

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1997

УДК 616-008.934.54-054(985)

И. А. Волчегорский, О. Л. Колесников, В. Э. Цейликман, А. А. Колесникова,
А. Ю. Владимиров**ВЛИЯНИЕ ОБЗИДАНА (ПРОПРАНОЛОЛА) И ПИРОГЕНАЛА НА ПРОЯВЛЕНИЯ
АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА У КРЫС**

Челябинская государственная медицинская академия

Разработка новых подходов к фармакотерапии сахарного диабета является важной задачей современной эндокринологии [2, 20], при этом большое внимание уделяется проблеме коррекции инсулинрезистентности [20]. Средства лечения этого синдрома применяются в основном для терапии сахарного диабета II типа [20]. Вместе с тем снижение вторичной инсулинрезистентности при диабете I типа оптимизирует метаболические эффекты резидуального инсулина и увеличивает чувствительность β -эндокриноцитов к глюкозе [2]. Это позволяет добиться компенсации сахарного диабета на фоне снижения потребности в экзогенном инсулине.

Проблема коррекции инсулинрезистентности актуальна не только в эндокринологии, но и в психиатрии. Массивное применение нейролептиков для лечения шизофрении обуславливает выраженную инсулинрезистентность душевнобольных и снижает эффективность инсулинкоматозной терапии эндогенных психозов [11]. В психиатрической клинике эффективное преодоление резистентности к экзогенному инсулину достигается применением пирогенала [10] и обзидана [11]. В представленной работе изучена возможность применения этих медикаментов для лечения инсулинзависимого сахарного диабета в эксперименте.

Материалы и методы

В работе использованы половозрелые крысы-самцы Вистар массой тела 200–250 г. После предварительной 24-часовой депривации пищи (при сохраненном доступе к воде) у крыс моделировали инсулинзависимый сахарный диабет путем внутрибрюшинного введения аллоксана тригидрата ("Lachema", Чехия) в дозе 200 мг/кг [9]. Контрольные животные получали эквивалентную инъекцию 0,9% NaCl.

Через 72 ч после введения аллоксана проводили 3-дневный курс инъекций обзидана или пирогенала (контрольным крысам вместо фармпрепаратов вводили 0,9% NaCl). Обзидан (пропранолола гидрохлорид; "Arzneimittelwerk Dresden GmbH", Германия) вводили подкожно в разовой дозе 1 мг/кг. Пирогенал (липополисахарид из бактерий *Salmonella typhi* производства НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи) вводили в мышцы бедра в разовой дозе 6,75 мкг/кг. В отдельной серии экспериментов оценивали диабетомодулирующие эффекты сочетанного введения обзидана и пирогенала.

Через 4 дня после окончания курса инъекций обзидана и (или) пирогенала (на 11-й день после

введения аллоксана) животных забивали. В полученной крови изучали содержание глюкозы, молочной кислоты, свободных жирных кислот (СЖК), холестерина, триглицеридов, креатинина, а также активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), γ -глутамилтранспептидазы (ГТП) и креатинфосфокиназы (КФК).

Концентрации лактата и СЖК определяли колориметрическими методами в цельной крови [19] и ЭДТА-стабилизированной плазме [14] соответственно. Уровни холестерина, триглицеридов и креатинина так же, как активность АЛТ, ГТП и КФК, определяли в сыворотке крови на биохимическом анализаторе фирмы KONE (Финляндия). Показатели гликемии регистрировали анзиматически при помощи стандартных наборов реактивов ("Lachema", Чехия).

В почках животных изучали содержание молекулярных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) экстракционно-спектрофотометрическим методом [3]. В ткани скелетной мускулатуры (квадрицепс бедра) определяли общее содержание белка и гликогена с помощью микробиуретового [5] и нефелометрического [17] методов соответственно.

В отдельной серии экспериментов исследовали инсулинчувствительность (ИЧ) у животных с аллоксановым диабетом без фармакологической коррекции, а также на фоне введения обзидана или пирогенала. Изучение ИЧ проводили через 72 ч (на 4-й день) после инъекции аллоксана на фоне предварительного голодания в течение суток. ИЧ оценивали по латентности развития комы после внутривенного введения экзогенного инсулина (хумулин Р; "Lilly", Франция) в дозе 40 ЕД/кг [4]. В данной серии экспериментов обзидан вводили однократно в дозе 1 мг/кг непосредственно перед инъекцией инсулина, а пирогенал — в дозе 6,75 мкг/кг за 12 ч до изучения ИЧ.

Результаты обработаны статистически. О достоверности различий судили по критерию Стьюдента (t), а также по 2 критериям непараметрической статистики: Вилкоксона—Манна—Уитни (U) и точному методу Фишера. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$. В качестве показателей связи между изучаемыми параметрами рассчитывали коэффициенты ранговой корреляции по Спирмену (r_s) и Кендалу (r_k).

Результаты и их обсуждение

Через 10 сут после инъекции аллоксана концентрация глюкозы в крови крыс превышала значения интактного контроля на 42 % (табл. 1), что значительно меньше прироста гликемии через 3

Влияние обзидана, пирогенала и их комбинации на проявления аллоксанового диабета ($M \pm m$)

Показатель	Интактный контроль ($n = 9$)	Аллоксановый диабет ($n = 9$)	Фармакологические воздействия		
			обзидан ($n = 10$)	пирогенал ($n = 8$)	обзидан + пирогенал ($n = 9$)
Гликемия, мМ/л	$5,81 \pm 0,46$	$8,25 \pm 0,71^*$	$6,61 \pm 0,46^{**}$	$10,55 \pm 1,5$	$7,58 \pm 1,03^{**}$
Лактаемия, мМ/л	$3,64 \pm 0,48$	$4,51 \pm 0,67$	$5,83 \pm 0,67^{**}$	$5,57 \pm 0,44^{**}$	$5,11 \pm 0,48$
Креатининемия, мкм/л	$83,0 \pm 5,32$	$106,0 \pm 9,8^*$	$94,3 \pm 4,61^{**}$	$108,1 \pm 9,1$	$105,7 \pm 8,2$
Холестеринемия, мМ/л	$1,69 \pm 0,13$	$1,94 \pm 0,25^*$	$2,07 \pm 0,20$	$1,89 \pm 0,20$	$2,14 \pm 0,21$
Триглицеридемия, мМ/л	$1,30 \pm 0,16$	$1,34 \pm 0,27$	$1,56 \pm 0,17$	$1,55 \pm 0,26$	$1,54 \pm 0,20$
СЖК, мэкв/л	$0,46 \pm 0,05$	$0,458 \pm 0,1$	$0,38 \pm 0,04^{**}$	$0,50 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,07$
АЛТ, ед/л	$67,3 \pm 10,1$	$80,0 \pm 21,7$	$68,0 \pm 13,9$	$73,7 \pm 24,2$	$85,7 \pm 29,5$
ГТП, ед/л	$1,78 \pm 0,78$	$2,63 \pm 0,71$	$3,36 \pm 0,75$	$3,00 \pm 0,76$	$3,60 \pm 1,19$
КФК, ед/л	1533 ± 156	1312 ± 183	$1747 \pm 113^{**}$	1498 ± 224	1363 ± 121
Первичные продукты ПОЛ в почках, усл. ед.	$1,05 \pm 0,15$	$9,18 \pm 7,5$	$1,93 \pm 0,92$	$1,30 \pm 0,31$	$1,14 \pm 0,18$
Вторичные продукты ПОЛ в почках, усл. ед.	$0,148 \pm 0,01$	$1,18 \pm 0,91^*$	$0,74 \pm 0,54$	$0,21 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,06$

Примечание. Звездочки — достоверность различий: одна — между группами “интактный контроль” и “аллоксановый диабет”, две — между группами “аллоксановый диабет” и “аллоксановый диабет на фоне применения фармпрепаратов”. Достоверность различий оценивали при помощи t - и U -критериев, а также точного метода Фишера. Содержание гептанэкстрагируемых продуктов ПОЛ выражено в условных единицах индекса окисления, который рассчитывали как отношение оптических плотностей E_{232}/E_{220} для первичных молекулярных продуктов липопероксидации (диеновых конъюгатов) и как E_{278}/E_{220} для вторичных молекулярных продуктов ПОЛ (кетодиенов и сопряженных триенов).

дня после индукции диабета [5]. У крыс, получавших аллоксан за 10 дней до забоя, уровень циркулирующих триглицеридов не отличался от контроля (см. табл. 1), в то время как через 72 ч после введения аллоксана их уровень возрастал более чем в 5 раз по сравнению с таковым у интактных крыс [5]. Показатели ферментемии также оставались неизменными к изучаемому сроку, хотя на 4-й день аллоксанового диабета сывороточная активность АЛТ и ГТП возрастала более чем вдвое [5]. Таким образом, правомерно констатировать компенсацию острых метаболических расстройств и энзимологических признаков повреждения печени к 11-м суткам с момента индукции диабета. О компенсации метаболических сдвигов в поздние сроки экспериментального диабета свидетельствует также увеличение содержания гликогена в мышцах с $322,41 \pm 47,78$ мг/100 г в контроле ($n = 9$) до $364,20 \pm 34,77$ мг/100 г через 10 дней после введения аллоксана ($n = 9$; $p < 0,05$). Стоит добавить, что в другой серии экспериментов через 3 сут с момента инъекции аллоксана уровень гликогена в скелетной мускулатуре оказался сниженным со $188,0 \pm 15,11$ мг/100 г в контроле ($n = 9$) до $134,60 \pm 25,62$ мг/100 г ($n = 9$; $p < 0,05$). Ни одно из исследованных фармакологических воздействий не оказывало влияния на содержание гликогена в мышцах крыс больных диабетом (данные не представлены).

В основе описанной компенсации, по-видимому, лежит характерная для аллоксанового диабета регенерация панкреатических β -клеток, протекающая с образованием *de novo* островков, содержащих исключительно β -эндокриноциты [12]. Не исключено также, что относительная нормализация изученных показателей связана с гибелью наиболее чувствительных к аллоксану животных (в период с 4-х по 11-е сутки погибли 4 (30,77%) из 13 крыс с экспериментальным диабетом). Вследствие этого среди выживших к изучаемому сроку крыс могут преобладать особи, резистент-

ные к диабетогенному действию аллоксана. Ни одно из исследованных фармакологических воздействий не оказывало значимого влияния на летальность больных диабетом крыс (данные не представлены).

Несмотря на вышеописанное смягчение проявлений диабета, к 11-м суткам с момента введения аллоксана у крыс развивалась отчетливая гиперхолестеринемия (см. табл. 1). Важно заметить, что через 3 дня после введения аллоксана в связи с повреждением печени и нарушением ее холестеринсинтезирующей функции концентрация циркулирующего холестерина уменьшалась на 44 % [5]. По-видимому, уже обсуждавшаяся компенсация аллоксаниндуцированного повреждения печени может иметь отношение к феномену поздней гиперхолестеринемии у крыс с экспериментальным диабетом.

Как известно, гиперхолестеринемия и сопутствующая гипергликемия являются факторами, способствующими развитию ангиопатий при диабете [2]. Вероятно, диабетическая микроангиопатия и обусловленное ею нарушение микроциркуляции являются причиной 8-кратного прироста содержания перекисленных липидов в почках крыс, получавших аллоксан (см. табл. 1). Значимость данного феномена иллюстрируется параллельным приростом циркулирующего креатинина почти на 1/3 от контрольного уровня (см. табл. 1). При этом была выявлена прямая корреляция между содержанием гептанрастворимых диеновых конъюгатов в ткани почек и концентрацией креатинина в крови ($r_s = 0,893$; $n = 7$; $p < 0,05$). Эти факты позволяют констатировать развитие диабетической нефропатии и нарушение фильтрационной функции почек на 11-е сутки после введения аллоксана. Причастность гиперхолестеринемии к нарушению функции почек при экспериментальном диабете иллюстрируется прямой корреляцией между содержанием в крови холестерина и креатинина ($r_s = 0,898$; $n = 8$; $p < 0,02$).

Таблица 2

Влияние обзидана и пирогенала на инсулинчувствительность крыс через 72 ч после введения аллоксана

Показатель	Аллоксановый диабет	Введение обзидана на фоне аллоксанового диабета	Введение пирогенала на фоне аллоксанового диабета
Число крыс, впавших в кому в течение 240 мин после введения инсулина	1	4	0
Число крыс, не впавших в кому в течение 240 мин после введения инсулина	11	1	7
Доля инсулинрезистентных крыс, % от численности животных в группе	91,67	20*	100

Примечание. Достоверность различий оценивали при помощи точного метода Фишера. * — достоверные различия с группой "аллоксановый диабет".

Троекратное введение обзидана привело к статистически достоверному снижению содержания глюкозы и креатинина в крови животных с аллоксановым диабетом (см. табл. 1). Уровень продуктов ПОЛ в ткани почек также проявлял видимую тенденцию к снижению, которая, однако, не достигла статистической значимости из-за выраженного варьирования соответствующих показателей при диабете без медикаментозной коррекции. Основной причиной наблюдаемого смягчения диабетической нефропатии, по-видимому, следует считать уменьшение гипергликемии у крыс, получавших обзидан. О правомерности этого предположения свидетельствует прямая корреляция между уровнем гликемии и концентрацией циркулирующего креатинина ($r_s = 0,861$; $n = 10$; $p < 0,01$).

В основе диабеткорректирующего эффекта обзидана может лежать его инсулинсенсibiliзирующее действие в отношении резидальных количеств эндогенного гормона. Правомерность данного предположения иллюстрируется не только уменьшением гипергликемии, но и снижением концентрации циркулирующих СЖК (см. табл. 1), что можно расценить как проявление антилипидической активности инсулина [2].

С целью проверки справедливости приведенных рассуждений мы оценили латентность инсулиновой комы при аллоксановом диабете без медикаментозной коррекции и на фоне инъекции обзидана. Установлено, что через 72 ч после индукции диабета, на фоне максимально выраженной гипергликемии [5], латентность инсулиновой комы возрастает с $156,4 \pm 10,3$ мин в контроле ($n = 9$) до $244,7 \pm 9,4$ мин ($n = 3$; $p < 0,001$). У остальных 7 крыс, получавших аллоксан, не удалось добиться развития инсулиновой комы. Столь очевидное снижение ИЧ при аллоксановом диабете позволило нам в дальнейшем считать инсулинрезистентными тех животных, у которых инсулиновая кома не развивалась в течение 240 мин после введения экзогенного гормона (табл. 2). Как видно, однократная инъекция обзидана купировала вторичную инсулинрезистентность, причем средняя латентность комы в данной экспериментальной группе даже проявляла тенденцию к снижению относительно показателей интакт-

ного контроля ($109,8 \pm 24,6$ мин против $151,6 \pm 11,4$ мин в обоих случаях; $n = 5$; $p > 0,05$).

Наряду с несомненно позитивными эффектами обзидана при диабете нами были отмечены некоторые негативные последствия его действия. Так, в крови крыс, получивших курс инъекций обзидана, достоверно возросла концентрация молочной кислоты (см. табл. 1). Это может быть связано с "отменой" β -адренозависимой стимуляции ферментов тканевого дыхания [8], что увеличивает риск возникновения лактацидемической комы на фоне приема β -адреноблокаторов при диабете [2]. Кроме того, курсовое введение обзидана при экспериментальном диабете сопровождалось увеличением активности КФК в сыворотке крови (см. табл. 1). Стоит добавить, что в соответствующей группе животных наблюдалась отрицательная корреляция между содержанием белка в скелетной мускулатуре и активностью КФК сыворотки крови ($r_k = -1,0$; $n = 6$; $p < 0,01$). Отмеченные факты свидетельствуют о повреждении скелетной мускулатуры, причиной которого может являться нарушение баланса между вазодилаторными (β_2 -адренозависимыми) и вазоконстрикторными (α_1 -адренозависимыми) эффектами эндогенных катехоламинов [1], что ведет к уменьшению гемоперфузии в мышечной ткани и гипотрофии мышц при стрессе, сочетающемся с введением β -адреноблокаторов [13, 16]. Интересно заметить, что сочетание троекратного иммобилизационного стресса с инъекциями значительно меньшей дозы обзидана ($0,45$ мг/кг) не только оптимизировало диабетпрофилактическое действие троекратного иммобилизационного стресса [5], но и вызывало статистически значимое снижение содержания мышечного белка через 3 дня после индукции аллоксанового диабета. Так, в группе интактного контроля содержание мышечного белка составило $224,42 \pm 10,84$ мг/г ($n = 5$), у крыс получавших аллоксан (200 мг/кг) без предварительного стресса и на фоне предшествующей троекратной иммобилизации, уровень белка остался неизменным ($245,08 \pm 9,77$ и $233,81 \pm 6,09$ мг/г; $n = 7$ и $n = 8$ соответственно; $p > 0,05$), а у животных, получавших обзидан на фоне стресса с последующей инъекцией аллоксана, количество мышечного белка оказалось достоверно сниженным по сравнению с крысами, которым вводили только аллоксан ($194,5 \pm 8,99$ мг/г; $n = 8$; $p < 0,01$). Ни одно из испытанных фармакологических воздействий, так же как инъекция аллоксана, не влияло на содержание белка к 11-м суткам после индукции диабета (данные не представлены).

Ежедневное внутримышечное введение пирогенала в период с 4-х по 6-е сутки аллоксанового диабета не сопровождалось нормализацией изученных параметров (см. табл. 1). Более того, уровень гликемии проявлял тенденцию к дальнейшему нарастанию, а концентрация молочной кислоты достоверно увеличивалась в сравнении с таковой у животных, не получавших пирогенала. Отмеченные неблагоприятные эффекты пирогенала нивелировались при его совместном введении с обзиданом. Необходимо добавить, что однократная инъекция пирогенала в отличие от обзидана не устраняла инсулинрезистентность на 4-е сутки после индукции диабета (см. табл. 2).

Вполне возможно, что диабетотягощающие эффекты пирогенала при диабете связаны со способностью этого липополисахаридного препарата стимулировать систему мононуклеарных фагоцитов, активация которой сопряжена с секрецией интерлейкина-1 (ИЛ-1) и фактора некроза опухолей [18]. Как известно, высокие концентрации данных цитокинов оказывают повреждающее действие на панкреатические β -клетки [2, 18], что может усилить диабетогенные эффекты аллоксана. По-видимому, в данном конкретном случае аллоксанпотенцирующее действие упомянутых цитокинов превалирует над известной из литературы способностью низких концентраций ИЛ-1 усиливать секрецию инсулина [2, 18] и гипогликемизирующим эффектом ИЛ-1 при аллоксановом диабете [7]. С другой стороны, фактор некроза опухолей, будучи известным медиатором шока [6], может приводить к соответствующим нарушениям гемодинамики, что в свою очередь ведет к развитию лактатацидоза А-типа [2]. Вполне вероятно, что подобный механизм ведет к простому концентрации молочной кислоты в крови животных, получавших пирогенал на фоне аллоксанового диабета.

Изученные фармакологические препараты и их комбинация не оказали статистически значимого влияния на выраженность гиперхолестеринемии, содержание циркулирующих триглицеридов и активность маркерных ферментов повреждения печени к 11-м суткам после введения аллоксана (см. табл. 1).

Выводы

1. Троекратное введение обзидана в дозе 1 мг/кг в период с 4-х по 6-е сутки после индукции аллоксанового диабета способствует уменьшению гипергликемии и гиперкреатининемии. Однократное введение обзидана в той же дозе через 72 ч после инъекции аллоксана купирует вторичную инсулинрезистентность.

2. Повторная инъекция обзидана на фоне аллоксанового диабета вызывает повреждение скелетной мускулатуры, проявляющееся увеличением сывороточной активности КФК, которая отрицательно коррелирует с общим содержанием мышечного белка. Инъекции обзидана на фоне стресса, предшествующего введению аллоксана, вызывают снижение общего содержания белка в скелетных мышцах крыс.

3. Повторное введение обзидана при экспериментальном сахарном диабете вызывает увеличение содержания молочной кислоты в крови.

4. Троекратное введение пирогенала в дозе 6,75 мкг/кг в период с 4-х по 6-е сутки после индукции аллоксанового диабета увеличивает концентрацию молочной кислоты в крови. Однократное введение пирогенала к той же дозе через 3 сут по-

сле инъекции аллоксана не влияет на выраженность вторичной инсулинрезистентности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян О. М. Симпато-адреналовая система. — Л., 1977.
2. Балаболкин М. И. Сахарный диабет. — М., 1994.
3. Волчегорский И. А., Налымов А. Г., Яровинский Б. Г., Лифшиц Р. И. // *Вопр. мед. химии*. — 1989. — № 1. — С. 127—131.
4. Волчегорский И. А., Костин Ю. К., Скобелева Н. А., Лифшиц Р. И. // *Пробл. эндокринологии*. — 1993. — № 4. — С. 36—40.
5. Волчегорский И. А., Цейликман В. Э., Колесников О. Л. и др. // *Там же*. — 1995. — № 6. — С. 38—42.
6. Макарова Н. П., Коничева И. Н. // *Анест. и реаниматол.* — 1995. — № 6. — С. 4—8.
7. Михайлова А. А. // *Иммунология*. — 1992. — № 4. — С. 4—8.
8. Плотицков Н. Ю. Значение катехоламинов и адренорецепторов для терморегуляторных реакций при остром охлаждении и устойчивости к холоду: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Челябинск, 1984.
9. Саркисов Д. С., Ремезов П. И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. — М., 1960.
10. Способ лечения эндогенных психозов / Авруцкий Г. Я., Недува А. А., Малин Д. И. А. с. 1736499 РФ. 1992.
11. Способ повышения инсулиночувствительности у психических больных в процессе инсулинокоматозной терапии / Костин Ю. К., Григорьевских В. С., Волчегорский И. А. и др. — Челябинск, 1993.
12. Экспериментальный сахарный диабет / Баранов В. Г., Коловерова И. М., Гаспарян Э. Г. и др. — Л., 1983.
13. Chance W., von Allmen D., Benson D. et al. // *J. Trauma*. — 1991. — Vol. 31. — P. 365—370.
14. Duncombe W. G. // *Clin. chim. Acta*. — 1964. — Vol. 9. — P. 122—125.
15. Goa J. // *Scand. J. clin. Lab. Invest.* — 1953. — Vol. 5. — P. 218—222.
16. Gore D., Honeycutt D., Jahoor F. et al. // *Ann. Surg.* — 1991. — Vol. 213. — P. 568—574.
17. Hansen R. G., Rutter W. J., Craine E. M. // *J. biol. Chem.* — 1952. — Vol. 195. — P. 127—132.
18. Ohno Y., Aoki N., Nishimura A. // *J. clin. Endocrinol. Metab.* — 1993. — Vol. 77. — P. 1072—1077.
19. Strom G. // *Acta physiol. scand.* — 1949. — Vol. 17. — P. 440—451.
20. Vialelles B., Silvestre P. // *Horm. Res.* — 1992. — Vol. 38. — P. 51—56.

Поступила 12.05.96

I. A. Volchegorsky, O. L. Kolesnikov, V. E. Tselikman, A. A. Kolesnikova, A. Yu. Vladimirov — EFFECTS OF OBSIDAN (PROPRANOLOL) AND PYROGENAL ON THE MANIFESTATION OF ALLOXAN-INDUCED DIABETES IN RATS

Summary. The effects of propranolol (obsidan) and pyrogenal on the course of experimental diabetes mellitus were studied. Both drugs are known as potent correctors of insulin resistance in psychiatry. Nonselective β -adrenoblocker propranolol attenuated the symptoms of alloxan diabetes in rats, which manifested in a decrease of hyperglycemia, concentrations of free fatty acids and creatinine in the blood, and in correction of secondary insulin resistance. Side effects of propranolol were as follows: increase of blood lactate level and injury to the skeletal muscles associated with a decrease of total protein content in muscle tissue paralleled by increase in the activity of blood serum creatine phosphokinase. Repeated injections of pyrogenal to rats with alloxan diabetes brought about a trend to an increase of glucose level in the blood and led to hyperlactatemia.