей обмена коллагена указывают на глубокие метаболические сдвиги в данной структуре. Повышение уровня СОП в ткани печени и поджелудочной железы у пренатально алкоголизированных животных свидетельствует об усилении процессов деградации коллагена. В пользу данного предположения свидетельствует повышенная коллагенолитическая активность, наблюдаемая нами во всех сроках эксперимента. Усиленный катаболизм коллагена может быть триггером нерегулируемого производства компонентов внеклеточного матрикса, что предшествует развитию фиброза [8]. При этом выявлено увеличение уровня БСОП, что отражает усиление процессов фибриллообразования в ответ на повреждение паренхиматозных клеток печени и поджелудочной железы, вызванное алкогольной интоксикацией.

Результаты нашего исследования позволяют заключить, что пренатальная алкогольная интоксикация вызывает выраженные нарушения метаболизма компонентов межклеточного матрикса печени и поджелудочной железы. Потенцирующим фактором изменений структурно-функциональных элементов соединительной ткани может являться окислительный стресс, обусловленный подавлением активности компонентов антиоксидантной системы [9].

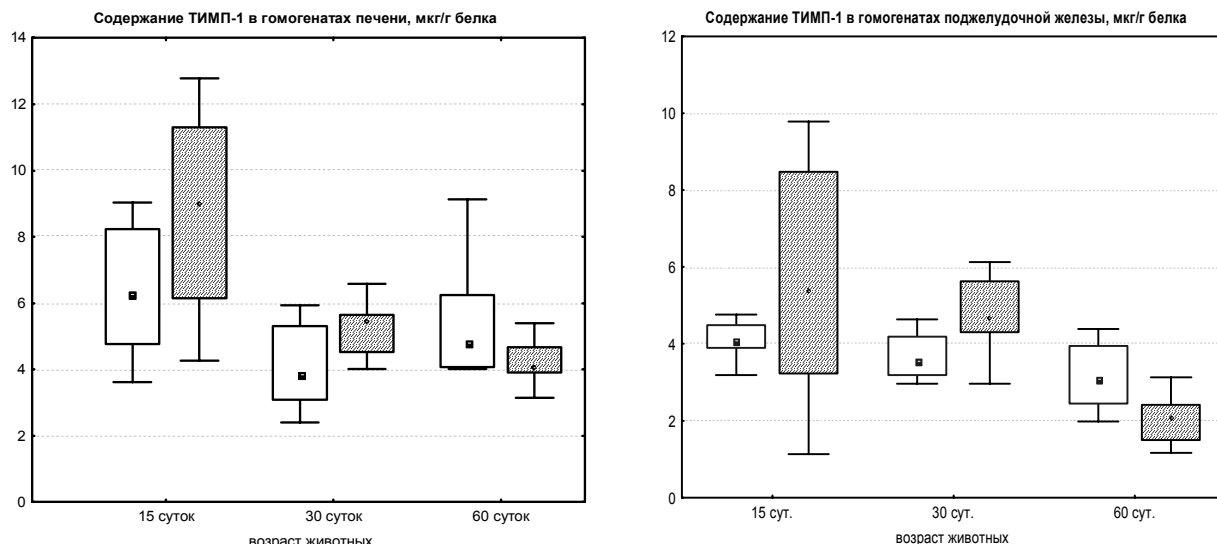


Рис. 2. Уровень ТИМП-1 в ткани печени и поджелудочной железы:
□ — контроль, ▨ — алкоголь

Таблица 4
Содержание продуктов окислительной модификации белков
в ткани печени и поджелудочной железы,
ммоль/г белка, Me (Q1-Q3)

Группы	Печень			Поджелудочная железа		
	Возраст животных			Возраст животных		
	15 суток	30 суток	60 суток	15 суток	30 суток	60 суток
Контроль	2,70 (2,51 – 3,90)	3,53 (2,38 – 4,01)	3,34 (2,36 – 3,60)	6,89 (5,92 – 7,61)	3,91 (3,79 – 5,41)	4,68 (4,48 – 5,14)
Алкоголь	4,05 (3,55 – 4,63) p = 0,012	5,22 (3,20 – 6,85) p = 0,001	4,10 (3,52 – 4,30) p = 0,011	10,37 (7,80 – 12,06) p = 0,003	11,09 (7,81 – 12,96) p = 0,001	8,63 (8,16 – 10,28) p = 0,001

При исследовании процессов свободно-радикального окисления в ткани печени пренатально алкоголизированного крыс установлена его активация, как в ранние, так и более отдаленные сроки постнатального онтогенеза. У 15-суточных животных величина быстрой вспышки, свидетельствующая о содержании гидроперекисей, возросла на 99,2 % ($p < 0,05$), амплитуда медленной вспышки, отражающая способность липидов к перекислению — на 19,1% ($p < 0,01$). К возрасту 30 суток уровень процессов перекисаации достиг максимального значения: разница между величинами показателей быстрой и медленной вспышек составила 85,8 – 96,4 % ($p < 0,05$). В то же время продолжительность латентного периода достоверно не отличалась от контроля. Столь существенная интенсификация свободно-радикальных процессов через 30 суток после прекращения действия этанола свидетельствует о выраженном подавлении компенсаторных возможностей системы антиоксидантной защиты. К 60 суткам постнатального онтогенеза нарушенное равновесие между прооксидантными процессами и антиокислительными резервами несколько восстанавливается, но уровни контрольных показателей не достигает.

Исследование продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) в ткани печени и поджелудочной железы выявило существенный рост данного показателя во все сроки наблюдения у потомства, подвергнутого алкогольной интоксикации (табл. 4). Повышение интенсивности окислительной модификации белков в печени и поджелудочной железе подтверждает наличие активации свободно-радикальных

процессов в указанных органах и может служить одним из ранних маркеров повреждения ткани при пренатальном воздействии этанолом, так как, по мнению [10], при окислительном стрессе в первую очередь повреждаются не липиды, а мембранные белки. В свою очередь процесс окислительной модификации белков становится пусковым механизмом к окислительной деструкции других молекул (липиды, ДНК) клетки.

Результаты определения интенсивности перекисного метаболизма в гомогенатах печени и поджелудочной железы потомства алкоголизированных животных позволили предположить, что возможной причиной активации свободно-радикальных процессов и возникающих метаболических сдвигов может быть подавление активности системы антиоксидантной защиты за счет снижения содержания восстановленного глутатиона и активности глутатион-опосредованных ферментов. Широта протекторного эффекта восстановленного глутатиона, обусловленная участием восстановленного глутатиона как в ферментативной, так и в неферментативной защите клетки от активных форм кислорода различного генеза, предполагает невозможной адекватную оценку функционального состояния антиоксидантной системы клетки без определения содержания в тканях этого метаболита, а также активности зависящих от него ферментов [11].

Высокая интенсивность процессов перекисаации сопровождается депрессией показателей системы антиокислительной защиты. Уровень восстановленного глутатиона в ткани печени у 15-суточного пре-

натально алкоголизированного потомства снижен на 13,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с потомством от самок контрольной группы. К возрасту 60 суток эта разница снижается до 12,4 %, но контрольных значений не достигает. Активность глутатионредуктазы снижена у потомства алкоголизированных животных всех возрастных групп с наибольшей разницей между соответствующим контрольным значением у 2-недельного потомства. Аналогичная динамика наблюдается и при регистрации активности глутатион-S-трансферазы: к 2-месячному возрасту наблюдается некоторая стабилизация ферментативной активности, но разница между величиной показателя в контрольной и алкоголизированной группах сохраняется и составляет 11,6 % ($p < 0,05$).

При исследовании содержания восстановленного глутатиона в ткани поджелудочной железы в возрасте 15 суток уровень восстановленного глутатиона у пренатально алкоголизированного потомства не имеет значимых отличий от значений в контрольной группе. Однако в возрасте 30 суток наблюдается снижение этого показателя более чем в 2 раза, а в возрасте 60 суток — в 1,5 раза в сравнении с группой «Контроль». Подобные изменения свидетельствуют о снижении пула восстановленного глутатиона в условиях пренатальной интоксикации этанолом, что не может не сказаться на эффективном функционировании тиол-дисульфидной системы как компонента антиоксидантной защиты в ткани поджелудочной железы.

Таким образом, индукция и длительная персистенция высокого уровня свободно-радикальных процессов могут поддерживаться нарушением адапционно-компенсаторной реакции со стороны системы антиоксидантной защиты, в том числе снижением уровня восстановленного глутатиона и падением активности глутатион-опосредованных ферментов. Дефицит антиоксидантов и, прежде всего, глутатиона, метаболизм которого нарушается в печени и поджелудочной железе потомства алкоголизированных крыс, приводит к недостаточной инактивации продуктов свободно-радикального окисления, что вызывает в печени и поджелудочной железе патологические изменения различного характера, приводящие к накоплению во внеклеточном матриксе ГК, ГАГ, коллагена. Иницирующими факторами подобных преобразований являются активные формы кислорода, а также ацетальдегид [10], которые форсируют трансформацию звездчатых клеток печени и поджелудочной железы, активацию фибробластов. В результате звездчатые клетки и фибробласты начинают продуцировать большое количество компонентов экстрацеллюлярного матрикса, что в дальнейшем может способствовать развитию фиброза [11].

В биохимическом аспекте высокая степень организованности и упорядоченности межклеточного матрикса выражается специфическими количественными соотношениями образующих его биополимеров, зависящее от динамического равновесия между процессами биосинтеза и биодеградации коллагена. При сопоставлении показателей коллагенолитической активности и содержания ТИМП-1 в печени и поджелудочной железе у животных, алкоголизированных в пренатальный период, наблюдается противоречивая 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. Интенсификация разнонаправленных процессов, по мнению В. В. Серова [12], наблюдается при ремоделировании ткани и

лежит в основе компенсаторных изменений, отмечаемых в органах при различных патологических процессах, вызванных в том числе факторами алкогольного генеза [13].

Библиографический список

1. In utero ethanol exposure elicits oxidative stress in the rat fetus / G. I. Henderson [et al.] // *Alcoholism*. — 1995. — № 3. — P. 714 — 740.
2. Ерохова, З. Н. Особенности здоровья детей раннего возраста с внутриутробной субклинической алкогольной интоксикацией / З. Н. Ерохова, Ю. А. Боженов // *Рос. вестн. перинатал. и педиатрии*. — 1997. — Т. 42, № 1. — С. 70.
3. Роль гидроперекисей в окислительном стрессе при алкоголизации на фоне экспериментального сахарного диабета / Высокогорский В. Е. [и др.] // *Наркология*. — 2007. — № 12. — С. 41 — 45.
4. Нарушение обмена углеводсодержащих соединений при алкогольной интоксикации / Булгакова В. С. [и др.] // *Наркология*. — 2008. — № 5. — С. 50 — 53.
5. Alcoholic liver disease — pathophysiological aspects and risk factors / A. Gramenzi [et al.] // *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. — 2006. — Vol. 24, № 8. — P. 1151 — 1161.
6. Gressner, A. M. Effects of ethanol, acetaldehyde, and lactate on proteoglycan synthesis and proliferation of cultured rat liver fat-storing cells / A. M. Gressner, M. Althaus // *Gastroenterology*. — 1988. — № 3. — P. 797 — 807.
7. Free radicals theory of aging: inhibition of amyloidosis in mice by antioxidants; possible mechanism / D. Harman [et al.] // *J. Am. Geriatr. Soc.* — 1996. — Vol. 24. — P. 203 — 210.
8. Eddy, A. Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis and proteolytic cascades / A. Eddy // *Kidney Int.* — 1998. — Vol. 53. — P. 1182 — 1189.
9. Squier, T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging / T. C. Squier // *Exp. Gerontol.* — 2001. — № 9. — P. 1539 — 1550.
10. Зайцев, В. Г. Защита клеток от экзогенных и эндогенных активных форм кислорода: методологические подходы к изучению / В. Г. Зайцев, В. И. Закревский // *Труды науч. конф. «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биохимии»*. — Санкт-Петербург, 1998. — С. 401 — 405.
11. Acetaldehyde increases procollagen type 1 and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis — dependent mechanism / A. Casini [et al.] // *Hepatology*. — 1999. — № 13. — P. 758 — 765.
12. Серов, В. В. Соединительная ткань / В. В. Серов, А. Б. Шехтер — М.: Медицина, 1981. — 312 с.
13. Shimizu, K. Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis / K. Shimizu. // *J. Gastroenterol.* — 2008. — № 11. — P. 823 — 832.

КУРЧ Наталья Михайловна, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии и лабораторной медицины с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО.

АРЗАМАСОВА Ольга Александровна, аспирант кафедры биохимии и лабораторной медицины с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО.

САМУСЕВА Наталья Львовна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и лабораторной медицины с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО.

ВЫСОКОГОРСКИЙ Валерий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии и лабораторной медицины с курсом клинической лабораторной диагностики ПДО.

Адрес для переписки: be-ha@mail.ru

Статья поступила в редакцию 18.08.2010 г.

© Н. М. Курч, О. А. Арзамасова, Н. Л. Самусева, В. Е. Высокогорский