

П. К. Телушкин¹, А. Д. Ноздрачев², П. П. Потапов¹, Н. Б. Медведева¹**ПОКАЗАТЕЛИ МЕТАБОЛИЗМА У КРЫС ПРИ МНОГОКРАТНОЙ ИНСУЛИНОВОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ**¹Кафедра биологической и биоорганической химии (зав. — проф. П. П. Потапов) Ярославской государственной медицинской академии, ²кафедра общей физиологии (зав. — акад. РАН А. Д. Ноздрачев) Санкт-Петербургского государственного университета

У крыс вызывали гипогликемическую кому путем введения 40 ЕД инсулина на 1 кг массы тела. У животных, перенесших 7 гипогликемических ком с интервалом 2 сут и забитых во время последней из серии ком, обнаружено увеличение содержания свободных жирных кислот, мочевины и мочевой кислоты в сыворотке крови; уровень гликогена в печени оставался нормальным. В печени увеличилась активность аспаратаминотрансферазы (КФ 2.6.1.1), аланинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.2), глутаминазы (КФ 3.5.1.2), глутаматдегидрогеназы (КФ 1.4.1.3), сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.99.1) и лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27), повысилась скорость образования лактата при использовании в качестве субстратов глюкозы и гликогена. Подобные изменения отсутствовали у первоначально здоровых животных в состоянии первой гипогликемической комы. Они свидетельствуют об увеличении катаболизма аминокислот и активации глюконеогенеза у крыс, неоднократно перенесших инсулиновую гипогликемию, и связаны со стимуляцией контринсулярного аппарата при гипогликемии.

Ключевые слова: гипогликемия, печень, азотистый обмен, окислительные ферменты, гликолиз.

Hypoglycemic coma was induced with 40 U of insulin per kg body weight. The animals experiencing 7 hypoglycemic comas at 2-day intervals and killed during the last coma were found to have elevated serum levels of free fatty acids, urea, and uric acid; hepatic glycogen levels remained normal. In the liver, the activities of aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1), alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2), glutaminase (EC 3.5.1.2), glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.3), succinate dehydrogenase (EC 1.3.99.1), and lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27) were enhanced and the rate of lactate generation increased when glucose and glycogen were used as substrates. Such changes were absent in initially healthy animals during the first hypoglycemic coma. They are indicative of increases in the catabolism of amino acids and in the activation of gluconeogenesis in the rats experiencing insulin hypoglycemia many times and they are associated with the stimulation of the contrainsular apparatus in hypoglycemia.

Key words: hypoglycemia, liver, nitrogen metabolism, oxidative enzymes, glycolysis.

В ходе инсулинотерапии сахарного диабета [1, 11], а также у пациентов с заболеваниями печени, почек и желудочно-кишечного тракта часто наблюдаются возобновляющиеся гипогликемические состояния. На протяжении многих лет проводилось изучение метаболизма в нервной ткани при гипогликемии [5]. Большое внимание было уделено также оценке гормонального статуса при гипогликемии [9, 16]. Однако исследования изменений уровня различных гормонов не дают ответа на вопрос о том, к каким собственным нарушениям общего метаболизма приводит неоднократно перенесенная гипогликемия. Метаболический стресс, связанный с предшествующими эпизодами гипогликемии, может создавать неблагоприятный метаболический фон для протекания последующих гипогликемических состояний. В настоящей работе проведено изучение показателей обмена у крыс при одно- и многократном введении высоких доз инсулина.

Материалы и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. Животных содержали на стандартном пищевом рационе и перед каждым опытом лишали пищи в течение 18–24 ч. Животные были разделены на 5 групп: 1-я группа — интактные крысы (контроль); 2-я группа — крысы, находящиеся в состоянии гипогликемической комы (ГГК); 3-я группа — животные, обследованные через 48 ч после купирования ГГК; 4-я группа — крысы, перенесшие 7 ГГК с 2-дневным интервалом и забитые во время последней из серии ком; 5-я

группа — крысы, перенесшие 7 ГГК и забитые через 48 ч после купирования последней комы. ГГК (утрата постуральных рефлексов, содержание глюкозы в крови около 1–2 ммоль/л) вызывали внутримышечной инъекцией инсулина в дозе 40 ЕД на 1 кг массы тела, купирование осуществляли путем введения коматозным животным 3 мл 40% раствора глюкозы в желудок. После купирования комы крысы находились в условиях свободного доступа к пище в течение 1 сут, воду получали без ограничения во всех условиях эксперимента.

В сыворотке крови определяли концентрации глюкозы, свободных жирных кислот (СЖК), мочевины и мочевой кислоты [2], кетоновых тел [7]. В печени определяли содержание гликогена [3].

Интенсивность гликолиза и гликогенолиза исследовали по скорости накопления лактата в инкубационной среде, используя в качестве субстратов глюкозу, глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) и гликоген [4]. Активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ, КФ 1.4.1.3), сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1), лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27), аспаратаминотрансферазы (АСТ, КФ 2.6.1.1) и аланинаминотрансферазы (АЛТ, КФ 2.6.1.2) определяли спектрофотометрически [3]. Глутаминазную активность (ГЛТ, КФ 3.5.1.2) и аденозинмонофосфатаминазную активность (АМФ-Д, КФ 3.5.4.6) оценивали по накоплению аммиака [6]. Активность ГДГ, СДГ, ГЛТ и АМФ-Д определяли в 10% гомогенате печени; интенсивность накопления лактата и активность ЛДГ — в супернатанте, полученном после центрифугирования гомогената при 14 000 g в течение 15 мин. Количество белка определяли по

Таблица 1

Содержание энергетических субстратов, конечных продуктов азотистого обмена в крови и гликогена в печени крыс при гиперинсулинизации

Показатель	Группа животных				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
Глюкоза, ммоль/л	5,37 ± 0,12	1,36 ± 0,14***	5,63 ± 0,17	1,76 ± 0,23***	5,47 ± 0,15
СЖК, мкмоль/л	409 ± 15	235 ± 34***	125 ± 11***	501 ± 13***	245 ± 16***
Кетоновые тела, мг/л	34,8 ± 1,6	18,6 ± 2,3***	13,1 ± 2,0***	36,9 ± 2,5	25,7 ± 1,0***
Мочевина, ммоль/л	4,6 ± 0,8	2,3 ± 0,2**	2,9 ± 0,3*	7,5 ± 0,4***	4,4 ± 0,7
Мочевая кислота, мкмоль/л	210 ± 4	168 ± 3***	245 ± 5***	244 ± 14*	250 ± 10**
Гликоген печени, мг/г	2,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2**	4,9 ± 0,3***	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,2

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 значения представлены в виде $M \pm m$ (выборочная средняя $\pm$ ошибка средней); каждая группа состояла из 6–8 животных. Здесь и в табл. 2 одна звездочка — $p < 0,05$, две — $p < 0,01$, три — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Лоури. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением критерия t Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Уровень гликемии у крыс в состоянии первой и последней ГГК был практически одинаковым (табл. 1). Содержание СЖК и кетоновых тел в сыворотке крови у крыс 2-й группы было снижено соответственно на 43% ($p < 0,001$) и 47% ($p < 0,001$). Через 48 ч после купирования однократной ГГК эти показатели были в 3 раза ниже уровня контроля. У крыс 4-й группы концентрация СЖК в сыворотке крови увеличилась (+22%, $p < 0,001$), а уровень кетоновых тел не отличался от нормы. Через 48 ч после купирования последней из серии ком количество СЖК и кетоновых тел в сыворотке уменьшилось соответственно на 40% ($p < 0,001$) и 26% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем. Содержание мочевины в сыворотке крови в состоянии первой ГГК и через 48 ч после купирования уменьшилось соответственно на 50% ($p < 0,01$) и 37% ($p < 0,05$). У крыс, перенесших серию ГГК, в состоянии последней комы уровень мочевины был значительно повышенным (на 63%, $p < 0,001$). Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови уменьшилась на 20% ($p < 0,001$) у животных в

состоянии первой ГГК и увеличилась на 17% ($p < 0,001$) через 48 ч после купирования комы. У животных 4-й группы показатель был повышенным на 16% ($p < 0,05$) по сравнению с нормой и оставался высоким через 48 ч после купирования последней комы. Содержание гликогена в печени крыс в состоянии первой ГГК было сниженным на 33% ($p < 0,01$), а через 48 ч после купирования комы увеличилось на 90% ($p < 0,001$) по сравнению с контролем.

Изменений активности ЛДГ, СДГ и ГДГ в печени животных 2, 3 и 5-й экспериментальных групп не выявлено (табл. 2). У крыс, перенесших серию ком, в состоянии последней комы активность ЛДГ, СДГ и ГДГ была увеличенной соответственно на 22% ($p < 0,01$), 48% ($p < 0,01$) и 24% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем. Активность АСТ и АЛТ (см. табл. 2) у крыс, находившихся в состоянии первой ГГК и через 48 ч после ее купирования глюкозой, не изменялась. У животных 4-й экспериментальной группы активность АСТ и АЛТ увеличилась соответственно на 14% ($p < 0,001$) и 15% ($p < 0,001$), изменения сохранялись через 2 сут после купирования последней комы. Активность ГЛТ у крыс в состоянии первой ГГК была близка к норме, а через 48 ч после купирования комы снизилась на 51% ($p < 0,001$). У крыс 4-й группы этот показатель увеличился на 19% ($p < 0,05$), а через 48 ч после купирования последней комы его повышение было еще более выраженным и составило

Таблица 2

Активность ферментов в печени крыс при гиперинсулинизации

Показатель	Группа животных				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
АСТ	5,9 ± 0,1	5,6 ± 0,3	6,2 ± 0,2	6,8 ± 0,1***	7,2 ± 0,2***
АЛТ	8,4 ± 0,2	8,8 ± 0,3	8,1 ± 0,2	9,7 ± 0,1***	9,3 ± 0,3*
ГЛТ	171 ± 13	179 ± 6	84 ± 12***	203 ± 6*	240 ± 15**
АМФ-Д	37,8 ± 1,8	36,1 ± 1,8	37,2 ± 5,2	35,5 ± 3,3	25,5 ± 2,2**
ЛДГ	573 ± 44	582 ± 50	644 ± 29	698 ± 18*	587 ± 32
СДГ	1,47 ± 0,06	1,51 ± 0,08	1,38 ± 0,21	2,17 ± 0,29*	1,76 ± 0,18
ГДГ	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,04	0,50 ± 0,03	0,66 ± 0,05*	0,49 ± 0,04

Примечание. Активность АСТ и АЛТ выражена в микромолях за 1 ч на 1 мг белка, активность ГЛТ и АМФ-Д — в наномолях за 1 ч на 1 мг белка, активность ЛДГ — в наномолях за 1 мин на 1 мг белка, активность СДГ и ГДГ — в микромолях за 1 мин на 1 г ткани.

Таблица 3

Интенсивность накопления лактата (в нмоль за 1 мин на 1 мг белка) в печени крыс при гиперинсулинизации

Субстрат	Группа животных				
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я
Глюкоза	12,7 ± 1,2	12,3 ± 1,1	12,1 ± 1,4	19,0 ± 0,8*	14,2 ± 1,4
Г-6-Ф	23,2 ± 1,4	21,2 ± 1,8	24,6 ± 1,7	25,4 ± 2,0	27,8 ± 1,3
Гликоген	17,3 ± 1,0	11,6 ± 1,1*	18,1 ± 0,9	26,6 ± 0,6**	16,8 ± 2,1

Примечание. Одна звездочка — $p < 0,01$, две — $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

40% ($p < 0,01$). Активность АМФ-Д была близкой к норме у животных 2, 3 и 4-й групп, а через 48 ч после купирования последней комы она снизилась на 33% ($p < 0,01$).

Интенсивность гликолиза у крыс (табл. 3) в состоянии первой ГГК при использовании в качестве субстратов глюкозы и Г-6-Ф не отличалась от уровня контроля, интенсивность гликогенолиза была снижена на 33% ($p < 0,01$). У животных 4-й группы (седьмая ГГК) не выявлено изменений скорости накопления лактата при использовании в качестве субстрата Г-6-Ф, интенсивность накопления лактата при использовании глюкозы и гликогена увеличилась соответственно на 50% ($p < 0,01$) и 54% ($p < 0,001$). У крыс 3-й и 5-й экспериментальных групп изменений не обнаружено.

У экспериментальных животных в состоянии первой ГГК снижение концентрации СЖК в крови было обусловлено ингибированием липолиза, а уменьшение содержания кетоновых тел — снижением уровня исходных субстратов для их синтеза и торможением кетогенеза под действием инсулина [21]. С эффектами инсулина связаны и выявленные у этих животных изменения азотистого обмена [10], а также уменьшение интенсивности гликогенолиза [14]. Вместе с тем количество гликогена в печени уменьшилось. Иными словами, гипогликемия даже на фоне гиперинсулинемии приводит к мобилизации гликогена, а стимулирующее влияние инсулина на процессы синтеза гликогена у голодавших животных из-за дефицита исходного субстрата не сопровождается накоплением полисахарида в печени.

Изменения азотистого обмена через 48 ч после купирования первой комы являются результатом анаболических эффектов инсулина [10] и отражают некоторое снижение распада белков в период респитуции после гипогликемии. Накопление гликогена в печени в период последствия также связано с влиянием инсулина на углеводный обмен на фоне высокого потребления пищи в течение первых суток после купирования комы, когда животные имели свободный доступ к пище. Таким образом, в состоянии первой ГГК и после ее купирования доминируют изменения, связанные с действием самого инсулина.

Изменения метаболизма у животных, перенесших серию ГГК и находившихся в состоянии комы (4-я группа), были весьма значительными и связаны, по-видимому, преимущественно с активацией контринсулярного аппарата, неизменно наблюдаемой при гипогликемии [9]. При этом в плазме кро-

ви увеличиваются уровни глюкагона, катехоламинов и гормона роста, нарастает секреция адренокортикотропина и кортикостероидов, а также вазопрессина и окситоцина [9]. Все перечисленные гормоны стимулируют липолиз в жировой ткани и кетогенез в печени, тогда как инсулин является ингибитором этих процессов [21]. Увеличение уровня СЖК и неизменный уровень кетоновых тел у крыс 4-й группы являются, таким образом, результатом активации контринсулярного аппарата.

Изменения показателей азотистого обмена у экспериментальных животных 4-й группы отражают активацию процессов катаболизма белков и стимуляцию глюконеогенеза из аминокислот. Основным контринсулярным гормоном является глюкагон, его катаболическое действие реализуется в печени [10]. Глюкагон увеличивает активность глутаминазы в гепатоцитах, повышает включение азота глутамин в мочевины, а также захват аминокислот печенью [18]. При этом экспрессия гена глутаминазы осуществляется параллельно с экспрессией генов ключевых ферментов глюконеогенеза и синтеза мочевины [22]. В ходе наших исследований обнаружено соответствие между активностью глутаминазы печени и уровнем мочевины в крови. Катаболическое действие глюкокортикоидов хорошо известно. Увеличение уровня кортизола в крови даже в физиологических пределах приводит к увеличению распада белков и использованию углеродных скелетов аминокислот в процессе глюконеогенеза [15]. Фактором, способствующим активации глюконеогенеза, является и повышение уровня СЖК, высокая концентрация которых в плазме необходима для осуществления глюконеогенеза и выхода глюкозы из печени [17, 20]. Следует подчеркнуть, что инсулин не препятствует активации глюконеогенеза в печени, особенно при высокой концентрации СЖК в крови [19, 20]. Гормон ингибирует преимущественно гликогенолиз, а не глюконеогенез в печени [8, 14]. Инсулиновая гипогликемия может приводить к активации глюконеогенеза [12].

Увеличение гликолиза в печени животных 4-й группы в отличие от животных 2-й группы может быть связано со стимуляцией инсулином экспрессии гена глюкокиназы, увеличением скорости фосфорилирования глюкозы и ее включения в пути обмена [13] при многократном воздействии высоких доз гормона. В то же время активация гликогенолиза не может быть отнесена к инсулиновым эффектам [20]. Следует также подчеркнуть, что изменения процесса *in vitro* не сопровождались сниже-

нием концентрации гликогена в печени у этих животных. Механизм таких изменений остается неясным. Можно предполагать, что увеличение скорости образования лактата *in vitro*, которое в данном случае свидетельствует в сущности о повышении активности фосфоорилазы [4], обусловлено превалированием действия контринсулярных гормонов (адреналина и глюкагона). Однако при изучаемом экспериментальном воздействии активация фермента не сопровождается реальным распадом гликогена *in vivo*, так как повышенный глюконеогенез обеспечивает поддержание достаточно высокой продукции фосфорных эфиров гексоз. Через 48 ч после купирования последней комы у крыс, перенесших серию ком (5-я группа), также проявилось некоторое увеличение интенсивности азотистого обмена. Признаки усиления катаболизма азотсодержащих соединений у этих животных представляются особенно явными в сравнении с животными, обследованными в период реституции после первой ГГК. По-видимому, усиление катаболизма белков при многократно повторяющейся инсулиновой гипогликемии является достаточно стойким. Стабильное усиление катаболизма аминокислот, интенсивное использование их для глюконеогенеза может в конечном счете нарушать субстратное обеспечение протеиносинтеза.

Выводы

1. Однократное введение высокой дозы инсулина вызывает метаболические изменения, связанные преимущественно с анаболическими эффектами гормона.

2. Серия повторяющихся гипогликемических состояний приводит к развитию выраженных неблагоприятных изменений обмена, увеличению распада белков и аминокислот и активации глюконеогенеза. Эти изменения обусловлены неоднократной стимуляцией контринсулярного аппарата.

3. Инсулиновая гипогликемия, неоднократно развивающаяся при сахарном диабете, является

фактором, усугубляющим нарушения обмена, характерные для данного заболевания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Сунцов Ю. И., Кудрякова С. В., Рыжкова С. Г. // Пробл. эндокринол. — 1995. — Т. 41, № 3. — С. 4—7.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1987.
3. Методы биохимических исследований: Липидный и энергетический обмен / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л., 1982.
4. Панин Л. Е., Третьякова Т. А., Русских Г. С., Войцеховская Е. Э. // Вопр. мед. химии. — 1982. — Т. 28, № 2. — С. 26—30.
5. Телушкин П. К., Ноздрачев А. Д. // Успехи физиол. наук. — 1999. — Т. 30, № 4. — С. 14—27.
6. Телушкин П. К., Ноздрачев А. Д., Потапов П. П. // Пробл. эндокринол. — 2001. — Т. 47, № 5. — С. 43—45.
7. Тодоров Й. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. — София, 1961.
8. Adkins A., Basu R., Persson M. et al. // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 2213—2220.
9. Amiel S. A. // Horm. Res. — 1996. — Vol. 45. — P. 285—290.
10. Charlton M., Nair K. S. // J. Nutr. — 1998. — Vol. 128. — P. 323—327.
11. Cryer P. E., Davis S. N., Shamoon H. // Diabetes Care. — 2003. — Vol. 26. — P. 1902—1912.
12. Edgerton D. S., Cardin S., Pan C. et al. // Diabetes. — 2002. — Vol. 51. — P. 3151—3162.
13. Ferre P., Foretz M., Azzout-Marniche D. et al. // Biochem. Soc. Trans. — 2001. — Vol. 29. — P. 547—552.
14. Gastaldelli A., Toschi E., Pettiti M. et al. // Diabetes. — 2001. — Vol. 50. — P. 1807—1812.
15. Horber F. F., Haymond M. W. // J. Clin. Invest. — 1990. — Vol. 86. — P. 265—272.
16. Inouye K., Shum K., Chan O. et al. // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 282. — P. 1369—1379.
17. Kohli C., Ravel D., Girard J., Pegorier J.-P. // Diabetes. — 2002. — Vol. 51. — P. 2363—2368.
18. Nissim I., Brosnan M., Yudkoff M. et al. // J. Biol. Chem. — 1999. — Vol. 274. — P. 28958—28965.
19. Roden M., Stingl H., Chandramouli V. et al. // Diabetes. — 2000. — Vol. 49. — P. 701—707.
20. Staehr P., Hother-Nielsen O., Landau B. R. et al. // Diabetes. — 2003. — Vol. 52. — P. 260—267.
21. Timothy G. R. // Endocrinol. Metab. Clin. N. Am. — 1996. — Vol. 25, N 4. — P. 847—867.
22. Watford M. // FASEB J. — 1993. — Vol. 7. — P. 1468—1474.

Поступила 26.12.05

◆ ОБЗОР

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2006

УДК 616.71-007.234:618.173]-08

Л. Я. Рожинская, Ж. Е. Белая, А. В. Беляева, Г. А. Мельниченко

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОГО ОСТЕОПОРОЗА: СТРОНЦИЯ РАНЕЛАТ ("БИВАЛОС")

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН и РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Скелет взрослого человека в репродуктивном периоде достаточно легок для активных передвижений и достаточно прочен, чтобы не допустить переломов. С возрастом, особенно после менопаузы, у женщин костная масса уменьшается и риск переломов увеличивается. С увеличением продол-

жительности жизни населения наблюдается увеличение частоты переломов бедра на 1—3% в год — наиболее серьезного, фатального последствия остеопороза [17]. Переломы позвонков, встречающиеся у каждой третьей женщины в возрасте 60—75 лет, приводят к острой и хронической боли в