

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 616.379-008.64-092:612.822.11-092.9

Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов, А. В. Траилин, С. Д. Тржецинский

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОПЕПТИДА Y НА СОСТОЯНИЕ β - И α -КЛЕТОК ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА У ИНТАКТНЫХ И ДИАБЕТИЧЕСКИХ КРЫС

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

С целью изучения влияния нейропептида Y (NPY) на эндокринную функцию поджелудочной железы его вводили интактным и диабетическим крысам на протяжении 10 дней (интрацеребровентрикулярно в дозе 10 нг или интраперитонеально в дозе 2,5 мкг ежедневно). Установлено, что у интактных животных NPY вызывает увеличение содержания инсулина в островках (в большей степени при интрацеребровентрикулярном пути введения). Содержание глюкагона в α -клетках увеличивается при интраперитонеальном пути введения и уменьшается при интрацеребровентрикулярном. У диабетических животных введение NPY тормозит деструкцию β -клеток и увеличивает содержание инсулина в островках (в большей степени при интрацеребровентрикулярном введении). Количество α -клеток в островках уменьшается до уровня контроля, а содержание глюкагона в них становится ниже уровня контроля (в большей степени при интраперитонеальном введении). В крови увеличивается концентрация инсулина и снижается уровень гликемии. Возможно, что эффекты NPY при периферическом введении обусловлены непосредственным воздействием на α - и β -клетки, а при центральном — связаны с модуляцией секреции гипоталамических гормонов и функционального состояния дорсального комплекса блуждающего нерва.

The effect of neuropeptide Y (NPY) on the pancreatic endocrine function is studied. NPY was injected to intact and diabetic rats for 10 days intracerebroventricularly (i.c.v.) in a dose of 10 ng or intraperitoneally (i.p.) in a dose of 2.5 μ g daily. In intact animals, NPY caused an increase in insulin content in the islets, more pronounced after i.c.v. injection. The content of glucagon in α -cells increased after i.p. injection and decreased after i.c.v. injection. In diabetic animals, NPY inhibited the destruction of β -cells and increased the content of insulin in the islets, which was more pronounced after i.c.v. injection. The count of α -cells in the islets dropped to the control level, while the level of glucagon remained decreased (more so after i.p. injection). The content of insulin in the blood increased and level of glycaemia decreased. The effects of NPY upon its peripheral administration may be explained by direct action on α - and β -cells and upon central administration by modulation of hypothalamic hormone secretion and function of dorsal component of vagus nerve.

Нейропептид Y (NPY) впервые был выделен К. Tatemoto [18] в 1982 г. из мозга лягушек. Последующие исследования показали, что он широко распространен в структурах центральной и периферической нервной системы [11]. В головном мозге наибольшая плотность нейронов и нервных волокон, содержащих NPY, выявлена в гипоталамусе [11]. В последнее время внимание исследователей привлекают внегипоталамические источники синтеза NPY. Доказана способность синтеза NPY β -, Δ - [10] и α -клетками [19] панкреатических островков.

В экспериментах на перфузируемой поджелудочной железе [12] и интактных наркотизированных крысах [9, 15] показано, что однократное введение NPY изменяет секрецию инсулина и глюкагона. Кроме того, у животных с экспериментальным диабетом I и II типа наблюдается увеличение синтеза NPY в гипоталамических ядрах, являющихся центрами координации углеводного и энергетического метаболизма [7].

Приведенные данные позволяют предположить, что один из возможных биологических эффектов NPY состоит в способности влиять на функцию островков Лангерганса и гомеостаз глюкозы.

В связи с вышеизложенным целью работы было изучение влияния хронического центрального и периферического введения NPY на состояние

β - и α -клеток у интактных и диабетических животных с учетом их возможных паракринных взаимоотношений.

Материалы и методы

Исследование проведено на 85 крысах линии Вистар массой 250—270 г. Животные были разделены на 6 экспериментальных групп (см. таблицу): 1-я группа — интактные, 2-я — нормальные с периферическим введением NPY, 3-я — нормальные с центральным введением NPY, 4-я — крысы с экспериментальным диабетом I типа, 5-я — диабетические крысы с периферическим введением NPY, 6-я — диабетические крысы с центральным введением NPY. Сахарный диабет моделировали однократным введением стрептозотоцина ("Sigma Chemical", США) в дозе 50 мг/кг в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (pH 4,5) внутривентрикулярно [1]. NPY вводили ежедневно в течение 10 дней. Для центрального (интрацеребровентрикулярного) введения пептида в дозе 10 нг в 3 мкл 0,9% раствора NaCl 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 [14]. На 8-й день после операции животным 6-й группы моделировали диабет. Крысам 6-й груп-

Группа животных	Площадь островка, мкм ²	Площадь иммунореактивного материала, мкм ²	Концентрация инсулина в островках, мкЕ	Содержание инсулина в островках, мкЕ	Количество α -клеток в островках	Содержание глюкагона в α -клетках, мкЕ	Концентрация инсулина в крови, мг/мл	Концентрация глюкозы в крови, ммоль/л
1-я	4742 $\pm$ 251	2424 $\pm$ 120	1,32 $\pm$ 0,03	2518 $\pm$ 101	15,9 $\pm$ 1,2	3150 $\pm$ 13	62,1 $\pm$ 5,8	3,60 $\pm$ 0,07
2-я	4331 $\pm$ 232	2731 $\pm$ 129	1,46 $\pm$ 0,03**	3109 $\pm$ 110**	16,3 $\pm$ 0,6	3254 $\pm$ 13**	56,1 $\pm$ 3,7	4,05 $\pm$ 0,29
3-я	7643 $\pm$ 197**	4217 $\pm$ 125**	1,04 $\pm$ 0,02**	3977 $\pm$ 104**	17,1 $\pm$ 0,6	2839 $\pm$ 15**	62,4 $\pm$ 5,6	4,53 $\pm$ 0,25
4-я	1617 $\pm$ 160**	382 $\pm$ 23**	1,77 $\pm$ 0,04**	639 $\pm$ 32**	23,5 $\pm$ 1,5**	3126 $\pm$ 18	18,0 $\pm$ 3,2**	8,50 $\pm$ 0,42**
5-я	3041 $\pm$ 191**	1158 $\pm$ 82**	1,59 $\pm$ 0,03**	1328 $\pm$ 70**	17,9 $\pm$ 1,0	2690 $\pm$ 17**	44,5 $\pm$ 4,9*	6,33 $\pm$ 0,62*
6-я	2985 $\pm$ 165**	1548 $\pm$ 79**	1,48 $\pm$ 0,02**	1822 $\pm$ 73**	16,8 $\pm$ 0,6	2903 $\pm$ 13**	47,7 $\pm$ 2,9*	6,00 $\pm$ 0,53*

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

пы NPY вводили с 26-го по 35-й день течения патологического процесса, а крысам 3-й группы — с 33-го дня после имплантации канюли. Периферическое введение NPY осуществляли интраперитонеально в дозе 2,5 мкг в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl в те же временные сроки. Дополнительным группам нормальных и диабетических животных, которые служили контролем, в течение 10 дней интраперитонеально и интрацеребровентрикулярно вводили аналогичные количества 0,9% раствора NaCl.

Через 24 ч после последнего введения пептида или физиологического раствора на фоне 16-часового голодания животных декапитировали под этиловым наркозом (40 мг/кг), отбирали кровь для определения концентрации глюкозы и инсулина, извлекали поджелудочную железу, которую фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной гистологической обработки заливали в парафин.

Определение уровня инсулина и глюкагона в серийных срезах поджелудочной железы толщиной 5 мкм проводили методом непрямой иммунофлуоресценции.

Для выявления концентрации инсулина использовали набор фирмы "Peninsula Laboratories Inc." (США). Количественное определение инсулина в островках проводили с помощью компьютерной системы цифрового анализа изображения VIDAS-386 ("Kontron Elektronik", Германия), сопряженной посредством высокочувствительной видеокамеры СОНУ 4722 ("СОНУ Inc.", США) с микроскопом "Axioscop" ("Zeiss", Германия). Определяли следующие параметры: площадь островка Лангерганса (в мкм²), площадь материала, иммунореактивного к инсулину (в мкм²), а также его концентрацию и содержание в островках (в условных микроединицах — мкЕ), вычисляемое как произведение площади иммунореактивного материала на концентрацию инсулина.

Для определения уровня глюкагона в качестве первичных антител использовали мышиные моноклональные антитела к глюкагону ("Sigma"), а в качестве вторичных — козы IgG против Ig мыши, конъюгированные с FITC ("Sigma"). Количественное определение содержания глюкагона в α -клетках проводили в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390–420 нм на компьютерной цитофлуориметрической системе ЛЮМАМ-И2 (ЛОМО, Россия) по ранее описанной методике [4]. В каждой экспериментальной группе исследовали 80–100 островков Лангерганса в серийных срезах из различных отделов поджелудочной железы. Регистрировали количество α -клеток в каждом островке и содержание гормона в каждой из

них, пропорциональное интенсивности флуоресценции (в мкЕ). Определение концентрации инсулина в крови проводили радиоиммунологическим методом с использованием коммерческого набора РИО-ИНС-ПГ-¹²⁵I (Беларусь), а глюкозы в крови — глюкозооксидазным методом с помощью набора "Диакон Глюкоза ГО" (ДИАКОМ-СИНТЭКО, Россия). Результаты исследования обрабатывали статистически с помощью программы Excel.7 с использованием t -критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Установлено (см. таблицу), что интраперитонеальное введение NPY интактным животным вызывало достоверное увеличение концентрации и содержания инсулина в островках, а также увеличение содержания глюкагона в α -клетках. Остальные показатели достоверно не изменялись. Эти эффекты, по-видимому, обусловлены прежде всего непосредственным влиянием NPY на клетки островков Лангерганса. Поскольку концентрация инсулина и глюкозы в крови при увеличении содержания инсулина в β -клетках достоверно не изменялась, можно предположить, что в данном случае наблюдалось ослабление процесса его секреции. Сходные результаты были получены в экспериментах на изолированной поджелудочной железе [12]. Увеличение содержания глюкагона может быть связано с ослаблением под влиянием NPY ингибирующего действия инсулина на α -клетки, которое в свою очередь обусловлено особенностями внутриостровковой регуляции [17].

При интрацеребровентрикулярном введении пептида интактным животным площадь островков, площадь материала, иммунореактивного к инсулину, и его содержание в островках достоверно увеличивались по сравнению как с контрольной группой, так и с животными с интраперитонеальным введением ($p < 0,001$), а концентрация инсулина в островках уменьшалась. Эти данные позволяют предположить, что интрацеребровентрикулярное введение NPY вызывает усиление синтеза и секреции инсулина. В опубликованных ранее результатах работ с однократным интрацеребровентрикулярным введением NPY интактным животным факт усиления секреции инсулина также имел место [9]. Содержание глюкагона в α -клетках в отличие от периферического пути введения NPY достоверно уменьшалось ($p < 0,001$). Концентрация инсулина и глюкозы в плазме достоверно не изменялась.

Эти эффекты могут быть обусловлены дополнительным включением в процесс регуляции эндокринной функции поджелудочной железы и других механизмов, опосредованных структурами гипоталамуса, гипофиза и ствола мозга.

Так, известно, что в передней доле гипофиза НPY влияет на секрецию пролактина [16], оказывающего стимулирующее действие на процесс пролиферации β -клеток [5]. В гипоталамусе НPY может стимулировать секрецию вазопрессина и окситоцина в СОЯ и ПВЯ [8, 13, 20] с последующей реализацией их центральных и периферических инсулинстимулирующих эффектов [1, 2]. Кроме того, НPY может реализовывать свои эффекты через дорсальный комплекс блуждающего нерва [6], стимулирующее влияние которого на β -клетки хорошо известно [3]. Содержание же глюкагона в α -клетках уменьшается, по-видимому, вследствие усиления синтеза и секреции инсулина, которое при этом пути введения выражено в значительно большей степени. Кроме того, в этом случае может отмечаться и усиление секреции глюкагона, о чем свидетельствуют результаты экспериментов с однократным введением НPY в третий желудочек [9], а также нормальный уровень глюкозы в крови в наших исследованиях.

Хроническое интрацеребровентрикулярное и интраперитонеальное введение физиологического раствора нормальным животным не влияло на изучаемые нами показатели ($p > 0,05$).

Развитие сахарного диабета к концу исследования характеризовалось деструкцией островков Лангерганса, что выражалось в уменьшении площади островков, площади материала, иммунореактивного к инсулину, и содержания гормона в островках ($p < 0,001$). Концентрация инсулина в островках по сравнению с таковой в контрольной группе увеличивалась. Отмечалось достоверное увеличение количества идентифицированных в островках α -клеток без изменения содержания в них глюкагона. В крови регистрировались гипергликемия и снижение концентрации инсулина (см. таблицу).

Как интраперитонеальное, так и интрацеребровентрикулярное введение НPY этим животным приводило по сравнению с диабетическими крысами к однонаправленным изменениям со стороны островков Лангерганса. Увеличивались площадь островков, площадь материала, иммунореактивного к инсулину, и его содержание в островках, что связано с торможением процесса деструкции β -клеток (см. таблицу). При этом концентрация инсулина в островках уменьшалась по сравнению с таковой у диабетических животных. Эти эффекты были более выражены при интрацеребровентрикулярном введении пептида ($p < 0,001$). Количество идентифицированных в островках α -клеток уменьшалось практически до уровня контроля, а содержание глюкагона в них становилось достоверно ниже этого уровня, причем в более значительной степени при интраперитонеальном введении пептида ($p < 0,001$). При обоих способах введения в периферической крови отмечалось увеличение концентрации инсулина и снижение уровня гликемии по сравнению с диабетическими животными ($p < 0,05$).

Как и у нормальных животных, хроническое интрацеребровентрикулярное и интраперитонеальное введение физиологического раствора диабетическим крысам не влияло на изучаемые нами показатели ($p > 0,05$).

Таким образом, оба пути введения НPY диабетическим животным вызывают торможение деструкции β -клеток, усиление синтеза и секреции инсулина. Большая выраженность этих эффектов при интрацеребровентрикулярном пути введения предполагает, как и у интактных животных, участие центральных механизмов [6, 8, 16, 21]. Уменьшение содержания глюкагона в α -клетках при введении НPY диабетическим животным, по-видимому, связано с усилением синтеза и секреции инсулина на фоне торможения деструкции β -клеток и его тормозным влиянием на α -клетки [17]. При этом не исключается и прямое влияние НPY на α -клетки, которое более выражено при периферическом введении пептида. Об усилении секреции глюкагона под влиянием НPY свидетельствуют также опубликованные ранее результаты работ, выполненных на перфузируемой поджелудочной железе [12] и на интактных животных с однократным интрацеребровентрикулярным введением НPY [9].

Следует обратить внимание на то, что влияние НPY на β -клетки у диабетических животных более выражено при интрацеребровентрикулярном пути введения, а на α -клетки — при интраперитонеальном. Это дает основание полагать, что регуляция состояния α -клеток НPY осуществляется преимущественно путем прямого воздействия [12]. В регуляции же состояния β -клеток большее значение имеют свойства НPY как нейротрансмиттера и нейромодулятора в ЦНС.

Таким образом, нами показано, что эффекты хронического введения НPY зависят от пути введения пептида и состояния животных. Наиболее значительными эффектами являются стимуляция синтеза и секреции инсулина, а также торможение процесса деструкции β -клеток у крыс с сахарным диабетом, что имеет не только теоретическое, но и практическое значение для клинической диабетологии.

В свете выявленных нами положительных эффектов хронического введения НPY диабетическим животным представляется необходимым дальнейшее изучение его возможной роли как в патогенезе развития сахарного диабета, так и в способах его патогенетической терапии.

Выводы

1. Хроническое введение НPY крысам оказывает влияние на α - и β -клетки в зависимости от пути введения пептида и состояния животных.

2. Введение НPY животным с сахарным диабетом вызывает увеличение площади островков и содержания в них инсулина, а также торможение деструкции β -клеток, уменьшение количества идентифицированных α -клеток в островках и содержания в них глюкагона, усиление секреции инсулина в кровь и снижение уровня гликемии.

3. У животных с сахарным диабетом влияние НPY на β -клетки более выражено при интрацеребровентрикулярном введении, а на α -клетки — при интраперитонеальном.

1. Абрамов А. В. // Вестн. пробл. биол. и мед. — 1997. — № 22. — С. 48—54.
2. Абрамов А. В. // Пробл. эндокринолог. — 1997. — № 5. — С. 35—38.
3. Акмаев И. Г. // Морфология. — 1992. — Т. 102, № 3. — С. 5—39.
4. Колесник Ю. М., Василенко Г. В., Абрамов А. В. // Арх. пат. — 1994. — № 4. — С. 56—60.
5. Brelje T. C., Sorenson R. L. // Endocrinology. — 1991. — Vol. 212, N 1. — P. 45—57.
6. Harfstrand A., Fuxe K., Agnati L. F. et al. // Acta physiol. scand. — 1986. — Vol. 128, N 2. — P. 195—200.
7. Jones P. M., Pierson A. M., Williams G. et al. // Diabet. Med. — 1992. — Vol. 9, N 1. — P. 76—80.
8. Leibowitz S. F., Sladek C., Spencer L., Tempel D. // Brain Res. Bull. — 1988. — Vol. 21. — P. 905—912.
9. Marks J. L., Waite K. // J. Neuroendocrinol. — 1997. — Vol. 9, N 2. — P. 99—103.
10. Myrden U., Ahren B., Sundler F. // Regul. Peptides. — 1995. — Vol. 60, N 1. — P. 19—31.
11. O'Donohue T. L., Chronwall B. M., Pruss R. M. et al. // Peptides. — 1985. — Vol. 6. — P. 755—768.
12. Opara E. C., Burch W. M., Taylor I. L., Akwari O. // Regul. Peptides. — 1991. — Vol. 34, N 3. — P. 225—230.
13. Parker S. L., Crowley W. R. // Endocrinology. — 1993. — Vol. 132. — P. 658—666.
14. Paxinos G. B., Watson C. C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. — Sydney, 1986.
15. Pettersson M., Lundquist I., Ahren B. // Endocrine Res. — 1987. — Vol. 13, N 4. — P. 407—417.
16. Rettori V., Milenkovic L., Riedel M. et al. // Endocrinol. exp. — 1990. — Vol. 24, N 12. — P. 37—45.
17. Samols E., Stagner J. I. // Amer. J. Med. — 1988. — Vol. 85, N 5A. — P. 31—35.
18. Tatemoto K., Carlquist M., Mutt V. // Nature. — 1982. — Vol. 296. — P. 659—662.
19. Teitelman G., Alpert S., Polak J. M. et al. // Development. — 1993. — Vol. 118, N 4. P. 1031—1039.
20. Willoughby J. O., Blessing W. W. // Neurosci. Lett. — 1987. — Vol. 75. — P. 17—22.

Поступила 28.07.98

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1999

УДК 615.272.4.015.2:615.276.4].03:616.379-008.64

В. И. Новиков, О. В. Молотков, А. П. Подченко, С. А. Исаева, О. В. Тутарчук

ВЛИЯНИЕ РАЗДЕЛЬНОГО И СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ Т-АКТИВИНА И α -ТОКОФЕРОЛА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Кафедры эндокринологии (зав. — доц. В. И. Новиков) и патофизиологии (зав. — проф. О. В. Молотков), ЦНИЛ (зав. Г. Н. Федоров) Смоленской государственной медицинской академии

Представлены данные о влиянии Т-активина и α -токоферола в монотерапии и сочетанной терапии на состояние процессов перекисного окисления липидов и углеводный обмен при стрептозотоцининдуцированном сахарном диабете (белые крысы-самцы; $n = 102$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что Т-активин обладает антиоксидантной активностью, сопоставимой с α -токоферолом. Сочетанная терапия Т-активин и α -токоферолом обладает более выраженной антиоксидантной активностью, чем при монотерапии. При введении Т-активина на фоне нормализации показателей перекисного окисления липидов происходят нормализация гликемических показателей и повышение уровня инсулина плазмы крови, что можно расценивать как начало становления процессов репаративной регенерации инсулинпродуцирующих клеток; α -токоферол не ведет к существенному повышению уровня инсулина и полной нормализации уровня глюкозы крови.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что Т-активин дает более широкого спектра лечебный эффект при экспериментальном сахарном диабете по сравнению с α -токоферолом.

Effects of T-activin and α -tocopherol alone and together on lipid peroxidation (LPO) and carbohydrate metabolism are studied in rats with streptozotocin diabetes (male rats, $n=102$).

Antioxidative activity of T-activin is compatible to that of α -tocopherol. The antioxidative effect of combined therapy with both agents is more expressed than of monotherapy. T-activin normalized LPO and glycaemic values and increased blood plasma insulin level, which can be regarded as the onset of reparative regeneration of insulin-producing cells; α -tocopherol did not notably increase the level of insulin or normalize blood glucose level.

Thus, T-activin is characterized by a wider spectrum of therapeutic effects in experimental diabetes than α -tocopherol.

Сформированная в настоящее время концепция инсулинзависимого сахарного диабета (ИЗСД) как органоспецифического аутоиммунного заболевания выдвигает задачу разработки методов патогенетической терапии, направленной на блокаду (сдерживание) иммунной агрессии против β -клеток поджелудочной железы и развития абсолютной инсулиновой недостаточности [1—3, 8, 9, 11].

В механизмах инициации, а также в дальнейшем поддержании прогрессирующей деструкции β -клеток поджелудочной железы существенное значение имеет активация процессов свободнорадикального окисления, в том числе перекисное окисление липидов (ПОЛ), возникающее в результате действия средовых (триггерных) факторов (вирусы, химические вещества, цитокины), с последующим появлением "новых" чужеродных

антигенов и иммунной атакой инсулинпродуцирующих клеток [1—3, 12]. Повышенная чувствительность β -клеток поджелудочной железы к токсическому действию свободных радикалов (O_2 , OH^- , NO^-) предопределяется слабостью систем антиоксидантной защиты инсулинпродуцирующих клеток [9, 12].

Следует отметить, что традиционная терапия ИЗСД (заместительная инсулинотерапия, диетотерапия, рациональная физическая нагрузка) не может в полной мере устранить названные нарушения, ведущие в конечном итоге к полной гибели β -клеток поджелудочной железы [2, 3, 12]. На основании вышесказанного в патогенетической терапии ИЗСД ведутся разработка и оценка эффективности двух направлений: антиоксидантной тера-