

Активность адренокортикальной системы при экспериментальном диабете у крыс

Черкасова О.П., Кузнецова Н.В., Пальчикова Н.А., Селятицкая В.Г.

Научный центр клинической и экспериментальной медицины, Новосибирск
(директор — академик РАН, профессор В.А.Шкурупий)

Цель. Изучить функциональное состояние адренокортикальной системы в сопоставлении с тяжестью заболевания в динамике развития аллоксанового диабета у экспериментальных животных.

Материалы и методы. Сахарный диабет у крыс моделировали введением аллоксана тетрагидрата в дозе 17 мг на 100 г массы тела. Концентрацию кортикостероидов измеряли в плазме крови, надпочечниках и суточной моче радиоиммунным, иммуноферментным, а также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В печени определяли активность аминотрансфераз.

Результаты. Первая неделя экспериментального диабета характеризуется нарастанием тяжести метаболических нарушений, выраженность которых, так же как и гипoinsулинемия, далее до 30 суток существенно не меняется. Начиная с 8–9 суток после введения аллоксана, отмечена активация глюкокортикоидной функции надпочечников, что проявляется повышением в крови концентрации кортикостерона, в надпочечниках и суточной моче — кортикостерона и прогестерона. Увеличение активности аминотрансфераз в печени свидетельствует о физиологической значимости повышения уровня кортикостерона в крови.

Заключение. К 30 суткам диабета, несмотря на сохраняющуюся тяжесть нарушений углеводного метаболизма, отмечены признаки снижения физиологических эффектов глюкокортикоидных гормонов в печени, что может быть связано с уменьшением синтеза кортикостерона в надпочечниках и его содержания в крови.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, кортикостероиды, надпочечники, кровь, моча

Activity of the adrenocortical system in rats with experimental diabetes

Cherkasova O.P., Kuznetsova N.V., Pal'chikova N.A., Selyatitskaya V.G.

Research Centre of Clinical and Experimental Medicine, Novosibirsk

Aim. To study the functional state of the adrenocortical system in experimental animals depending on severity of alloxan diabetes.

Materials and methods. Diabetes in rats was induced by administering alloxan tetrahydrate at a dose of 17 mg/100 g b.w. Corticosteroids in plasma, adrenals, and 24-hr urine were measured by RIA, immunoenzyme assay, and HPLC. Hepatic aminotransferase activities were determined.

Results. During the first week after induction of diabetes, the animals suffered metabolic disturbances and hypoinsulinemia the severity of which did not significantly change up to day 30. Activation of adrenal glucocorticoid function (a rise in plasma corticosteron, urine and adrenal corticosteron and progesteron) occurred starting from days 8–9. Enhanced activity of hepatic aminotransferases confirmed physiological significance of elevated blood corticosteron level.

Conclusion. Physiological effects of glucocorticoids in the liver decreased by day 30 of experimental diabetes despite persisting disturbances in carbohydrate metabolism, probably due to reduced synthesis of corticosteron in adrenals and its concentration in blood.

Key words: experimental diabetes, corticosteroids, adrenal glands, blood, urine

В развитии тяжелых метаболических нарушений при сахарном диабете 1 типа (СД1) основное значение имеет дефицит инсулина. В то же время высказывается предположение, что негативную роль в усугублении тяжести СД играют глюкокортикоидные гормоны, избыточная секреция которых из надпочечников (НП) в кровь приводит к стимуляции процессов глюконеогенеза в тканях-мишенях — печени, почках и др. [1]. Это предположение частично подтверждается результатами ряда экспериментальных и клинических исследований, в которых показано, что при СД1 в крови повышается содержание глюкокортикоидных гормонов [2, 3, 4], увеличивается активность ферментов глюконеогенеза в печени [4]. При этом сведений о том, как в динамике развития СД1 тяжесть заболевания связана с изменениями функционального состояния глюкокортикоидного звена адренокортикальной системы (АКС), крайне мало.

Вопрос о функциональной активности АКС при диабете приобретает особое значение, когда экспериментальные модели СД1 используются для изучения влияния стресса на поражение поджелудочной железы и печени химическими диабетогенами [5, 6], поскольку глюкокортикоидные гормоны играют ведущую роль в поддержании реактивности организма к внешним воздействиям. Также эти сведения важны для исследования отдельных звеньев патогенеза СД и его осложнений, проверки эффективности новых препаратов и способов лечения диабета в динамике развития заболевания, что опре-

деляется тесными взаимоотношениями инсулина и глюкокортикоидных гормонов в регуляции процессов метаболизма [7, 8].

Цель

Изучить функциональное состояние глюкокортикоидного звена АКС с использованием комплекса методов, включающих измерение кортикостероидов в ткани НП, сыворотке крови и суточной моче, в динамике развития экспериментального диабета в сопоставлении с тяжестью заболевания у крыс.

Материалы и методы

Работа проведена на половозрелых крысах-самцах породы Вистар (n=55), которых содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе вивария со свободным доступом к воде и пище. При работе с животными соблюдали принципы гуманности, изложенные в Хельсинкской декларации. Для моделирования СД крысам опытной группы однократно внутривенно вводили раствор аллоксана тетрагидрата («LaChema», Чехия) в дозе 17 мг на 100 г массы тела. Животным контрольной группы в те же сроки однократно вводили аналогичный объем 0,9% водного раствора NaCl. Начиная со вторых и до 24 суток после введения аллоксана, у каждой крысы индивидуально собирали суточную мочу с использованием специально сконструированных мочесборников, измеряли диурез.

Таблица 1

Объем суточной мочи и уровень глюкозурии у крыс в динамике аллоксанового диабета ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n=24)	Сутки после введения аллоксана		
		2 (n=15)	5 (n=7)	7–24 (n=7)
Объем мочи, мл	8,3±0,63	48,9±5,9**	108,0±8,38****	126,0±3,45****
Глюкоза в моче, г/сут.	0,0023±0,0009	3,9±0,92**	6,2±0,48**	11,1±0,55****

Примечание. Статистическая значимость различий величин при парных сравнениях: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольными животными; # – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 2 сутки диабета; + – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 5 сутки диабета.

Крыс выводили из эксперимента через 9, 21 и 30 суток после введения аллоксана. Измеряли массу тела, сердца, почек и НП, рассчитывали относительную массу органа на 100 г массы тела (массовый индекс).

Содержание глюкозы в сыворотке крови и в суточной моче определяли ферментативным методом с использованием наборов «GLU» фирмы BioCon, иммунореактивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови – радиоиммунным методом (рио-ИНС-ПГ- ^{125}I «ХОПИБОХ НАНБ», Минск). Концентрацию кортикостероидных гормонов в гомогенатах надпочечников и плазме крови крыс измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии как описано ранее [4]. Концентрацию прогестерона в гомогенатах надпочечников определяли иммуноферментным методом с использованием наборов Стероид ИФА-прогестерон (ЗАО «Алкор БИО»). Из мочи прогестерон и кортикостерон экстрагировали этилацетатом (отношение объемов мочи и этилацетата 1:10), экстракты выпаривали, остаток растворяли в 0,01 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4. Содержание кортикостерона определяли радиоиммунным методом с использованием меченого триггера кортикостерона – [1,2,6,7- ^3H] Corticosterone (Amersham) и антител к кортикостерону – Corticosterone antiserum (Sigma-Aldrich), прогестерона – методом иммуноферментного анализа (см. выше). Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ) и содержание белка в гомогенатах печени определяли с использованием наборов фирмы BioCon, активность ферментов выражали в Ед/г белка.

Статистическую обработку результатов проводили методом дисперсионного анализа с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft, США), применяли критерий Краскела-Уоллиса для множественных и непараметрический критерий Манна-Уитни для парных сравнений. Вероятность

справедливости нулевой гипотезы принимали при 5% уровне значимости. Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – выборочное среднее, m – стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение

В первые дни после введения аллоксана у животных отмечено выраженное нарастание диуреза и величины суточной глюкозурии от миллиграммов до нескольких граммов глюкозы в сутки (табл. 1). В дальнейшем, начиная с 7 суток и до конца эксперимента, уровень глюкозурии, а также объем суточной мочи, статистически значимо не менялись.

В динамике развития заболевания параллельно со снижением массы тела отмечено уменьшение массы сердца и увеличение массы почек, в результате массовый индекс сердца не менялся относительно контрольных величин, а почек – повышался более чем в два раза (табл. 2). Содержание глюкозы в сыворотке крови было выше контрольного уровня в несколько раз на всех сроках эксперимента, чему соответствовали результаты, указывающие на сниженную более чем в два раза концентрацию в сыворотке крови ИРИ (см. табл. 2).

Массовый индекс НП также был повышен на всех сроках эксперимента, хотя абсолютная масса НП на 30 сутки заболевания снижалась до величин, соответствующих значению показателя у контрольных животных.

Содержание кортикостерона в сыворотке крови повышалось в два раза относительно величины этого показателя у контрольных крыс через 9 суток, и в три раза – через 21 сутки после начала заболевания. К 30 суткам содержание кортикостерона в сыворотке крови снижалось до величины, статистически значимо не отличающейся от контрольного уровня. Аналогичная динамика была отмечена и для активности индуцируемых

Таблица 2

Масса органов и гормонально-метаболические показатели у крыс в динамике аллоксанового диабета ($M \pm m$)

Показатель	Контрольная группа (n=24)	Сутки после введения аллоксана		
		9 (n=7)	21 (n=14)	30 (n=10)
Масса тела, г	356±7	266±12**	264±7**	247±12**
Масса сердца, г	1,10±0,03	0,84±0,02**	0,79±0,02**	0,81±0,03**
Массовый индекс сердца, г/100 г	0,31±0,01	0,32±0,01	0,30±0,01	0,33±0,02
Масса надпочечников, мг	47±2	56±4*	61±3**	50±2 +
Массовый индекс надпочечников, мг/100 г	13,2±0,4	20,9±1,0**	23,2±1,2**	20,3±1,0**
Масса почки, г	1,02±0,02	1,36±0,04**	1,59±0,11**	1,55±0,16**
Массовый индекс почки, г/100 г	0,29±0,01	0,52±0,02**	0,60±0,04**	0,62±0,05**
Глюкоза в сыворотке крови, ммоль/л	6,1±0,2	29,2±3,8**	23,2±4,0**	28,6±3,7**
Иммунореактивный инсулин, пкмоль/л	137,8±8,5	50,5±7,7**	51,3±7,1**	54,0±11,3**
Кортикостерон, нг/мл	58,3±9,7	108,8±24,2*	162,3±21,2**	84,5±12,8 ++
Активность АСТ в печени, Ед/г белка	617±42,2	884±204,6	1714±173,2**	1474±102,5**
Активность АЛТ в печени, Ед/г белка	399±51,2	779±87,6*	773±194,8	539±30,2 #

Примечание. Статистическая значимость различий величин при парных сравнениях: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольными животными; # – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 2 сутки диабета; + – $p < 0,05$; ++ – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 5 сутки диабета.

Таблица 3

Абсолютное (нг в одном надпочечнике) и относительное (нг/мг ткани надпочечника) содержание кортикостероидов в надпочечниках крыс в динамике аллоксанового диабета ($M \pm m$)				
Показатель	Контрольная группа (n=24)	Сутки после введения аллоксана		
		9 (n=7)	21 (n=13)	30 (n=8)
Абсолютное содержание прогестерона	16,3±3,0	3,6±0,6*	20,6±4,2##	30,1±5,0*##
Относительное содержание прогестерона	0,70±0,14	0,12±0,02*	0,70±0,15##	1,14±0,19##
Абсолютное содержание 11-дезоксикортикостерона	15,6±3,0	41,8±14,4*	41,4±5,6**	19,7±5,6*
Относительное содержание 11-дезоксикортикостерона	0,75±0,15	2,20±0,93*	1,69±0,24*	0,89±0,27*
Абсолютное содержание кортикостерона	258,3±33,4	618,5±92,8*	633,4±96,9**	560,9±39,0**
Относительное содержание кортикостерона	11,5±1,3	25,8±4,3*	22,8±3,8*	22,6±2,2**
Абсолютное содержание 11-дегидрокортикостерона	43,3±7,5	83,6±8,52	59,3±8,06	29,0±3,16**
Относительное содержание 11-дегидрокортикостерона	2,02±0,37	4,53±0,63*	2,33±0,24#	1,29±0,19***

Примечание. Статистическая значимость различий величин при парных сравнениях: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольными животными; # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 2 сутки диабета; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с животными на 5 сутки диабета.

глюкокортикоидными гормонами ферментов глюконеогенеза в печени – выраженное повышение активности АСТ и АЛТ на 21 сутки заболевания с последующим снижением величин этих показателей (см. табл. 2).

В таблице 3 представлены результаты определения содержания кортикостероидов в НП крыс в динамике развития аллоксанового диабета. Рассчитывали абсолютное содержание кортикостероидов в нг в одном НП и относительное содержание – в нг/мг ткани НП. Абсолютное содержание прогестерона в НП претерпевало выраженные изменения в динамике диабета – на 9 сутки заболевания снижалось в 5 раз относительно величины этого показателя у контрольных животных, затем начинало повышаться и к концу эксперимента превышало контрольный уровень в два раза. При этом относительное содержание гормона также снижалось на 9 сутки, а через 30 суток после введения аллоксана имело тенденцию к повышению. Такая динамика содержания прогестерона в НП отражает, вероятно, недостаточную активность начальных этапов биосинтеза стероидов в первые дни после введения аллоксана с ее последующим повышением в динамике диабета до величин, необходимых для поддержания синтеза кортикостерона на конечных этапах его биосинтеза.

Изменения содержания в НП 11-дезоксикортикостерона (предшественника в синтезе кортикостерона), кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в динамике диабета носили односторонний характер (см. табл. 3). Отмечено повышение величин этих показателей на 9 сутки заболевания, сохранение высокого уровня содержания кортикостероидов в НП на 21 сутки, снижение содержания кортикостероидов, выраженное в наименьшей степени для кортикостерона, к 30 дню диабета. Эти изменения соответствуют динамике концентрации кортикостерона в сыворотке крови (см. табл. 2), что в сово-

купности позволяет предполагать некоторое снижение к 30 дню заболевания глюкокортикоидной функции НП, которая, тем не менее, остается повышенной относительно контрольного уровня. Подтверждением этого предположения могут служить данные по уменьшению в НП содержания 11-дегидрокортикостерона – обратимого метаболита кортикостерона, который при недостатке синтеза глюкокортикоидных гормонов может вновь превращаться в физиологически активный гормон ферментом 11 β -оксистероиддегидрогеназой, способствуя тем самым повышению концентрации кортикостерона [9].

На рисунке 1 представлены результаты измерения экскреции неметаболизированных кортикостероидов – прогестерона и кортикостерона, с мочой в динамике диабета. Изменения суточной экскреции прогестерона с мочой у крыс в динамике диабета носили фазный характер, что было особенно выражено в первые дни заболевания. На 8–9 сутки экскреция прогестерона была сопоставима с величиной этого показателя у контрольных животных. Затем отмечено стойкое повышение экскреции прогестерона, которое сохранялось до конца эксперимента. Содержание кортикостерона в суточной моче монотонно нарастало до 8–9 суток диабета, затем экскреция этого кортикостероида поддерживалась на уровне, в 6–7 раз превышающем величину соответствующего показателя у контрольных животных. Результаты определения экскреции неметаболизированных кортикостероидов с мочой также указывают на стойкую активацию их синтеза в НП в динамике аллоксанового диабета.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что в динамике развития диабета после введения аллоксана первая неделя заболевания характеризуется нарастанием тяжести метаболических нарушений, выраженность которых затем, так же как и гипoinsулинемия, вплоть до 30 суток существенно не меняется. При этом уже к 9 дню диабета развивается поражение таких органов, как сердце и почки. Физиологические эффекты глюкокортикоидных гормонов, способствующие увеличению тяжести заболевания, продолжают нарастать до 21 суток заболевания, что подтверждается повышением активности аминотрансфераз в печени. К 30 суткам диабета, несмотря на сохраняющиеся стойкие нарушения углеводного метаболизма, отмечены признаки снижения выраженности физиологических эффектов глюкокортикоидных гормонов, что может быть связано с уменьшением синтеза кортикостерона в НП и снижением его содержания в крови.

В публикациях последних лет, как правило, указывают на использование в работе экспериментальных моделей аллоксанового диабета с достаточно короткими сроками заболевания (2–3 недели) [10, 11], в то время как в ранних исследованиях изучали особенности и хронического течения заболевания [12].

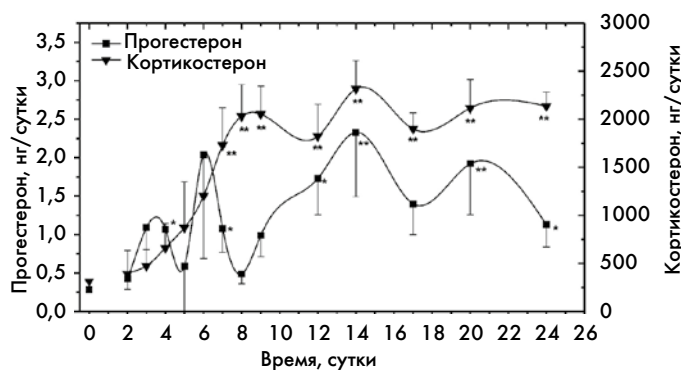


Рис. 1. Экскреция прогестерона и кортикостерона с мочой в динамике аллоксанового диабета

Было показано, что продолжительность аллоксанового диабета у крыс может быть довольно значительной — до 1 года, с частой возможностью спонтанного восстановления нормогликемии. Этому процессу может способствовать не только восстановление структуры и функции островкового аппарата поджелудочной железы [12], но и снижение функциональной активности глюкокортикоидного звена АКС, признаки которого в нашем исследовании были отмечены уже через месяц после начала заболевания.

Выводы

1. В динамике развития экспериментального диабета после введения аллоксана первая неделя заболевания характеризуется нарастанием тяжести метаболических нарушений, выраженность которых, так же как и гипоинсулинемия, далее до 30 суток существенно не меняется.

- Начиная с 8–9 суток после введения аллоксана, у крыс отмечена стойкая активация глюкокортикоидной функции НП, что проявляется повышением концентрации кортикостерона в крови, увеличением содержания кортикостерона и его предшественника в реакциях биосинтеза кортикостероидов прогестерона в НП, усилением экскреции неметаболизированных прогестерона и кортикостерона с мочой.
- Увеличение активности аминотрансфераз в печени свидетельствует о физиологической значимости повышения кортикостерона в крови.
- Изменения содержания кортикостероидов в крови и НП к 30 суткам экспериментального диабета указывают на частичное снижение активности глюкокортикоидного звена АКС, которая, тем не менее, остается повышенной относительно контрольного уровня, что подтверждается сохраняющимся высоким уровнем экскреции неметаболизированных кортикостерона и прогестерона с мочой.

Литература

- Мазурина Н.К. Нарушения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. — 2007. — № 2. — С. 29–34.
- Chan O., Inouye K., Riddell M. C. Diabetes and hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis // Minerva Endocrinol. — 2003. — Vol. 28. — P. 87–102.
- Колычева Н.Л., Абрамов А.В. Морфофункциональная характеристика эндокриноцитов коркового вещества надпочечных желез при экспериментальном сахарном диабете // Клин. анат. операт. хирург. — 2008. — Т.7, № 4. — С. 82–86.
- Selyatitskaya V.G., Cherkasova O.P., Pankina T.V., Palchikova N.A. Functional state of adrenocortical system in rats with manifest alloxan-induced diabetes mellitus // Bull. Exp. Biol. Med. — 2008. — Vol. 146, № 6. — P. 708–710.
- Протасова С.В., Бутолин Е.Г., Оксюзан А.В. Обмен углеводсодержащих биополимеров в печени и слизистой желудка при экспериментальном диабете у крыс с различной устойчивостью к стрессу // Сахарный диабет. — 2010. — №1. — С. 10–12.
- Волчегорский И.А., Цейликман В.Э., Цейликман О.Б., Шип С.А., Бубнов Н.В., Синицкий А.И. Влияние анксиогенного стресса на поражение поджелудочной железы и печени при аллоксановом диабете // Вестник Российской АМН. — 2005. — №8. — С. 21–25.
- Hu Z., Wang H., Lee I.H., Du J., Mitch W.E. Endogenous glucocorticoids and impaired insulin signaling are both required to stimulate muscle wasting under pathophysiological conditions in mice // J. Clin. Invest. — 2009. — Vol. 119, № 10. — P. 3059–3069.
- van Raalte D.H., Nofrate V., Bunck M.C., van Iersel T., Elassaiss Schaap J., Nassander U.K., Heine R.J., Mari A., Dokter W.H., Diamant M. Acute and 2-week exposure to prednisolone impair different aspects of beta-cell function in healthy men // Eur. J. Endocrinol. — 2010. — Vol. 162, № 4. — P.729–735.
- Черкасова О.П., Федоров В.И. Одновременное исследование содержания кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона в надпочечниках и плазме крови при остром стрессе // Проблемы эндокринологии. — 2001. — № 1. — С. 37–39.
- Файзева З.Т. Влияние гликокортикоидов на биохимические показатели крови при аллоксановом диабете // Проблемы эндокринологии. — 2009. — № 5. — С. 26–27.
- Волчегорский И.А., Рассохина Л.М., Мирошниченко И.Ю. Инсулин-потенцирующее действие антиоксидантов при экспериментальном сахарном диабете // Проблемы эндокринологии. — 2010. — № 2. — С. 27–35.
- Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. / Под ред. В.Г. Баранова — Л.: Наука. — 1983. — 240 с.

Черкасова Ольга Павловна	к.б.н., с.н.с. лаборатории эндокринологии, Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск
Кузнецова Наталья Владимировна	аспирант лаборатории эндокринологии, Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск
Пальчикова Наталья Александровна	д.б.н., вед.н.с. лаборатории эндокринологии, Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск
Селятицкая Вера Георгиевна	д.б.н., профессор, руководитель лаборатории эндокринологии, Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН, Новосибирск E-mail: ccem@soramn.ru