

А. А. Ахрем, М. С. Воробьев, М. А. Кисель, И. С. Цыбовский, З. В. Заборовская, Е. А. Холодова

ГИПЕРИНСУЛИНЕМИЯ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ ПОСЛЕ ОРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ИНСУЛИНСОДЕРЖАЩИХ ОТРИЦАТЕЛЬНО ЗАРЯЖЕННЫХ ЛИПОСОМ

Лаборатория биоорганической химии (зав. — акад. АН Беларуси А. А. Ахрем) Института биоорганической химии АН Беларуси, кафедра эндокринологии (зав. — проф. Е. А. Холодова) Института усовершенствования врачей Минздрава Республики Беларусь, Минск

Лечение сахарного диабета путем подкожного введения инсулина имеет ряд недостатков, так как создает постоянный стрессовый фон у больных, не решает вопроса профилактики диабетических ангиопатий и не обеспечивает достаточных концентраций инсулина в печени. Наиболее физиологичным путем введения инсулина является пероральный способ, так как, всасываясь в кишечнике в кровь, гормон попадает в воротную систему печени. Однако белковая природа гормона делает такой способ введения трудноосуществимым из-за протеолиза инсулина в желудочно-кишечном тракте. В связи с этим были предприняты попытки защитить инсулин от воздействия протеаз желудка [1]. Одним из перспективных подходов к созданию пероральной лекарственной формы может быть включение гормона внутрь липидных везикул (липосом) [1, 2]. В ряде работ [3, 5, 8] было показано, что по способности захватывать инсулин и транспортировать его в кровяное русло наиболее эффективными являются липосомы, состоящие из отрицательно заряженных фосфолипидов.

В настоящей работе изучено влияние перорального введения инсулинсодержащих отрицательно заряженных липосом разного фосфолипидного состава на концентрацию глюкозы и иммунореактивного инсулина в крови крыс с аллоксаниндуцированным диабетом.

Материалы и методы

Для формирования отрицательно заряженных липосом использовали фосфатидилхолин (ФХ) из яичного желтка и фосфатидилинозит (ФИ) из пекарских дрожжей Харьковского предприятия бактериальных препаратов. Дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) синтезировали по методу, описанному в [6], дипальмитоилфосфатидилэтанола (ДПФЭ) получали из ДПФХ с помощью фосфолипазы D [11].

Инсулинсодержащие липосомы получали следующим образом. Хлороформные растворы смеси 33 мкмоль ДПФХ и 33 мкмоль ДПФЭ или смеси ФХ с ФИ в таком же количественном соотношении упаривали на ротаторном испарителе до постоянной массы колбы. К пленке липида добавляли 4 мг бычьего инсулина с удельной активностью 27 МЕ/мг в 2 мл 10 мМ трис-НСl буферного раствора рН 8,0, содержащего 1 мМ ЭДТА. Смесь встряхивали при 50°C до образования однородной дисперсии. Полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком в атмосфере инертного газа на дезинтеграторе УЗДН-2Т 3 раза по 1 мин с 2-минутными интервалами.

Полноту включения инсулина в липосомы проверяли с помощью гельпроникающей хроматографии. В колонку (18 × 350 мм), заполненную сефарозой 4В, вносили 0,75 мл липосом и промывали вышеуказанным буферным раствором со скоростью 0,9–1,0 мл/мин. В собранных фракциях объемом 1 мл определяли концентрацию белка и фосфолипидов по методикам, описанным в работах [7, 10].

Сахарный диабет у самцов крыс вызывали однократным введением аллоксана в дозе 150 мг на 1 кг массы тела. Жи-

вотных использовали в эксперименте через 2 нед после введения токсина по окончании острой фазы развития болезни.

За сутки до эксперимента крысы получали только воду. Инсулинсодержащие смеси вводили животным внутривенно с помощью специального зонда, а контрольным животным — только буферные растворы, на которых были приготовлены инсулинсодержащие смеси. Кровь у животных брали из хвостовой вены, с использованием раствора гепарина.

Содержание иммунореактивного инсулина в сыворотке или плазме крови измеряли с помощью набора реактивов для радиоиммунологического определения инсулина рно-ИНС-¹²⁵I-М, изготовленного на хозрасчетном опытно-производстве Института биоорганической химии АН Беларуси. Концентрацию глюкозы в крови определяли о-толуидиновым методом.

Результаты и их обсуждение

Для формирования инсулинсодержащих липосом в качестве липидного компонента нами выбраны эквимольные смеси природных ФХ и ФИ и синтетических ДПФХ и ДПФЭ. Липосомы из таких липидов имеют близкий по величине заряд гидрофильной поверхности, но различаются фазовым состоянием гидрофобного слоя. По данным гельпроникающей хроматографии на сефарозе 4В, оба типа липосом захватывают более 70% инсулина при исходном мольном соотношении липид/белок 100 : 1.

Биологическая активность полученных инсулинсодержащих липосом была проверена в серии опытов на крысах-самцах с аллоксановым диабетом. В экспериментальные группы (по 7–8 животных) были отобраны крысы с концентрацией сахара, превышающей 250 мг%. В эти группы не входили животные в острой фазе болезни, так как на фоне комплексного нарушения гомеостаза реакция организма на введение липосом может быть опосредована другими патогенными процессами, протекающими независимо от развития диабета.

Процедура взятия крови подвергает животных стрессу, на 1-й стадии ее могут возникать симптомы, внешне совпадающие с проявлением диабетического синдрома и искажающие конечную картину наблюдений. В связи с этим в экспериментах на здоровых животных и на животных с аллоксановым диабетом было изучено влияние процедуры взятия крови на содержание глюкозы и инсулина в крови. Как следует из полученных данных (рис. 1), при стрессовом состоянии в крови крыс на 15–20% повышается количество иммунореактивного инсулина при одновременном снижении концентрации глюкозы. Следует отметить, что реакция больных и здоровых крыс в количественном отношении была одинаковой.

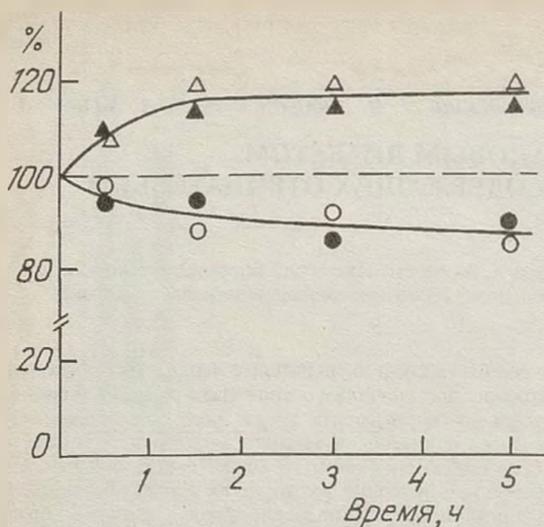


Рис. 1. Количественные изменения уровня иммунореактивного инсулина и глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом и здоровых крыс, вызванные процедурой взятия крови из хвостовой вены.

Треугольники — инсулин у здоровых крыс (светлые) и у крыс с аллоксановым диабетом (темные); кружки — глюкоза у здоровых крыс (светлые) и у крыс с аллоксановым диабетом (темные). Здесь и на рис. 2 значения в точках на графике являются средним арифметическим показателей крови животных для каждой экспериментальной группы. В каждой группе по 7-8 животных.

На рис. 2, а представлены данные иммунохимического определения концентрации инсулина в крови животных с аллоксановым диабетом после перорального введения инсулинсодержащих липосом из эквимольных смесей ДПФХ/ДПФЭ и ФХ/ФИ. Введение как одних, так и других липосомальных препаратов уже через 30 мин увеличивает концентрацию иммунореактивного инсулина по сравнению с контролем. Разница в концентрации инсулина в крови животных из опытной и контрольной групп существенно выше прироста, вызванного стрессом, и достигает более 100 % через 1,5 ч после введения липосом. Введение пустых липосом или их механической смеси с раствором инсулина не приводит к каким-либо изменениям уровня инсулина или глюкозы в крови крыс с аллоксановым диабетом.

Увеличение концентрации инсулина, вызванное липосомами из смеси ДПФХ и ДПФЭ, хорошо совпадает с изменением концентрации

глюкозы в крови: уровень сахара снижается до 140 мг% от исходных 270 мг% (рис. 2, б). В то же время аналогичная обработка животных липосомами из ФХ и ФИ не только снижала уровень глюкозы, но в большинстве случаев повышала его. Кроме того, наблюдалась индивидуальная реакция животных в отношении фосфатидилинозитсодержащих липосом. Такое действие липосом на основе ФХ и ФИ мы объясняем тем, что липидный бислой, сформированный из природных фосфолипидов, слабо защищает гормон от протеолиза в желудочно-кишечном тракте. Образующиеся в процессе протеолиза иммунореактивные, но не обладающие гормональными свойствами фрагменты инсулина вместе с липидами всасываются в кровь и вносят вклад в концентрацию инсулина, определяемую в сыворотке с помощью иммунохимического анализа. Часть неактивных фрагментов гормона, по-видимому, сохраняет способность связываться с рецепторами. Так как количество иммунореактивных фрагментов инсулина в крови в первые 3 ч после введения липосом из ФХ и ФИ непрерывно растет и достигает трехкратного уровня относительно эндогенного гормона, происходит конкурентное замещение последнего на рецепторах. Как следствие такого замещения мы наблюдаем рост концентрации глюкозы, уровень которого зависит от количества проникших в кровяное русло неактивных фрагментов гормона и степени их сродства к рецепторам инсулина. Основываясь на предложенной гипотезе и экспериментальных данных, можно заключить, что липидная оболочка из ДПФХ и ДПФЭ более надежно защищает инсулин от разрушения в желудочно-кишечном тракте и способствует проникновению гормона в кровоток в неизменном виде. Это заключение хорошо согласуется с данными работ [4, 9], в которых показано, что дипальмитоилфосфатидилолиновые липосомы по сравнению с липосомами из природных фосфолипидов более устойчивы к действию детергентов и фосфолипаз пищеварительной системы.

Выводы

1. Пероральное введение крысам инсулинсодержащих отрицательно заряженных липосом из природных или полусинтетических фосфолипи-

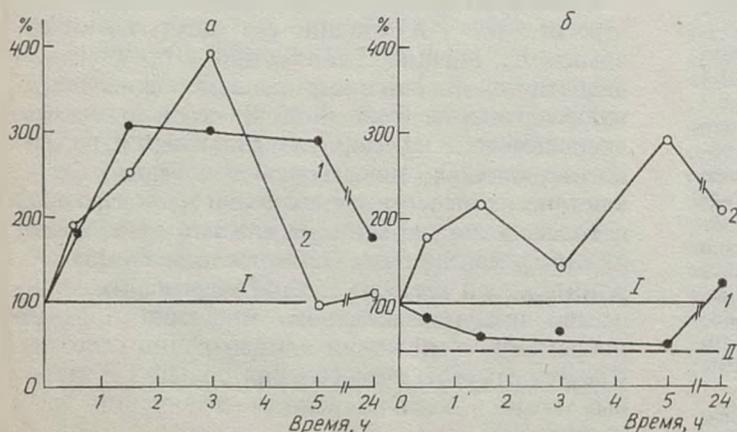


Рис. 2. Изменение концентрации иммунореактивного инсулина (а) и глюкозы (б) во времени после перорального введения инсулинсодержащих липосом:

I — ДПФХ/ДПФЭ липосомы; 2 — ФХ/ФИ липосомы; I — уровень иммунореактивного инсулина (а) и глюкозы (б, 270 мг%) у крыс с аллоксановым диабетом, II — уровень глюкозы (б, 115 мг%) у здоровых крыс.

дов приводит к увеличению содержания в крови иммунохимически определяемого инсулина.

2. Пероральное введение инсулинсодержащих липосом, состоящих из эквимольной смеси дипальмитоилфосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилэтанола, в отличие от липосом из природных фосфатидилхолина и фосфатидилинозита вызывает снижение концентрации глюкозы в крови крыс с аллоксаниндуцированным диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гребенчиков Ю. Б., Мошковский Ю. Ш. // Итоги науки и техники. Сер. Биоорганическая химия. — М., 1986. — Т. 7. — С. 255-291.
2. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Грегориадиса, А. Аллисона. — М., 1983.
3. Axi J., Sarrach D., Zipper J. // Pharmazie. — 1983. — Bd 38. — S. 246-248.
4. Dapergolas G., Gregoriadis G. // Lancet. — 1976. — Vol. 2. — P. 824-827.
5. Dapergolas G., Neerunjun E. D., Gregoriadis G. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 63. — P. 235-239.
6. Gupta C. M., Radhakrishnan R., Khorana H. G. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — Vol. 74. — P. 4315-4319.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.

8. Patel H. M., Ryman B. E. // FEBS Lett. — 1976. — Vol. 62. — P. 60-63.
9. Richards M. H., Gardner C. E. // Biochim. biophys. Acta. — 1978. — Vol. 543. — P. 508-522.
10. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. // J. Chromatogr. — 1975. — Vol. 114. — P. 129-141.
11. Yang S. F., Freer S., Benson A. A. // J. biol. Chem. — 1967. — Vol. 242. — P. 477-484.

Поступила 20.06.94

A. A. Akhrem, M. S. Vorobyov, M. A. Kisel, I. S. Tsybovsky, Z. V. Zaborovskaya, Ye. A. Kholodova — HYPERINSULINEMIA IN RATS WITH ALLOXAN DIABETES AFTER ORAL ADMINISTRATION OF INSULIN-CONTAINING NEGATIVELY CHARGED LIPOSOMES

S u m m a r y. The effect of oral administration of insulin-containing negatively charged liposomes on the immunoreactive insulin level and glucose concentration in the blood of rats with alloxan diabetes was studied. Liposomes were formed from equimolar mixtures of either natural phosphatidylcholine and phosphatidylinositol or semisynthetic dipalmitoyl phosphatidylcholine and dipalmitoyl phosphatidylethanol. More than 70% of insulin was encapsulated in liposomes at initial molar lipid to insulin ratio 100:1. Oral administration of both liposomal species results in hyperinsulinemia. Hyperinsulinemia induced by liposomes from semisynthetic phospholipids is attended by a decrease of blood glucose concentration. No correlation between insulin level and glucose concentration in the rat blood after oral intake of phosphatidylinositol-containing liposomes is observed.

◆ ОБЗОРЫ

© Н. А. ШВЫРКОВА, 1995

УДК 616.379-008.64-092.9-07:616.83

Н. А. Швыркова

СОСТОЯНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Лаборатория нейроэндокринной регуляции (руководитель — доктор мед. наук Н. А. Швыркова) НИИ нормальной физиологии им. П. К. Анохина (дир. — акад. РАН К. В. Судаков) РАН Москва

После публикации данных об обнаружении инсулина в ткани мозга [36] резко возрос интерес к изучению роли инсулина в центральной нервной системе (ЦНС) [2,4] и изменений в ЦНС при сахарном диабете.

У больных сахарным диабетом установлена высокая частота психических нарушений [55]. Описаны осложнения со стороны нервной системы у детей, матери которых во время беременности были больны сахарным диабетом [3].

Выявлена роль инсулина в развитии и дифференцировке нейронов [35, 74], потенцировании синаптической активности [25], обмене катехоламинов [73], транскрипции генов в нервных клетках [20], что позволяет лучше понять механизм развития диабетической энцефалопатии.

В настоящем обзоре дан анализ результатов экспериментальных исследований ЦНС при диабете.

Функции ЦНС изучаются на самых разных уровнях, объектах и моделях: психологическое тестирование и изучение когнитивных процессов у людей, изучение индивидуального и зоосоциального поведения животных, обучения новым навыкам, морфологическое изучение мозга, исследование гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и его проницаемости, генетические и молекулярно-биологические исследования мозговой ткани, изучение содержания и обмена биологически активных веществ в мозге и рецепторов к ним, электрофизиологические исследования методами электроэнцефалографии, вызванных потенциалов и регистрации нейрональной активности. В обзоре рассмотрены результаты только аналитических методов изучения ЦНС.

Содержание инсулина и рецепторов к нему в мозговой ткани

Так как основным патогенетическим фактором в развитии сахарного диабета является прямая или опосредованная недостаточность инсулина в организме, естественным является вопрос о содержании инсулина и рецепторов к нему в мозго-

вой ткани при данной патологии. Однако в настоящее время данных по этому вопросу малочисленны и противоречивы. По данным I. Oomura и H. Kita [66], содержание мозгового инсулина у крыс со стрептозотоциновым диабетом из-за большой варибельности и малого числа определений не отличается от такового у интактных животных. По данным других авторов, содержание инсулина в мозге при сахарном диабете не изменено [24, 37], снижено [54] или повышено [43].

Связывание инсулина мозговой тканью у генетически тучных Zucker-крыс (fa/fa) снижено в гипоталамусе и не изменено в коре больших полушарий уже в шестинедельном возрасте [60], снижено в обонятельной луковице у гетерозиготных (Fa/fa) и тучных (fa/fa) взрослых Zucker-крыс, а также в обонятельной луковице, коре больших полушарий и гипоталамусе у тучных Wistar Kyoto (fa/fa) крыс [29].

Связывание инсулина изолированными микрососудами мозга значительно снижено у крыс, получавших стрептозотин (СТЗ), в сравнении с контрольными животными [31]. Данные о связывании инсулина нейрональными и глиальными клетками у животных с диабетом мы не обнаружили. Однако имеется указание на ухудшение киназной активности инсулинового рецептора у крыс со стрептозотоциновым диабетом [77]. По-видимому, если не за счет продукции или содержания поступающего через ГЭБ инсулина в мозговой ткани, то за счет сниженного связывания его рецепторами при сахарном диабете в ЦНС имеется инсулиновая недостаточность.

Гематоэнцефалический барьер

В настоящее время уже нет сомнений в том, что инсулин проникает в мозг через ГЭБ [8, 26], более того, предлагается использовать инсулин как транспортер специфических лекарственных ЦНС при заболевании СПИДом [7]. Нарушению функции ГЭБ отводится важная роль в патогенезе таких ос-