

Серьезного внимания заслуживают вопросы контрацепции у больных ПЮД. При этом заболевании как мальчики, так и девочки в связи с ускоренным половым созреванием проявляют склонность к ранней половой жизни. Врач должен объяснить родителям, что такое поведение детей обусловлено физиологическими (гормональными) особенностями организма подростков при ПЮД. Практика показала, что ранние браки у таких больных чаще всего являются прочными. Родители должны понимать, что в этих условиях правильнее оказать психологическую поддержку подростку, а не наносить психическую травму, руководствуясь соображениями общепринятой морали. Тем не менее ранние беременности девочкам, страдающим ПЮД, несмотря на кажущуюся «зрелость», противопоказаны; аборт недопустим (и так реально угроза эндокринного бесплодия). Врач и родители должны помочь в выборе средств контрацепции. Из-за поражения гипоталамуса гормональные контрацептивы им вредны; внутриматочные методы усиливают имеющуюся у многих из них гиперпролактинемия. Рекомендуется рекомендовать механические способы контрацепции.

Выполнение всех вышеизложенных рекомендаций может обеспечить полную реабилитацию больных ПЮД.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Вербовая Н. И., Лоткова Е. А. // Пробл. эндокринологии.— 1985.— Т. 30, № 3.— С. 22—26.
Дворяшина И. В., Малыгина Е. В. // Там же.— 1993.— Т. 39, № 3.— С. 35—37.
Каюшева И. В. // Сов. мед.— 1987.— № 8.— С. 19—22.
Тереженко И. В. Гипоталамический пубертатный синдром: (Этиология, патогенез, принципы терапии, диспансеризация): Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— М., 1987.
Тереженко И. В. Эндокринные расстройства у юношей и девушек в пубертатном периоде.— М., 1991.
Molnar D. // Klin. Padiat.— 1990.— Bd 202, N 3.— S. 131—134.

Поступила 29.09.93

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994

УДК 616.379-008.64-07:616.153.915-391-092.9

А. В. Ситожевский, И. В. Луста, А. В. Трофимов, В. В. Иванов, О. А. Карпенко

СЕКРЕЦИЯ ИНСУЛИНА ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗОЙ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ПРООКСИДАНТОВ; СВЯЗЬ С ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ ГЛУТАТИОНА

Кафедра биохимии (зав.— проф. Т. С. Федорова) Сибирского медицинского университета, Томск

Клинические наблюдения свидетельствуют, что в крови больных сахарным диабетом наблюдается повышенное содержание продуктов липидной пероксидации и снижение уровня восстановленного глутатиона (GSH) [1, 6]. Система глутатиона поддерживает в восстановленном состоянии поверхностные SH-группы мембранных белков, которые участвуют в стимулсекреторном сопряжении и определяют чувствительность β -клеток к действию глюкозы и других секретогенов [4]. Глутатион, весьма лабильный фактор механизма секреции инсулина, также входит в систему антиперекисной защиты клетки и на фоне низкого антиоксидантного потенциала β -клеток является наиболее уязвимой мишенью действия продуктов липидной пероксидации [2, 9]. Можно предполагать, что изменение тиол-дисульфидного равновесия является одним из механизмов снижения чувствительности β -клеток к действию основных секретогенов при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ).

В связи с этим исследовались секреция инсулина и высвобождение глутатиона изолированной поджелудочной железой в условиях активации ПОЛ, вызванной инфузией прооксидантов.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на крысах-самцах Вистар массой 280—320 г, содержащихся на стандартной диете. Подготовка препарата изолированной поджелудочной железы проводили по методу [10]: у подвергнутого наркозу (уретан

в дозе 1 г на 1 кг массы тела) животного выделяли поджелудочную железу в едином органокомплексе с участком двенадцатиперстной кишки. Изолированный препарат поджелудочной железы помещали на термостатированную платформу (37 °С) и включали в систему перфузии без рециркуляции. Аfferентную и эfferентную канюли вводили в а. celiacus и v. porta соответственно и в течение 20 мин проводили уравновешивающую перфузию поджелудочной железы Krebs—Рингер-бикарбонатным буферным раствором (рН 7,35), содержащим декстран Т-40 (4%). Раствор насыщали карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂). Скорость перфузии составляла 4 мл/мин при перфузионном давлении 30—35 мм рт. ст. Секрцию инсулина исследовали при концентрациях глюкозы 4,5 и 16,7 мМ. Введение реагентов в перфузирующий раствор проводили микродозатором в аfferентную канюлю со скоростью 20 мкл/мин. Жизнеспособность препарата оценивали по скорости секреции инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой и уровню сократительной активности двенадцатиперстной кишки [10]. Концентрацию инсулина в перфузате определяли радиоиммунологическим методом с применением набора рино-ИНС-ПГ-¹²⁵I с модификациями. Островки Лангерганса выделяли по методу [13] с модификациями, предложенными М. И. Пигаревой и соавт. [3]. Инкубацию островков проводили в насыщенном карбогеном Krebs—Рингер-бикарбонатном буфере с добавлением 0,1% бычьего сывороточного альбумина (V фракция). ПОЛ активировали инфузией смеси прооксидантов: гидроперекиси трет-бутила и раствора FeSO₄ в конечных концентрациях 10⁻⁴ М. Содержание ТБК-активных продуктов в поджелудочной железе регистрировали по интенсивности поглощения при длине волны 535 нм [14], а в островках Лангерганса — по флуоресценции триметинового комплекса (максимум возбуждения 515 нм, максимум флуоресценции 553 нм) [15]. Определение глутатиона в островках Лангерганса и перфузате проводили, измеряя флуоресценцию комплекса GSH и орто-фталового альдегида при длинах волн возбуждения и флуоресценции 350 и 420 нм соответственно [12]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни в стандартном пакете Statgraf на IBM PC.

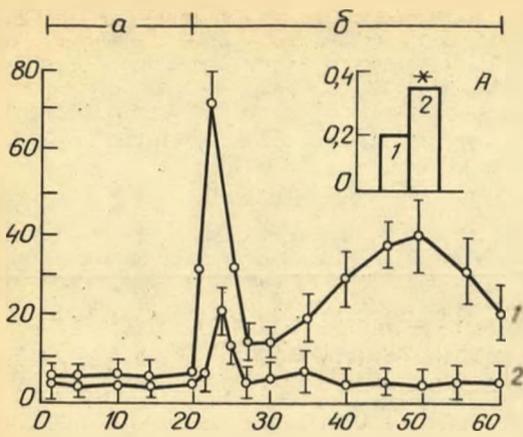


Рис. 1. Глюкозостимулированная секреция инсулина (в нг на 1 г ткани в 1 мин) изолированной поджелудочной железой крысы.

1 — контроль; 2 — после переперфузии прооксидантами (гидроперекись трет-бутила и Fe^{2+} , 10^{-4} М).
 А — содержание ТБК-активных продуктов (в ед. ОД₅₅₀) в поджелудочной железе через 60 мин перфузии:
 1 — контроль; 2 — после 20 мин переперфузии прооксидантами.
 Звездочка — изменение достоверно при сравнении с контролем $p < 0,05$.
 Здесь и на рис. 2: интервал а — 4,5 мМ глюкозы, интервал б — 16,7 мМ глюкозы в перфузионной среде; по оси абсцисс — время перфузии (в мин).

Результаты и их обсуждение

Перфузия препарата поджелудочной железы раствором, содержащим 4,5 мМ глюкозы, сопровождалась низким уровнем секреции инсулина — ~1 нг на 1 г ткани в 1 мин. Увеличение концентрации глюкозы до 16,7 мМ приводило к быстрому возрастанию секреции гормона до 70 нг на 1 г ткани и в 1 мин (рис. 1). При этом в процессе секреции явно выражены две фазы: быстрый выброс инсулина начинался сразу в ответ на добавление 16,7 мМ глюкозы, достигал максимума через 2—3 мин; фаза медленного увеличения секреции начиналась с 10—16-й минуты, максимальная скорость (40 нг на 1 г ткани в 1 мин) отмечалась через 20—30 мин. Такая динамика секреции объясняется тем, что в первую фазу секретруется готовый инсулин, тогда как во вторую выделяется гормон, синтезированный *de novo* [8].

В сложном процессе секреции инсулина важную роль играют мембранные SH-группы, редокс-состояние которых тесно связано с обменом глутатиона — основного внутриклеточного тиола островков Лангерганса [4].

Скорость высвобождения изолированной поджелудочной железой GSH при концентрации глюкозы 4,5 мМ в перфузирующем растворе составляла 5 нмоль на 1 г ткани в 1 мин, а окисленного (GSSG) — около 3 нмоль на 1 г ткани в 1 мин (рис. 2, I). Повышение концентрации глюкозы до 16,7 мМ приводило к резкому выбросу GSH и GSSG, совпадавшему по времени с первой фазой секреции инсулина. Наибольшее внимание привлекает значительное увеличение скорости высвобождения GSSG в ответ на действие секретогена. Данные о влиянии *p*-хлормеркурийбензоата и дитиотриетолола на глюкозоиндуцированную секрецию инсулина позволяют предположить, что при действии глюкозы на β -клетки происходят быстрые изменения редокс-состояния мембранных тиолов [11]. Окисление SH-групп мембранных белков и их последующее восстановление глутатионом может приводить к выбросу GSSG β -клетками. С другой стороны, высвобождение GSH поджелудочной железой и его включение в пул плазменного глутатиона также может быть одним из физиологических механизмов, поддерживающих мембранные SH-группы в восстановленном состоянии и модулирующих чувствительность β -клеток к действию глюкозы [5]. По-видимому, соотношение скоростей выхода GSSG и GSH из β -клеток отражает изменение редокс-состояния мембранных тиолов, вовлеченных в SH-зависимые механизмы стимулсекреторного сопряжения.

Добавление прооксидантов (гидроперекись трет-бутила и ионы Fe^{2+}) в конечной концентрации 10^{-4} М приводило к активации ПОЛ, о чем свидетельствовало почти двукратное увеличение содержания ТБК-активных продуктов в поджелудочной железе (см. рис. 1). Базальная секреция инсулина в этих условиях заметно не изменялась, однако скорость глюкозостимулированной секреции значительно уменьшалась как в первую, так и во вторую фазу выделения гормона. В присутствии прооксидантов наблюдалось значительное снижение скорости выхода GSH и, как следствие, инверсия отношения GSH/GSSG (рис. 2, II). Добавление глюкозы в концентрации 16,7 мМ после переперфузии прооксидантами приводило к быстрому выбросу GSH и GSSG, однако увеличение скорости высвобождения GSSG было менее выра-

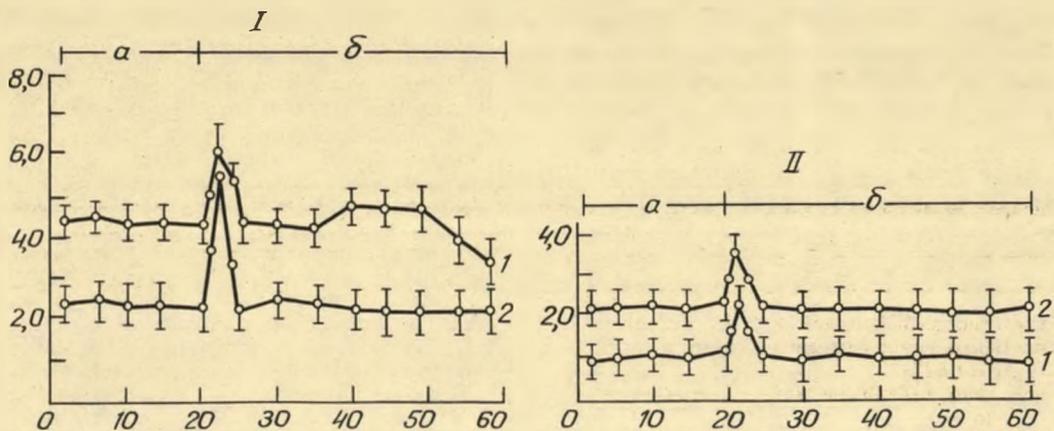


Рис. 2. Высвобождение GSH (1) и GSSG (2) (в нмоль на 1 г ткани в 1 мин) изолированной поджелудочной железой в ответ на добавление глюкозы (I) и после 20 мин переперфузии прооксидантами (II).

Влияние гидроперекиси трет-бутила и Fe^{2+} (10^{-4} М) на содержание глутатиона и ТБК-активных продуктов в изолированных островках Лангерганса ($n=10$; $p<0,05$)

Условие опыта	ТБК-активные продукты, ед. фл.	GSH	GSSG	GSH/GSSG
		пмоль на 100 островков		
Контроль	142±26	725±80	363±42	2,0
Прооксиданты	553±94	573±56	597±56	0,96

жено по сравнению с изменением этого параметра в ответ на глюкозный стимул в отсутствие прооксидантов. Известно, что активация ПОЛ приводит к снижению уровня GSH и повышению уровня GSSG в клетках [7]. Нами обнаружено снижение выброса GSH перфузируемой поджелудочной железой при действии прооксидантов, указывающее на возможное уменьшение его содержания в β -клетках островков Лангерганса. Действительно, преинкубация изолированных островков Лангерганса с гидроперекисью трет-бутила и Fe^{2+} (10^{-4} М) приводила к активации ПОЛ, снижению содержания GSH и увеличению количества GSSG (см. таблицу). Эти изменения отражают участие системы глутатиона в восстановлении SH-групп, окисляющихся в присутствии Fe^{2+} и гидроперекисей [1, 7]. В меньшей степени, по-видимому, увеличение содержания GSSG связано с функционированием глутатионпероксидазы, активность которой довольно низка в эндокринной ткани поджелудочной железы [9]. В то же время мы не наблюдали увеличения выброса GSSG перфузируемой поджелудочной железой, что может являться следствием конкурентного ингибирования транспортной системы глутатиона смешанными дисульфидами, образование которых увеличивается при повышении концентрации GSSG [7].

Таким образом, активация ПОЛ сопровождается уменьшением содержания GSH, увеличением доли GSSG в островках Лангерганса и с течением времени может приводить к истощению пула внутриклеточного GSH и снижению редокс-потенциала SH-групп мембранных белков. Уменьшение числа мембранных SH-групп, способных включаться в механизм стимулсекреторного сопряжения, снижает чувствительность β -клеток к действию секретогена, что проявляется в подавлении стимулированной глюкозой секреции инсулина.

Выводы

1. Перфузия поджелудочной железы раствором с высокой концентрацией глюкозы сопро-

вождается увеличением скорости высвобождения GSH и GSSG. Выброс глутатиона совпадает по времени с первой фазой секреции инсулина.

2. Активация ПОЛ приводит к подавлению глюкозостимулированной секреции инсулина изолированной поджелудочной железой.

3. При действии прооксидантов обнаружено уменьшение отношения GSH/GSSG в изолированных островках Лангерганса и снижение скорости высвобождения GSSG и GSH перфузируемой поджелудочной железой в ответ на глюкозный стимул.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Горельшева В. А., Романовская Г. А. // Пробл. эндокринологии.— 1992.— № 6.— С. 32—33.
2. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи соврем. биол.— 1990.— Т. 110, вып. 1.— С. 20—23.
3. Пизарева М. И., Беллева Н. Ф., Старосельцева Л. К. // Пробл. эндокринологии.— 1976.— № 7.— С. 137—140.
4. Ammon H. P. T., Mark M. N. // Cell Biochem. Funct.— 1985.— Vol. 3, N 3.— P. 157—171.
5. Ammon H. P. T., Klumpp S., Fus A. et al. // Diabetologia.— 1989.— Vol. 32.— P. 797—800.
6. Armstrong D. // J. Diabet. Complicat.— 1992.— Vol. 6, N 2.— P. 116—122.
7. Bellomo C., Mirabelli F., Richelmi P., Finardi G. // Hum. Toxicol.— 1989.— Vol. 8, N 2.— P. 152.
8. Field J. B. // Metabolism.— 1964.— Vol. 13.— P. 407—421.
9. Grankvist K., Marklund S. L., Taljedal I. B. // Biochem. J.— 1981.— Vol. 199.— P. 393—398.
10. Crodsky G. M., Heldt H. // Meth. diabet. Res.— 1984.— Vol. 1, Pt B.— P. 137—146.
11. Hellman B., Idahl L. A., Lenmark A. // Biochem. biophys. Acta.— 1975.— Vol. 392.— P. 101—109.
12. Hissin P. I., Hilf R. // Analyt. Biochem.— 1976.— Vol. 74.— P. 214—226.
13. Lacy P. E., Kostianovsky M. // Diabetes.— 1967.— Vol. 16, N 1.— P. 35—39.
14. Yagi K., Nishigaki I., Ohama H. // Vitamins.— 1968.— Vol. 37, N 1.— P. 105—112.
15. Yagi K. // Biochem. Med.— 1976.— Vol. 12, N 1.— P. 212—216.

Поступила 01.06.93

A. V. Sitozhevsky, I. V. Lusta, A. V. Trofimov, V. V. Ivanov, O. A. Karpenko—ANSULIN SECRETION BY ISOLATED RAT PANCREAS UNDER THE EFFECT OF PROOXIDANTS: A RELATIONSHIP WITH GLUTATHIONE RELEASE

Summary. Rates of basal and glucose-stimulated insulin and glutathione secretion were studied in experiments with isolated rat pancreas, as were prooxidant effects on these values. The rate of oxidized and recovered glutathione release was found increased at glucose concentration increase to 16.7 mmoles in perfusion solution. Addition of prooxidants (tert-butyl hydroperoxide and Fe^{2+}) in concentrations 10^{-4} mole did not change basal insulin secretion but resulted in reduction of glucose-stimulated hormone release. Under such conditions a reduction of the rate of oxidized and recovered glutathione release by the pancreas was observed which was adequate to changed GSH/GSSG ratio in isolated Langerhans' islets. It may be supposed that lipid peroxidation results in changed thiol-disulfide ratio in Langerhans' islets B cells and in reduction of their sensitivity to secretogen effect.