

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-092.9-07:616.432+616.681]-008.6

В. Н. Бабицев, Т. А. Перишкова, Е. И. Адамская

СОСТОЯНИЕ ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У САМЦОВ КРЫС ПРИ ДИАБЕТЕ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Лаборатория физиологии эндокринной системы (зав.— проф. В. Н. Бабицев) Института экспериментальной эндокринологии (дир.— член-корр. РАМН И. Г. Акмаев) Эндокринологического научного центра (дир.— член-корр. РАМН И. И. Дедов), Москва

Известно, что при диабете нарушается нейро-эндокринная регуляция репродуктивной функции у самцов крыс, однако единого мнения относительно уровня, на котором происходят эти изменения, до сих пор нет. Данные литературы, касающиеся секреции гонадотропинов, весьма противоречивы: показан сниженный [20] или неменяющийся [8] уровень циркулирующих гонадотропинов в крови. Большинство исследователей единодушны в том, что у больных диабетом наблюдается сниженный уровень андрогенов [9, 20], что свидетельствует о нарушении механизма отрицательной обратной связи. Локусом для сниженной чувствительности к андрогенам у таких животных может быть как гипоталамус, так и гипофиз.

В своей предыдущей работе мы изучали нарушение отрицательной обратной связи на уровне медиобазального гипоталамуса (МБГ) и не обнаружили изменений в концентрации ядерных рецепторов андрогенов в этой области. Поскольку действие половых стероидов на секрецию гонадотропинов опосредуется через специфические рецепторы, то на уровне гипоталамуса этот механизм, по-видимому, остается неповрежденным.

В связи с этим в настоящей работе было изучено состояние гипофизарно-гонадальной системы у самцов крыс с экспериментальным диабетом. Для этого проводили анализ чувствительности гипофиза к люлиберину (ЛГ-РГ) и определяли концентрацию ядерных рецепторов половых гормонов в аденогипофизе, участвующих в регуляции

секреции гонадотропинов по механизму отрицательной обратной связи, у самцов крыс с экспериментальным диабетом, вызванным введением стрептозотоцина (СТЗ).

Материалы и методы

Использовали беспородных половозрелых самцов крыс массой тела 160—190 г, которых содержали в условиях контролируемого температурного режима (22—25 °С) и освещенности (свет с 7 до 19 ч). Интактные животные, получавшие СТЗ, и самцы с экспериментальным диабетом, которым была проведена заместительная терапия инсулином, содержались на стандартной диете, без ограничения потребления пищи и воды.

Диабет вызывали однократным введением внутривенно СТЗ в дозе 60 мг на 1 кг массы тела в 0,2 мл цитратного буфера pH 4,5. В опыт брали животных, у которых концентрация глюкозы в цельной крови составляла не менее 12 ммоль/л (при уровне у контрольных самцов 3 ммоль/л). Животных забивали и брали материал для исследования на 14-й день эксперимента. У части животных, получавших СТЗ, проводили заместительную терапию инсулином. Пролонгированный препарат инсулина (цинк-инсулин, суспензия) вводили внутримышечно 1 раз в сутки начиная с 14-го дня после введения СТЗ в течение 14 дней. Дозу инсулина подбирали индивидуально до нормализации содержания глюкозы в крови и моче. Концентрацию глюкозы определяли ежедневно глюкозооксидационным методом на глюкозиметре «Эксан» и выражали в миллимолях на 1 л. В среднем доза инсулина для 1 животного составляла 16 ЕД на 1 инъекцию.

Животных декапитировали в 9 ч. В одной серии опытов извлеченные гипофизы делили на 2 половинки и по 2 половинки разных гипофизов после взвешивания помещали в инкубационные флаконы с 1 мл среды 199, насыщенной в атмосфере 95 % O₂+5 % CO₂ [16]. Инкубацию проводили при 37 °С при постоянном встряхивании. После 30 мин среду меняли на свежую и добавляли ЛГ-РГ в дозе 50 нг/мл. Аликвоты по 25 мкл брали каждый час, замораживали до определения ЛГ и ФСГ.

В другой серии опытов аденогипофизы от 45 животных обрабатывали, как описано ранее [1], для получения ядерной фракции. В качестве меченых гормонов использовали 1,2,6,7-³H-тестостерон (³H-Т) и 2,4,6,7-³H-эстрадиол (³H-Э₂) с высокой удельной активностью (85—104 Ки/ммоль). Условия инкубирования меченых стероидов и методика расчета числа специфических связывающих мест были такими же, как в ранее опубликованной работе [3]. Количество связывающих мест в ядрах рассчитывали в фемтомолях на 1 мг ДНК.

В сыворотке крови измеряли содержание ЛГ и ФСГ радиоиммунологическим методом с использованием наборов NIDDK (США). Концентрацию гормонов выражали в нанограммах NIDDK-rLH-RP-3 и NIDDK-rFSH-RP-2 соответственно на 1 мл сыворотки крови. У всех групп животных в крови определяли содержание тестостерона (Т) и эстрадиола (Э) наборами для радиоиммунологического анализа стероидов-Т-1²⁵ (Минск) и ESTR-Direct («Cea-Sorin», Франция). Концентрацию гормонов выражали в нанограммах и пикограммах на 1 мл сыворотки крови соответственно.

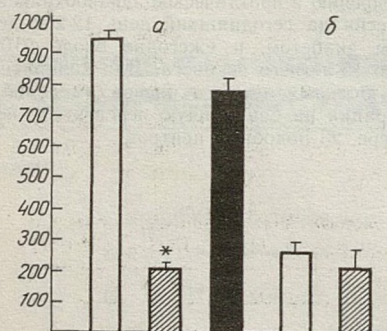


Рис. 1. Концентрация рецепторов Т (а) и Э₂ (б) в гипофизе контрольных самцов крыс (светлые столбики), самцов, получавших СТЗ (заштрихованные столбики) или СТЗ+инсулин (темные столбики).

По вертикали — связанный ³H-гормон в ядерной фракции (в фмоль на 1 мг ДНК). Звездочка — $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой

Результаты и их обсуждение

Введение СТЗ вызывало достоверное снижение концентрации ядерных рецепторов Т в гипофизе самцов крыс (рис. 1). При этом не было различий в числе ядерных Э₂-связывающих мест в аденогипофизе контрольных и получавших СТЗ животных. У СТЗ-индуцированных самцов крыс, получавших инсулин, концентрация ядерных рецепторов андрогенов в гипофизе приближалась к таковой у контрольных животных.

Уровень ЛГ и ФСГ в крови крыс, больных диабетом, не отличался от такового у интактных животных (см. таблицу). В экспериментальной группе концентрация Т была снижена, а Э₂ — повышена. При компенсаторной терапии инсулином уровень половых гормонов в крови приближался к норме.

В опытах *in vitro* по определению чувствительности гонадотрофов аденогипофиза к ЛГ-РГ было показано, что развитие диабета у крыс не влияет на уровень базальной секреции ЛГ в течение всего периода инкубации (рис. 2). Однако ответная реакция на ЛГ-РГ в группе экспериментальных животных наступала в более ранние сроки: увеличение концентрации ЛГ после добавления ЛГ-РГ наблюдали через 1 ч инкубации, хотя по абсолютным значениям это увеличение незначительно отличалось от такового в контрольной группе. Максимальный ответ на ЛГ-РГ был зарегистрирован у контрольных крыс через 3 ч инкубации, тогда как скорость секреции ЛГ у экспериментальных животных не отличалась от базальной.

Таким образом, уровень Т в сыворотке крови снижен у самцов, получавших СТЗ, что согласуется с результатами других авторов [9, 20]. В отношении базального уровня гонадотропинов в крови данные литературы весьма противоречивы. В большинстве работ показано, что уровень ЛГ и ФСГ в крови снижался [9, 20, 21], не изменялся [8, 12], как и в нашем исследовании, или даже повышался [5]. Такое противоречие могло быть обусловлено различиями в линиях крыс и в продолжительности влияния диабета на гипоталамо-гипофизарную систему.

Следовательно, независимо от изменений секреции гонадотропинов уровень циркулирующего Т был снижен у животных с экспериментально вызванным диабетом так же, как у крыс со спонтанным диабетом [17], что предполагает нарушение в отрицательном действии Т на гипоталамо-гипофизарном уровне. В работе [8] показано, что у самцов крыс, получавших СТЗ, изменяется

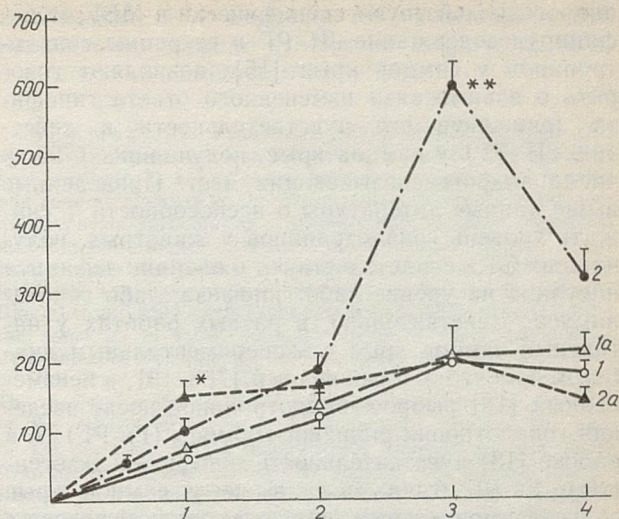


Рис. 2. Концентрация ЛГ в среде при инкубации аденогипофизов интактных и получавших СТЗ (а) самцов крыс (базальная — 1, 1а и при нагрузке ЛГ-РГ — 2, 2а).

По оси ординат — содержание ЛГ в среде (в нг на 1 мг гипофиза); по оси абсцисс — время инкубации (в ч). Одна звездочка — $p < 0,05$ при сравнении групп 1а и 2а; две звездочки — $p < 0,001$ при сравнении групп 1 и 2.

механизм обратной связи, что выражается в ограниченной способности этих животных отвечать на гонадэктомию. После кастрации у таких самцов не наблюдалось увеличения уровня ЛГ в крови. По данным F. Jackson и J. Hutson [14], Т эффективно снижал уровень ЛГ и ФСГ у контрольных животных, а самцы, получавшие СТЗ, не отвечали на введение Т снижением секреции гонадотропинов или поддержанием нормальной массы добавочных половых желез. Неспособность Т ингибировать освобождение гонадотропинов или стимулировать рост половых аксессуарных органов у крыс, получавших СТЗ, может указывать на то, что первичная причина дисфункции репродуктивной системы у самцов крыс с экспериментальным диабетом связана с изменением действия или доступностью андрогенов на уровне тканей-мишеней.

Результаты наших экспериментов показали, что уровень ЛГ и ФСГ в крови оставался неизменным на фоне сниженной концентрации рецепторов андрогенов в гипофизе, что свидетельствует о нарушении механизма отрицательной обратной связи между гонадами и гипофизом. J. Calvo и соавт. [8] также отмечали снижение, но только уровня цитоплазматических рецепторов Т в гипофизе самцов крыс, получавших СТЗ.

Имеющиеся в литературе данные о том, что

Содержание ЛГ, ФСГ, Т и Э₂ в сыворотке крови у контрольных (К) животных, самцов, получавших СТЗ, и СТЗ-индуцированных животных, получавших инсулин (СТЗ+ИНС) ($M \pm m$)

Группа крыс	ЛГ, нг/мл	ФСГ, нг/мл	Т, нг/мл	Э ₂ , пг/мл
К	$0,66 \pm 0,09$ (7)	$9,53 \pm 1,30$ (6)	$2,80 \pm 0,31$ (10)	$6,66 \pm 1,00$ (9)
СТЗ	$1,00 \pm 0,14$ (9)	$9,45 \pm 1,27$ (11)	$1,52 \pm 0,32^*$ (9)	$26,83 \pm 3,68^{**}$ (9)
СТЗ+ИНС	$1,07 \pm 0,17$ (5)	$8,46 \pm 0,53$ (5)	$2,36 \pm 0,52$ (9)	$7,19 \pm 1,20$ (7)

Примечание. В скобках — число животных. Достоверность различий с контрольной группой: одна звездочка — $p < 0,01$, две — $p < 0,001$.

андрогены действуют специфически в МБГ, модифицируя содержание ЛГ-РГ и секрецию гонадотропинов у самцов крыс [15], позволяют говорить о взаимосвязи измененного ответа гипофиза (снижение его чувствительности к действию ЛГ-РГ) у самцов крыс, получавших СТЗ, и числа андрогенсвязывающих мест. Приведенные выше данные литературы о неспособности Т снижать уровень гонадотропинов у животных, получавших СТЗ, свидетельствуют о влиянии дефицита инсулина на уровне либо гипофиза, либо гипоталамуса. Действительно, в разных работах у интактных самцов крыс с экспериментальным диабетом отмечался и сниженный [7, 8, 19], и неизменный [18] выброс гонадотропинов после введения гонадотропин-рилизинг-гормона (Гн-РГ). А в работе [13] чувствительность гипофиза к экзогенному Гн-РГ была даже выше у самцов крыс с экспериментальным диабетом по сравнению с контрольными животными. Следует отметить, что повышенную или нормальную чувствительность гипофиза определяли в опытах либо *in vivo*, либо *in vitro*, в которых продолжительность воздействия экзогенного Гн-РГ была кратковременной.

Так как Т посредством своих специфических рецепторов оказывает влияние по механизму отрицательной обратной связи на уровне как гипоталамуса, так и гипофиза, то нарушение этого механизма у самцов крыс, получавших СТЗ, может осуществляться на обоих уровнях. Однако в своей предыдущей работе мы не обнаружили у самцов крыс с экспериментальным диабетом изменений в числе ядерных Т-связывающих мест в МБГ, ответственном за функционирование данного механизма, по сравнению с контрольными животными.

Наши эксперименты *in vitro*, в которых были использованы гипофизы самцов крыс, получавших СТЗ, представляют прямое доказательство, что ответ гипофиза на физиологическую концентрацию ЛГ-РГ снижен у этих животных. Это может быть связано с нарушением down регуляции рецепторов ЛГ-РГ в гипофизе как процесса, зависящего от повышенной секреции ЛГ-РГ. Например, в работе [6] выявлено снижение уровня рецепторов Гн-РГ и белкового синтеза при нарушении углеводного обмена у крыс, голодавших в течение 4—6 дней.

Следовательно, полученные данные о снижении уровня ядерных рецепторов андрогенов в аденогипофизе и снижении его чувствительности к ЛГ-РГ дают основание предположить, что дисфункция гипофиза может быть основной причиной, изменяющей нейроэндокринную регуляцию репродуктивной функции у самцов крыс с экспериментальным диабетом.

Еще одним доказательством непосредственного влияния инсулина на регуляцию освобождения гонадотропинов из гипофиза могут служить данные Е. Adashi и соавт. [4]. Авторы показали, что обработка инсулином первичной культуры аденогипофизарных клеток проводила к дозозависимому увеличению освобождения ЛГ и ФСГ, стимулированного Гн-РГ. При этом влияние инсулина не зависело от концентрации глюкозы и было специфическим: эпидермальный фактор роста или фактор роста фибробластов не повышал выброс ЛГ.

В настоящей работе концентрация ядерных рецепторов эстрогенов в гипофизе самцов крыс с экспериментально индуцированным диабетом не

отличалась от таковой в гипофизе контрольных животных. Ранее [2] мы обнаружили, что ингибирующее действие E_2 на секрецию ЛГ у самцов крыс не опосредуется через эстрогенные рецепторы аденогипофиза и они, по-видимому, не играют физиологической роли в процессах регуляции.

Хотя и маловероятно, но не исключена возможность, что наблюдаемые различия в концентрации Т в крови и ядерных рецепторов андрогенов в гипофизе между контрольными и получавшими СТЗ крысами могли быть следствием прямого повреждающего действия СТЗ, а не диабета, вызванного введением этого препарата. Однако против такого предположения свидетельствуют данные, что после заместительной терапии инсулином уровень Т в крови и число Т-связывающих мест в гипофизе достигали контрольных значений.

Возможно, что снижение числа связывающих мест для гормонов репродуктивной системы может быть общим явлением, так как некоторые авторы показали подобное снижение ЛГ-связывающих мест в клетках Лейдига у получавших СТЗ крыс [10], Т-связывающих мест в предстательной железе [21] и E_2 -связывающих мест в аденогипофизе и гипоталамусе самок крыс [11].

В заключение можно констатировать, что изменение механизма регуляции функции гипоталамо-гипофизарно-гонадальной системы при экспериментальном диабете связано с нарушениями гипофизарного звена, включающими снижение ЛГ-РГ-стимулированного освобождения гонадотропинов и уровня рецепторов Т, что приводит к ослаблению контроля репродуктивной функции по принципу отрицательной обратной связи.

Выводы

1. Уровень ЛГ и ФСГ в крови самцов крыс не изменялся при развитии экспериментального диабета, концентрация Т снижалась.
2. Чувствительность гипофиза к ЛГ-РГ у крыс, получавших СТЗ, резко снижалась при его инкубации более 1 ч.
3. При развитии экспериментального диабета наблюдали снижение концентрации ядерных рецепторов Т в аденогипофизе.
4. Изменения концентрации гормонов в крови и уровня андрогенных рецепторов в гипофизе крыс, получавших СТЗ, восстанавливались при заместительной инсулинотерапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабичев В. Н., Перышкова Т. А., Озоль Л. Ю. // Пробл. эндокринол.— 1983.— № 6.— С. 46—51.
2. Бабичев В. Н., Перышкова Т. А. // Бюл. exper. биол.— 1987.— № 2.— С. 210—211.
3. Перышкова Т. А., Бабичев В. Н. // Пробл. эндокринол.— 1989.— № 6.— С. 41—44.
4. Adashi E. Y., Hsueh A. J. W., Yen S. S. C. // Endocrinology.— 1981.— Vol. 108.— P. 1441—1449.
5. Anderson J. F., Jones D., Penner S. B. et al. // Diabetes.— 1987.— Vol. 36.— P. 1104—1110.
6. Bergendahl M., Perheentupa A., Huhtaniemi J. // J. Endocr.— 1989.— Vol. 121.— P. 409—417.
7. Bestetti G., Locatelli V., Tirone F. et al. // Endocrinology.— 1985.— Vol. 117.— P. 208—216.
8. Calvo J. C., Baranao J. L., Tesone M. et al. // J. Steroid Biochem.— 1984.— Vol. 20.— P. 769—772.

9. Chandrashekar V., Steger R. W., Bartke A. // *Neuroendocrinology*.— 1991.— Vol. 54.— P. 30—36.
10. Charreau E. H., Calvo J. C., Tesone M. et al. // *J. biol. Chem.*— 1978.— Vol. 253.— P. 2504—2506.
11. Dudley S. D., Ramirez I., Wade G. N. // *Neuroendocrinology*.— 1981.— Vol. 33.— P. 7—11.
12. Howland B. E., Zebrowsky E. J. // *Horm. Metab. Res.*— 1978.— Vol. 8.— P. 465—469.
13. Howland B. E., Zebrowsky E. J. // *Experientia*.— 1980.— Vol. 36.— P. 610—611.
14. Jackson F. L., Hutson J. C. // *Diabetes*.— 1984.— Vol. 33.— P. 819—824.
15. Kalra P. S., Kalra S. P. // *Endocrinology*.— 1980.— Vol. 106.— P. 390—397.
16. de Koning J., Tijssen A. M. I., van Rees G. P. // *J. Endocr.*— 1989.— Vol. 120.— P. 439—447.
17. Murray F. T., Cameron D. F., Orth J. M. et al. // *Horm. Metab. Res.*— 1985.— Vol. 17.— P. 495—501.
18. Paz G. F., Homonnai Z. T., Drasnin N. et al. // *Andrologia*.— 1978.— Vol. 10.— P. 27—34.
19. Seethalakshimi L., Menon M., Diamond D. // *J. Urol. (Baltimore)*.— 1987.— Vol. 138.— P. 190—194.
20. Steger R. W., Amador A., Lam E. et al. // *Endocrinology*.— 1989.— Vol. 124.— P. 1737—1743.
21. Tesone M., Martins de Oliveira-Filho R., Biella de Souza Valle L. et al. // *Diabetologia*.— 1980.— Vol. 18.— P. 385—390.

Поступила 26.03.92

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1993

УДК 616.379-008.64-092.9-07:616.831.41-008.6

Ю. М. Колесник, Ю. Н. Орестенко, А. В. Абрамов

СОСТОЯНИЕ ВАЗОПРЕССИН-, ОКСИТОЦИН- И КОРТИКОЛИБЕРИНСИНТЕЗИРУЮЩИХ СТРУКТУР ГИПОТАЛАМУСА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ У КРЫС РАЗЛИЧНОГО ПОЛА

Кафедра патофизиологии (зав.— проф. Ю. Н. Орестенко) Запорожского медицинского института Минздрава Украины

Применение современных методов исследования позволило установить, что основным местом синтеза кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ) является медиальное мелкоклеточное (ММ) субъядро паравентрикулярного ядра гипоталамуса (ПВЯГ), на долю которого приходится более 80 % всей продукции гормона [5]. Вазопрессинсинтезирующие структуры представлены прежде всего супраоптическим ядром гипоталамуса (СОЯГ) и латеральным крупноклеточным (ЛК) субъядром ПВЯГ, а окситоцинсинтезирующие — передним и медиальным крупноклеточными (ПК и МК соответственно) субъядрами ПВЯГ, а также нейросекреторными клетками СОЯГ [18, 19]. В последнее время появляется все больше работ, показывающих важную роль вазопрессина, окситоцина и КРГ в регуляции углеводного обмена, секреции инсулина, глюкагона и соматостатина [2, 8, 13, 21], пищевого поведения [6, 17], а следовательно, в патогенезе сахарного диабета. Исходя из этого, целью настоящего исследования было комплексное изучение состояния вазопрессин-, окситоцин- и КРГ-синтезирующих структур гипоталамуса и эндокринной части поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете.

Материалы и методы

Исследование проведено на 60 крысах линии Вистар обоего пола, находившихся на стандартном пищевом рационе в условиях естественной оснащенности. Все животные были разделены на 2 экспериментальные группы: 1-я — интакт-

V. N. Babichev, T. A. Peryshkova, Ye. I. Adamskaya — THE HYPOPHYSOEGONADAL SYSTEM OF MALE RATS WITH DIABETES: AN EXPERIMENTAL STUDY

Summary. The hypophyseogonadal system of male rats with streptozotocin-induced diabetes was studied. The hypophyseal sensitivity to LH releasing hormone was analyzed *in vitro* and concentrations of sex hormone nuclear receptors, in the adenohypophysis, participating in gonadotropin secretion regulation according to a negative feedback mechanism, measured. Streptozotocin injection reduced blood testosterone concentration and levels of androgen nuclear receptors in the rat hypophysis. Blood LH and FSH levels in the rats with diabetes were virtually the same as in intact animals. *In vitro* experiments have demonstrated that diabetes development in rats did not influence the level of LH basal secretion by the hypophysis. The maximal response to LH releasing hormone was recorded in the control males in 3 h incubation, whereas the rate of LH secretion in the experimental animals did not differ from the normal one. The authors suggest that changed mechanism of the hypothalamo-hypophyseogonadal system regulation in experimental diabetes is related to the hypophyseal disorders, involving reduction of the LH-RH-stimulated gonadotropin release and of the testosterone receptor levels, this resulting in poor reproductive function control according to the negative feedback principle.

ные животные (контроль), 2-я — животные, у которых сахарный диабет моделировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг или подкожным введением суспензии букарбана в дозе 6 г/кг (решение о выдаче авторского свидетельства от 23.10.91 по заявке № 4910365/14 от 12.02.91).

Для характеристики состояния эндокринной части поджелудочной железы в крови радиоиммунологическим методом определяли инсулин (РИО-ИНС-¹³¹I, СССР), глюкагон (Biodata, Италия) и соматостатин (Incstar, США), а на гистологических срезах толщиной 4 мкм проводили количественное иммуноцитохимическое определение этих же гормонов наборами фирмы «Amersham» (Англия) в β , α и Δ -клетках островков Лангерганса методом непрямой иммунофлюоресценции. Концентрацию глюкозы в периферической крови определяли ортотолуидиновым методом и кроме того проводили тест на толерантность к глюкозе (глюкоза 4 г/кг внутрибрюшинно).

О состоянии КРГ- и вазопрессинсинтезирующих нейронов гипоталамуса судили по морфометрическим (объемы клеток, их цитоплазмы, ядер и ядрышек), гистохимическим (содержание РНК, определяемое цитофотометрически на срезах, окрашенных по Эйнарсону галлоцианин-хромовыми квасцами) показателям, а также по концентрации этих гормонов в периферической крови, определяемой радиоиммунологическим методом с помощью наборов «Peninsula laboratories Inc.» (США) и «Bühlmann laboratories» (Швейцария). Кроме того, в периферической крови определяли концентрацию АКТГ (CIS International, Франция) и кортизола («Стерон-К-¹³¹I-М», СССР). Для характеристики окситоцинсинтезирующих нейронов дополнительно проводили иммуноцитохимическое выявление окситоцина в нейронах ПВЯГ и СОЯГ, а также в срединном возвышении гипоталамуса на срезах толщиной 10 мкм методом непрямой иммунофлюоресценции. Для взятия крови, извлечения мозга и поджелудочных желез животных через 2 и 5 нед после введения диабетогенных препаратов декалтировали, после чего органы