

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 615.357:577.175.343].03:616.379-008.64].015.44

А. В. Абрамов, Ю. М. Колесник, С. Д. Тржецинский, О. В. Ганчева

**ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПЕПТИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭНДОКРИННОЙ ФУНКЦИИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.****I. ЭФФЕКТЫ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ [Arg<sup>8</sup>]-ВАЗОПРЕССИНА<sup>1</sup>**

Кафедры патофизиологии (зав. — проф. Ю. М. Колесник) и фармакологии (зав. — проф. В. В. Дунаев) Запорожского медицинского университета Минздрава Украины

В хронических исследованиях, выполненных на интактных и диабетических крысах, установлено, что 10-дневное введение [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессина (суточная доза интрацеребровентрикулярно 24 фМ, интраперитонеально 240 пМ) приводит к увеличению содержания инсулина в β-клетках поджелудочной железы у нормогликемических крыс на  $6,6 \pm 0,2\%$  по сравнению с контрольной группой, а у гипергликемических диабетических крыс на  $25,6 \pm 0,6\%$  при интрацеребровентрикулярном введении и на  $15,9 \pm 0,8\%$  при интраперитонеальном введении. Введение вазопрессина диабетическим животным снижает уровень гликемии в среднем на 37%, однако не влияет при этом на процессы деструкции островков Лангерганса. Возможно, что инсулинстимулирующий эффект хронического интрацеребровентрикулярного введения вазопрессина связан с модуляцией функциональной активности гипоталамических центров пищевого поведения и дорсального моторного ядра блуждающего нерва, а интраперитонеальное введение пептида непосредственно стимулирует синтез инсулина в β-клетках.

Experiments on intact and diabetic rats demonstrated that 10-day injections of [Arg<sup>8</sup>]-vasopressin (intracerebroventricular (icv) daily dose 24 fM, intraperitoneal (ip) 240 pM) leads to increase in insulin content in pancreatic beta-cells in normoglycaemic rats by  $6.6 \pm 0.2\%$  in comparison with the controls and in hyperglycaemic diabetic rats by  $25.6 \pm 0.6\%$  after icv injection and by  $15.9 \pm 0.8\%$  after ip injection. Injection of vasopressin to diabetic animals decreased the level of glycaemia by 37% but did not affect the destruction of Langerhans' islets. The insulin-stimulating effect of chronic icv vasopressin can be explained by modulation of the functional activity of the hypothalamic centers of feeding behavior and with the vagus nerve dorsal motor nucleus, while ip injection of the peptide directly stimulates the production of insulin in beta-cells.

В последние годы опубликован ряд исследований, результаты которых позволяют рассматривать вазопрессинергическую нейросекреторную систему гипоталамуса как одно из возможных звеньев в центральной регуляции функциональной активности β-клеток поджелудочной железы. Показано, что при стрептозотоциновом сахарном диабете у крыс [3, 11], а также у мышей линии C57BL/KsJ с наследственным диабетом [2] наблюдается увеличение морфофункциональной активности вазопрессинсинтезирующих крупноклеточных субъядер паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса. Это сопровождается повышением концентрации вазопрессина в периферической крови как у диабетических животных [3, 9], так и у больных сахарным диабетом [15]. В экспериментах *in vitro* показано, что в условиях гипергликемии вазопрессин стимулирует секрецию инсулина β-клетками [12, 13, 21].

Целью настоящего исследования было изучение влияния хронического центрального и периферического введения [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессина интактным и диабетическим крысам на функциональное состояние β- и α-клеток поджелудочной железы.

**Материалы и методы**

Исследование проведено на 84 крысах-самцах линии Вистар массой 250—270 г. Сахарный диабет у крыс моделировали однократным введением стрептозотоцина фирмы "SIGMA Chemical" (США) в дозе 50 мг/кг в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) внутрибрюшинно. Для центрального (интрацеребровентрикулярного) введения вазопрессина экспериментальным животным предварительно имплантировали стальную канюлю (калибр G27) в правый латеральный желудочек мозга по координатам AP = 9,5 мм, L = 1,5 мм, H = 4,5 мм [20]. На 8-й день после операции животным опытной группы вводили стрептозотоцин. Начиная с 33-го дня интрацеребровентрикулярно ежедневно в течение 10 дней вводили синтетический [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессин ("Peninsula Laboratories Inc.", США) в дозе 24 фМ группам диабетических и нормальных крыс. Контрольным группам нормальных и диабетических животных по аналогичной схеме вводили 3 мкл 0,9% NaCl. Периферическое введение [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессина в дозе 240 пМ в 0,5 мл 0,9% NaCl осуществляли интраперитонеально в аналогичные временные сроки в течение 10 дней. Контрольной группе диабетических крыс интраперитонеально вводили 0,5 мл 0,9% NaCl. Через 24 ч после последнего введения пеп-

<sup>1</sup> Работа выполнена при поддержке МНФ (гранты № UDE000 и UDE200).

тида (на фоне 16-часового голодания) животных декапигировали под этиминаловым наркозом (40 мг/кг), брали кровь для определения содержания глюкозы, извлекали поджелудочную железу, которую фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин. Гормоны в эндокринных клетках поджелудочной железы выявляли методом непрямой иммуофлюоресценции: инсулин — с помощью иммуоцитохимического набора фирмы "Peninsula Laboratories Inc." (США), глюкагон — с помощью мышиных моноклональных антител (первичные антитела в разведении 1:2000) и кроличьих антител к IgG мыши (вторичные антитела в разведении 1:64) производства фирмы "SIGMA Chemical" (США). Количественное денситометрическое определение содержания инсулина в  $\beta$ -клетках и глюкагона в  $\alpha$ -клетках проводили в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390–420 нм с помощью автоматизированной компьютерной цитофлуориметрической системы ЛЮМАМ-И2 (ЛОМО, Россия) по ранее описанной методике [4]. В каждой экспериментальной группе исследовали 80–100 островков Лангерганса в серийных срезах различных отделов поджелудочной железы, регистрировали количество клеток в каждом островке и содержание гормона в каждой клетке (в условных микроединицах — мкЕ). Концентрацию инсулина в сыворотке крови определяли радиоиммунным методом с помощью набора РИО-ИНС-ПГ-<sup>125</sup>I (ИБОХ АН Республики Беларусь). Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью набора "ДИАКОМ Глюкоза ГО" (ДИАКОМ-СИНТЭКО, Россия). При статистической оценке экспериментальных данных и определении достоверности различий в группах использовали *t*-критерий Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

Развитие стрептозотоцинового сахарного диабета на протяжении 5 нед приводило к деструкции  $\beta$ -клеток, достоверному снижению их количества в островках Лангерганса и уменьшению содержания в них инсулина, а также увеличению

количества  $\alpha$ -клеток без изменения содержания в них глюкагона (см. таблицу). При этом в периферической крови отмечалось закономерное снижение концентрации инсулина и развитие гипергликемии.

Хроническое интрацеребровентрикулярное введение 0,9% NaCl интактным и диабетическим крысам не влияло на изменение основных показателей функционального состояния  $\beta$ - и  $\alpha$ -клеток, концентрацию инсулина и глюкозы в крови у этих животных ( $p > 0,05$ ). В то же время хроническое введение вазопрессина экспериментальным животным оказывало выраженное влияние на состояние синтеза и секреции инсулина  $\beta$ -клетками поджелудочной железы. Так, интрацеребровентрикулярное введение вазопрессина нормальным животным приводило к достоверному увеличению содержания инсулина в  $\beta$ -клетках, снижению содержания глюкагона в  $\alpha$ -клетках и уменьшению концентрации глюкозы в крови. При этом концентрация инсулина в периферической крови и среднее количество функционирующих клеток в островках не изменялись.

Аналогичные эффекты наблюдали и при хроническом введении вазопрессина диабетическим животным: содержание инсулина в  $\beta$ -клетках возрастало, достоверно превышая значение в контроле, а содержание глюкагона в  $\alpha$ -клетках достоверно уменьшалось. По сравнению с контрольной группой диабетических крыс введение вазопрессина повышало концентрацию инсулина в крови ( $p < 0,001$ ) и снижало уровень гликемии ( $p < 0,0001$ ). Характерно, что введение вазопрессина не влияло на процессы деструкции  $\beta$ -клеток при диабете и не приводило к изменению их среднего количества в островках Лангерганса. Вместе с тем количество  $\alpha$ -клеток в островках уменьшалось и в случае центрального введения вазопрессина не отличалось от данного показателя в группе интактных животных.

Обращают на себя внимание более выраженный эффект стимуляции синтеза инсулина в  $\beta$ -клетках в условиях диабетической гипергликемии по сравнению с нормогликемическими животными ( $p < 0,0001$ ), а также то обстоятельство, что повышение содержания инсулина в  $\beta$ -клетках при хроническом интрацеребровентрикулярном

**Концентрация глюкозы и инсулина в крови, количество  $\beta$ -клеток в островках Лангерганса и содержание в них инсулина у интактных и диабетических крыс при хроническом введении [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессина ( $M \pm m$ )**

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л	Количество $\beta$ -клеток в островках	Содержание инсулина в $\beta$ -клетках, мкЕ	Концентрация инсулина в крови, пмоль/л	Количество $\alpha$ -клеток в островках	Содержание глюкагона в $\alpha$ -клетках, мкЕ
Интактные крысы	3,59 ± 0,06	49,9 ± 2,3	1893,5 ± 4,9	62,1 ± 5,8	15,9 ± 1,2	3149,9 ± 12,5
Нормальные крысы с интрацеребровентрикулярным введением 0,9% NaCl	3,64 ± 0,07	48,7 ± 2,5	1874,8 ± 7,0	60,8 ± 6,4	16,6 ± 0,9	3160,9 ± 15,3
Нормальные крысы с интрацеребровентрикулярным введением вазопрессина	3,37 ± 0,06*	47,5 ± 2,7	2019,4 ± 4,2***	57,2 ± 6,2	16,5 ± 0,5	2462,7 ± 13,0***
Диабетические крысы	8,49 ± 0,41**	15,3 ± 1,4***	1389,6 ± 7,3	17,9 ± 3,2***	23,5 ± 1,5***	3125,8 ± 17,8
Диабетические крысы с интрацеребровентрикулярным введением 0,9% NaCl	8,52 ± 0,47**	15,7 ± 1,3***	1382,7 ± 8,9***	18,0 ± 3,5***	22,8 ± 1,3***	3137,3 ± 16,8
Диабетические крысы с интрацеребровентрикулярным введением вазопрессина	4,95 ± 0,34**	17,2 ± 1,2***	2383,2 ± 11,8***	35,2 ± 4,0*	18,5 ± 0,9	2587,2 ± 16,4***
Диабетические крысы с интраперитонеальным введением вазопрессина	5,30 ± 0,39**	13,9 ± 1,6***	2193,9 ± 15,1***	30,1 ± 3,0**	20,0 ± 1,2*	2533,9 ± 19,6***

Примечание. Звездочки — достоверность различий с группой интактных животных: одна — при  $p < 0,05$ ; две — при  $p < 0,001$ ; три — при  $p < 0,0001$ .

введении вазопрессина было более значимым, чем при интраперитонеальном введении ( $p < 0,0001$ ).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о стимулирующем влиянии хронического введения  $[\text{Arg}^8]$ -вазопрессина на синтез инсулина в  $\beta$ -клетках как в условиях гипергликемии при диабете, так и у нормогликемических контрольных крыс. Однако более выраженная интенсивность синтеза инсулина при введении вазопрессина диабетическим животным свидетельствует о глюкозозависимом характере инсулинстимулирующего действия данного нейропептида. Стимулирующее влияние вазопрессина на секрецию инсулина  $\beta$ -клетками проявлялось только в условиях гипергликемии при диабете, что согласуется с ранее проведенными исследованиями на изолированной поджелудочной железе [12] и в культуре  $\beta$ -клеток [13]. Несмотря на имеющиеся данные о возможности глюкозозависимой стимуляции секреции инсулина вазопрессином *in vitro* [21], в наших исследованиях *in vivo* мы не зарегистрировали повышения концентрации инсулина в крови у контрольных нормогликемических крыс. Возможно, что в этих условиях усиление секреции инсулина под влиянием введения вазопрессина носит транзиторный характер.

Анализируя возможные механизмы инсулинстимулирующего эффекта вазопрессина при его хроническом введении, следует обратить внимание на то, что развитие сахарного диабета у крыс сопровождается увеличением морфофункциональной активности вазопрессинергических нейронов паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса [3], повышением в них синтеза вазопрессина [11] и увеличением его концентрации в периферической крови [3, 5, 9]. В этих условиях возможна реализация центральных и периферических эффектов вазопрессина. Наличие эфферентных проекций от мелкоклеточных вазопрессинергических нейронов паравентрикулярного ядра к вентромедиальному ядру гипоталамуса [23] и к дорсальному моторному ядру блуждающего нерва [1] обеспечивает проявление нейротрансмиссивных и нейромодуляторных эффектов вазопрессина в центральной нервной системе. Известно, что вазопрессининдуцируемая модуляция гипоталамических центров пищевой мотивации может давать анорексический эффект [18] и приводить к повышению функциональной активности дорсального моторного ядра блуждающего нерва [10, 18], который оказывает прямое стимулирующее влияние на синтез и секрецию инсулина в поджелудочной железе [1, 10, 22]. Возможно, что инсулинстимулирующий эффект вазопрессина при его хроническом введении в желудочки мозга опосредован нейрогенными механизмами регуляции функции  $\beta$ -клеток со стороны симпатического (вентромедиальное ядро гипоталамуса) и парасимпатического (дорсальное моторное ядро блуждающего нерва) центров.

Реализация периферических эффектов вазопрессина связана с тем, что основные проекции крупноклеточных вазопрессинсинтезирующих нейронов паравентрикулярного и супраоптического ядер направляются в нейрогипофиз [23].

Поэтому гиперфункция нейросекреторных клеток этих образований при сахарном диабете приводит к повышению концентрации вазопрессина в периферической крови у диабетических животных [3, 5, 9] и больных сахарным диабетом [15]. Метаболические эффекты вазопрессина хорошо изучены [6] и проявляются усилением гликогенолиза, глюконеогенеза и ослаблением кетогенеза в печени. Наряду с этим следует учесть способность вазопрессина взаимодействовать с  $\text{V1b}$ -рецепторами кортикотропов [16] и активировать гипофизарно-адренкортикальную ось [7], что приводит к усилению секреции АКТГ и, следовательно, глюкокортикоидов. Взаимодействуя с  $\text{V1a}$ -рецепторами клеток коры надпочечников, вазопрессин способен самостоятельно стимулировать секрецию глюкокортикоидов [14]. Вероятно, в результате описанных механизмов при диабете концентрация кортикостероидов в крови увеличивается [5]. Очевидно, что характер подобных эффектов имеет гипергликемическую направленность и, с точки зрения углеводного гомеостаза, оправдан в условиях гипогликемической стимуляции синтеза [19] и секреции вазопрессина [8]. Вместе с тем полученные нами данные свидетельствуют о том, что хроническое периферическое введение вазопрессина диабетическим животным, напротив, снижает уровень гликемии за счет увеличения синтеза инсулина  $\beta$ -клетками и повышения его концентрации в крови. Механизм подобного явления, по-видимому, заключается в стимуляции вазопрессином  $\text{V1b}$ -рецепторов  $\beta$ -клеток, что приводит к повышению секреции инсулина [13, 17]. Возможно, данный эффект более выражен в условиях гипергликемии и в меньшей степени проявляется при нормогликемии [12, 13, 21]. Следовательно, активация вазопрессинергической нейросекреторной системы гипоталамуса при сахарном диабете может иметь компенсаторное значение и направлена на стимуляцию синтеза и секреции инсулина.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что центральные и периферические эффекты вазопрессина при его хроническом введении способствуют снижению уровня гликемии при диабете и нормализации углеводного гомеостаза.

## Выводы

1. Хроническое центральное и периферическое введение  $[\text{Arg}^8]$ -вазопрессина нормальным крысам приводит к усилению синтеза инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, но не влияет на уровень инсулина в крови.
2. Хроническое центральное и периферическое введение  $[\text{Arg}^8]$ -вазопрессина крысам с сахарным диабетом стимулирует синтез инсулина в  $\beta$ -клетках, повышает концентрацию инсулина в крови, снижает уровень гликемии, но не влияет на процессы деструкции  $\beta$ -клеток.
3. Эффекты хронического центрального введения  $[\text{Arg}^8]$ -вазопрессина выражены в большей степени, чем при его хроническом периферическом введении.

1. Акмаев И. Г. // Морфология. — 1992. — Т. 102, № 3. — С. 5—39.
2. Колесник Ю. М., Василенко Г. В., Абрамов А. В. // Арх. пат. — 1992. — № 12. — С. 24—27.
3. Колесник Ю. М., Орестенко Ю. Н., Абрамов А. В. // Пробл. эндокринол. — 1993. — № 1. — С. 45—48.
4. Колесник Ю. М., Василенко Г. В., Абрамов А. В. // Арх. пат. — 1994. — № 4. — С. 56—60.
5. Колесник Ю. М., Абрамов А. В., Мельникова О. В. // Пробл. эндокринол. — 1996. — № 1. — С. 34—37.
6. Пансуевич О. С., Чипенс Г. И., Михайлова С. В. Нейрогипофизарные гормоны. — Рига, 1986.
7. Aguilera G. // Front. Neuroendocrinol. — 1994. — Vol. 15. — P. 321—350.
8. Berkenbosch F., De Goeij D. C. E., Tilders F. J. H. // Endocrinology. — 1989. — Vol. 125, N 1. — P. 28—34.
9. Brooks D. P., Nutting D. F., Crofton J. T., Share L. // Diabetes. — 1989. — Vol. 38, N 1. — P. 54—57.
10. Dreifuss J. J., Tribollet E., Dubois-Dauphin M., Raggenbass M. // Arch. Hystol. Cytol. — 1989. — Vol. 52, Suppl. — P. 129—138.
11. Ferstrom J. D., Fernstrom M. H., Kwok R. P. S. // Amer. J. Physiol. — 1990. — Vol. 269. — P. E662—E666.
12. Gao Z.-Y., Drews G., Nenguin M. et al. // J. Biol. Chem. — 1990. — Vol. 266, N 26. — P. 15724—15730.
13. Gao Z.-Y., Henquin J. C. // Diabetes. — 1993. — Vol. 42. — P. 914—921.
14. Guillon G., Trueba M., Jourbet D. et al. // Endocrinology. — 1995. — Vol. 136. — P. 1285—1295.
15. Iwasaki Y., Kondo K., Murase T. et al. // J. Neuroendocrinol. — 1996. — Vol. 8, N 10. — P. 755—760.
16. Jard S., Gaillard R. C., Guillon G. et al. // Mol. Pharmacol. — 1986. — Vol. 30. — P. 171—177.
17. Lee B., Yang C., Chen T. H. et al. // Amer. J. Physiol. — 1995. — Vol. 32, N 6. — P. E1095—E1100.
18. Leibowitz S. F. // Obesity Res. — 1995. — Vol. 3, N 1. — P. S569—S572.
19. Paulmyerlacroix O., Anglade G., Grino M. // J. mol. Endocrinol. — 1994. — Vol. 13, N 3. — P. 313—320.
20. Paxinos G. B., Watson C. C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. — Sydney, 1986.
21. Richardson S. B., Laya T., Vanooy M. // J. Endocrinol. — 1995. — Vol. 145, N 2. — P. 221—226.
22. Strubbe J. H., Steffens A. R. // Horm. Metab. Res. — 1993. — Vol. 25, N 10. — P. 507—512.
23. Swanson L. W., Sawchenko P. E. // Ann. Rev. Neurosci. — 1983. — Vol. 6. — P. 269—324.

Поступила 14.01.98

© Ю. О. ФЕДОТОВА, 1998

УДК 612.018.2:577.175.61.08

Ю. О. Федотова

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ОБУЧЕНИЯ И ПОВЕДЕНИЯ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО УРОВНЯ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Отдел нейрофармакологии им. С. В. Аничкова (зав. — проф. Н. С. Сапронов) НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Оценивали влияние повышенного уровня половых гормонов при системном введении гормональных препаратов на способность к обучению, сохранение следа памяти и поведение у крыс обоего пола. Эксперименты выполняли на моделях условной реакции активного и пассивного избегания и в тесте "открытое поле". Увеличение уровня тестостерона или эстрадиола не влияло на пассивное обучение. Повышение уровня тестостерона у крыс-самцов приводило к нарушению активного обучения и не меняло поведения животных. Повышение уровня эстрадиола у крыс-самок ускоряло активное обучение и повышало поведенческую активность животного.

*Relationship between increased level of sex hormones during systemic injection of hormones and the training capacity and trace memory and behavior is studied in rats of both sexes. Active and passive avoidance and open field tests were carried out. Increase in testosterone or estradiol levels did not affect passive training. Increase of testosterone level in male rats disturbed active training and did not change the behavior. Increase of estradiol level in female rats accelerated active training and stimulated behavioral activity of animals.*

Приоритет в исследованиях последних лет в области нейроэндокринологии принадлежит установлению четких взаимоотношений между нервной и эндокринной системами в формировании различных поведенческих реакций, эмоций и памяти, а также выяснению тонких механизмов взаимодействия между отдельными гормонами и нервными факторами в регуляции высших функций мозга [3]. Несмотря на это, несколько меньше внимания уделяется исследованиям, касающимся влияния половых гормонов на процессы обучения и памяти, особенно посвященным изучению взаимосвязи между характером процесса обучения и уровнем андрогенов или эстрогенов в организме.

Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка влияния повышенного уровня половых гормонов в организме при системном введении гормональных препаратов на способность к обучению, сохранение следа памяти и поведение у крыс обоего пола.

### Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 120 белых беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 200—220 г, полученных из питомника "Рапполово". Исследования проводили в утренние часы (с 9 до 13 ч). Животных содержали в условиях вивария при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного и пищевого режимов со свободным доступом к еде и воде. Для выполнения каждой методики крыс разделили на 4 группы: 2 контрольные (самцы и самки) и 2 опытные по 10 животных в группе. Моделирование избытка половых гормонов осуществляли путем предварительного введения синтетических гормональных препаратов в течение 4 сут: тестостерона пропионата (Ростовский химический завод) в дозе 5,0 мг/кг внутримышечно и эстрадиола дипропионата (АО "Здоровье", Харьков) в дозе 0,1 мг/кг внутримышечно. В течение всего периода обучения и тестирования постоянный повы-