

РОЛЬ ИНСУЛЯРНЫХ И КОНТРИНСУЛЯРНЫХ ГОРМОНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛЛОКСАНОВОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Михайличенко В.Ю., Столяров С.С.

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, Россия, Республика Крым, г. Симферополь, e-mail: pancreas1978@mail.ru.

Сахарный диабет – группа метаболических нарушений, которые характеризуются синдромом хронической гипергликемии вследствие нарушения секреции эндогенного инсулина в поджелудочной железе и/или ограничения его действия на периферии. В патогенезе сахарного диабета 1 типа помимо недостатка инсулина важную роль играют контринсулярные гормоны. Первоначально при нормальных показателях инсулина и С-пептида уровень кортикостерона находится на низком (нормальном) уровне, но при длительном пребывании инсулина и С-пептида на показателях ниже нормы, концентрация кортикостерона прогрессивно увеличивается, даже если инсулярные гормоны и остаются стабильные на низком уровне. Патологическая низкая концентрация инсулярных гормонов приводит к дисфункциональному патологическому росту уровня кортикостерона и уменьшению концентрации тироксина и трийодтиронина. При гистологическом исследовании через 1 месяц после начала эксперимента в поджелудочной железе животных при экспериментальном СД отмечалось резкое снижение числа островков Лангерганса, а сохранившиеся островки имели неправильную форму, небольшие размеры, состояли преимущественно из альфа-клеток.

Ключевые слова: сахарный диабет, инсулярные и контринсулярные гормоны.

ROLE OF INSULAR AND CONTRA-INSULAR HORMONES IN THE PATHOGENESIS OF ALLOXAN DIABETES IN RATS IN THE EXPERIMENT

Mikhailichenko V.U., Stoliarov S.S.

Medical Academy named after S.I. Georgievskiy, The Federal State Autonomous Educational Establishment of Higher Education "Crimean Federal University named after V.I. Vernadsky" Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Russia, Republic of Crimea, Simferopol, e-mail: pancreas1978@mail.ru.

Diabetes mellitus – a group of metabolic disorders, which characterized by a syndrome of chronic hyperglycemia due to violation of endogenous insulin secretion in the pancreas and / or restrict its action in the periphery. Contra-insular hormones also play an important role in the pathogenesis of type 1 diabetes. Initially, at normal rates of insulin and C-peptide, corticosterone level is low (normal) level, but for the longer stays of insulin and C-peptide on the levels lower than normal, concentration of corticosterone is increased progressively, even if the islet hormones remain stable at a low level. Pathological low concentration of insular hormones leads to dysfunctional pathological increase the level of corticosterone and decreased concentrations of thyroxine and triiodothyronine. This pathology occurred due to violation of endogenous insulin secretion in the pancreas and / or restrict its action in the periphery. Histologically at 1 month after start of the experiment in the pancreas of animals with experimental diabetes observed reduction in the number of islets of Langerhans. These islets had irregular shape, small size, composed mainly of alpha-cells.

Keywords: diabetes mellitus, insular and contra-insular hormones.

Сахарный диабет (СД) – группа метаболических нарушений, которые характеризуются синдромом хронической гипергликемии вследствие нарушения секреции эндогенного инсулина в поджелудочной железе и/или ограничения его действия на периферии. В патогенезе сахарного диабета 1 типа помимо недостатка инсулина важную роль играют контринсулярные гормоны, которые блокируют действие инсулина на клеточном уровне, уменьшают его выработку в поджелудочной железе и ускоряют

разрушение инсулина в печени под действием фермента инсулиназы (соматотропин, тироксин, трийодтиронин, глюкокортикоидные гормоны и андрогены) [5]. При СД усиливается продукция глюкокортикоидных гормонов, которые, индуцируя синтез ферментов глюконеогенеза, способствуют повышению синтеза глюкозы в печени. Это является компенсаторной реакцией на недостаток глюкозы в клетках в условиях гипоинсулинемии или инсулинорезистентности и приводит к утяжелению выраженности метаболических нарушений при сахарном диабете [2]. Вопрос о функциональной активности адренокортикоидной системы при диабете приобретает особое значение, когда экспериментальные модели СД-1 используются для изучения влияния стресса на поражение поджелудочной железы и печени химическими диабетогенами (аллоксаном, стрептозотоцид и др.), поскольку глюкокортикоидные гормоны играют ведущую роль в поддержании реактивности организма к внешним воздействиям. В связи с этим исследования отдельных звеньев патогенеза СД и его осложнений, проверки эффективности новых препаратов и способов лечения диабета в динамике развития заболевания, что определяется тесными взаимоотношениями инсулина и глюкокортикоидных гормонов в регуляции процессов метаболизма [1,3,4].

Целью работы было изучить роль инсулярных и контринсулярных гормонов в патогенезе развития аллоксанового сахарного диабета у крыс в эксперименте.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование выполнено на 20 крысах самцах массой 200–250 г. Сахарный диабет вызывали путем подкожного введения раствора аллоксана тетрагидрата фирмы Fluka-Sigma (Германия) из расчета 20 мг на 100 г массы тела, предварительно 2 суток голодавшим животным. Содержание глюкозы, холестерина и триглицеридов определяли при помощи программируемого фотометра Eppendorf Eras 6140, используя соответствующие наборы реактивов производства «Диакон ДС» (Россия), «Diasys» (Германия), «LaChema» (Чехия). Соотношение фракций липопротеидов определяли электрофотометрическим методом с применением системы для электрофореза «Helena» (Франция), в качестве носителя использовались пленки из ацетата целлюлозы. Концентрацию глюкозы определяли глюкозоксидазным методом. Содержание холестерина исследовали ферментативным методом с холестеролоксидазой и пероксидазой. Определение концентрации триглицеридов проводилось ферментативным методом с глицерокиназой и глицерол-3-фосфатоксидазой. Определение содержания инсулина, кортикостерона, С-пептида, тироксина и трийодтиронина проводили радиоиммунологическим методом с использованием стандартных коммерческих наборов реактивов фирмы “Immunotech” (Чехия). В опыт брали животных со средней тяжестью сахарного диабета (условно выделяли 3 степени тяжести течения сахарного диабета: легкая –

концентрация глюкозы крови была в пределах 10 ммоль/л, средняя – 10-15 ммоль/л, тяжелая – 15 и более). Гистологическое исследование органов (ПЖ, сердца, почек, сосудов) проводили на 6, 10, 14 и 30 сутки после моделирования сахарного диабета. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, по Вергоффу, альциановым синим при pH 1,0 и 2,6, выполняли ШИК-реакцию. Исследование окрашенных препаратов и морфометрическое исследование проводили с помощью исследовательского микроскопа Olympus AX70 (Япония) и соединенной с ним компьютерной системы с программой анализа изображения AnalySIS 3.1 (Германия).

Статистическую обработку полученных данных выполняли на компьютере Pentium III с помощью программ «Microsoft Excel 10.0», «Statistica 6.0» (USA).

Результаты и их обсуждение. У крыс с моделью диабета через 3 месяца отмечался стабильный уровень глюкозы крови, который находился на уровне $12,1 \pm 0,49$ ммоль/л и недостоверно увеличивался к 6 месяцу до уровня $13,21 \pm 1,83$ ммоль/л, затем к 9 месяцу уровень глюкозы равнялся $19,08 \pm 2,37$ ммоль/л, что достоверно отличалось от показателей 6 месяца. По сравнению с изначальным уровнем (1 месяца диабета), уровень глюкозы на 9 месяце болезни увеличился в 1,4 раза и достоверно отличался ($t=2,21$; $p<0,05$). Данный процесс сопровождался стабильным высоким уровнем гликозилированного гемоглобина, который до 6 месяца находился на уровне $5,59 \pm 0,41$ %, а к 9 месяцу недостоверно ($t=2,21$; $p<0,05$) увеличивался до $6,21 \pm 0,54$ %, что в 1,12 раз выше первоначального показателя. Животные в контрольной группе не жили более 9 месяцев и погибали от разных осложнений сахарного диабета.

При изучении липидного обмена в сроках 1,3,6 и 9 месяцев отмечается недостоверное уменьшение ЛПВП, повышение ЛПНП, ЛПОНП, холестерина и триглицеридов в динамике (табл.1). Так в срок 9 месяцев концентрация ЛПВП недостоверно уменьшилась в 1,14 раза по сравнению с первоначальным значением, ЛПНП недостоверно увеличились в 1,1 раза, ЛПОНП также достоверно увеличились в 1,24 раза. На этом фоне уровень триглицеридов недостоверно увеличился до $1,34 \pm 0,06$ ммоль/л, что в 1,24 раза выше первоначальных значений, а показатель холестерина недостоверно вырос в 1,04 раза. Таким образом, концентрация ЛПВП, ЛПНП, триглицеридов и холестерина статистически оставалась на одном уровне, а концентрация ЛПОНП повысилась. При этом ИА (индекс атерогенности) изменился с 5,27 до 6,42 (при норме – 2).

Таблица 1

Показатели липидного обмена у крыс с аллоксановым диабетом ($M \pm m$)

Срок	1 месяц	3 месяца	6 месяцев	9 месяцев
Показатель				

ЛПВП, (ммоль/л)	0,81±0,11*	0,76±0,21*	0,74±0,11*	0,71±0,11*,***
ЛПНП, (ммоль/л)	3,1±0,21*	3,28±0,12*	3,32±0,22*	3,45±0,21*,***
ЛПОНП, (ммоль/л)	1,08±0,09*	1,12±0,09*	1,21±0,08*	1,34±0,06*,**
Триглицериды, (ммоль/л)	2,11±0,11*	2,23±0,21*	2,22±0,11*	2,34±0,1*,***
Холестерин, (ммоль/л)	5,08±0,39*	5,12±0,26*	5,16±0,34*	5,27±0,26*,***

Примечания: * – различие между предстоящим и сравниваемым показателем недостоверно ($p>0,05$); ** – различие между первоначальным и конечным показателем достоверно ($p<0,05$); *** – различие между первоначальным и конечным показателем недостоверно ($p>0,05$).

Одним из основных показателей эффективности лечения является стабилизация гормонального фона, когда происходит равновесие между инсулярными и контринсулярными гормонами. Как упоминалось выше, при сахарном диабете происходит гормональный дисбаланс, проявляющийся в понижении уровня инсулярных гормонов и повышении концентрации контринсулярных, а также в неадекватной их реакции на различные стрессорные факторы. В разные фазы развития аллоксанового диабета отмечалось соответствующее колебаниям уровня глюкозы крови, изменение концентрации инсулина, который в 1 фазу равнялся $0,76\pm 0,02$ мкМЕ/л, во 2 фазу – $27,41\pm 1,25$ мкМЕ/л и в 3 фазу – $2,32\pm 0,04$ мкМЕ/л.

С целью изучения динамики концентрации инсулярных и контринсулярных гормонов, нами были выбраны следующие виды гормонов: инсулин, С-пептид – представители инсулярных гормонов, кортикостерон, тироксин и трийодтиронин – представители контринсулярных гормонов. Половые гормоны не брали во внимание, т.к. у крыс 5–7 дневный половой цикл и их динамика не отражают сути изменений, протекающих в организме.

Таблица 2

Уровни инсулярных и контринсулярных гормонов при аллоксановом диабете у крыс в срок до 1 месяца ($M\pm m$)

Показатель	Норма	3 сутки	7 сутки	14 суток	1 месяц
Инсулин, мкМЕ/л	$3,53\pm 0,21$	$2,34\pm 0,02$ ****	$2,05\pm 0,04$ ****	$2,07\pm 0,01$ **	$1,94\pm 0,1$ ***
С-пептид, нг/мл	$0,733\pm 0,02$	$0,231\pm 0,015$ ****	$0,175\pm 0,002$ ****	$0,173\pm 0,001$ **	$0,152\pm 0,01$ *, #
Кортикостерон, нмоль/л	$355,22\pm 25,2$	$513,69\pm 11,73$ ****	$597,72\pm 13,26$ ****	$597,93\pm 11,1$ **	$609,3\pm 20,7$ **, #

Тироксин, нмоль/л	39,54±1,93	27,91±1,4 ****	22,46±0,97*	22,51±0,83**	20,12±0,82 **, #
Трийодтиронин, нмоль/л	2,42±0,15	1,75±0,12 ****	1,22±0,02 *	1,24±0,03 **	1,08±0,09 **, #

Примечания: * – различие между предстоящим и сравниваемым показателем достоверно ($p < 0,05$); ** – различие между предстоящим и сравниваемым показателем недостоверно ($p > 0,05$); *** – различие между первоначальным и конечным показателем недостоверно ($p < 0,05$); **** – различие между предстоящим и сравниваемым показателем достоверно ($p < 0,001$); # – различие между первоначальным и конечным показателем достоверно ($p < 0,05$).

После окончания моделирования аллоксанового диабета концентрация инсулина (Табл. 2) на 3 сутки равнялась $2,34 \pm 0,02$ мкМЕ/л, что в 1,5 раз ниже нормы при $P < 0,001$. Далее показатель инсулина статистически достоверно уменьшался и к 7 суткам равнялся $2,05 \pm 0,04$ мкМЕ/л и оставался на этом уровне до 14 суток. Затем достоверно наступала вторая волна падения уровня инсулина, и к 1 месяцу его концентрация равнялась $1,94 \pm 0,1$ мкМЕ/л, что в 1,82 раза ниже нормы при $P < 0,001$. Концентрация С-пептида к 3 суткам уменьшилась в 3,17 раза при $P < 0,001$ и равнялась $0,231 \pm 0,015$ нг/мл. Далее она не изменялась до 14 суток и к концу 1 месяца достоверно понижалась в 1,14 раза и равнялась $0,152 \pm 0,01$ нг/мл, что в 4,8 раз меньше исходного уровня при $P < 0,001$. Причем существует четкая линейная зависимость между концентрацией инсулина и С-пептида при $\chi = 0,99$ и зависимость подчиняется линейной регрессии, которую можно представить в виде $S = 1,65 + 2,63 \cdot I$, где С – С-пептид, I – инсулин при $F = 156,32$, $RI = 0,987$, $p < 0,006$, где F – критерий Фишера, RI – степень точности описания модели процесса, p – уровень значимости критерия Фишера.

Уровень кортикостерона к 1 суткам повысился в 1,45 раз по сравнению с исходным при $P < 0,001$ и равнялся $513,69 \pm 11,73$ нмоль/л. Затем он постепенно повышался и к 7 суткам равнялся $597,72 \pm 13,21$ нмоль/л и до 14 суток статистически достоверно оставался на этом уровне, что в 1,68 раз выше исходного значения при $P < 0,001$. Далее к 1 месяцу концентрация кортикостерона достоверно повысилась до $609,3 \pm 20,7$ нмоль/л, что в 1,72 раз выше нормы при $P < 0,001$.

Между уровнем кортикостерона и инсулина существует линейная зависимость $\chi = 0,99$ и она подчиняется линейной регрессии: $I = 5,66 - 0,02 \cdot K/3$ где К – кортикостерон, I – инсулин при $F = 92,388$, $RI = 0,97$, $p < 0,011$. Между концентрацией С-пептида и кортикостерона также существует линейная регрессия $\chi = 0,97$, и зависимость можно представить в виде формулы линейной регрессии: $S = 1,5 - 0,0068 \cdot K/3$, при $F = 29,67$, $RI = 0,94$, $p < 0,03$.

Концентрация тироксина на 3 сутки уменьшается в 1,42 раза по сравнению с исходным уровнем при $p < 0,05$ и продолжает статистически достоверно снижаться до 7 суток

и равняется $22,46 \pm 0,97$ нмоль/л и остается на этом уровне до 14 суток. В 1 месяц показатель равняется $20,12 \pm 0,82$ нмоль/л, что недостоверно отличается от данных за 14 суток, что в 1,96 раз меньше исходных данных при $p < 0,05$. Уровень трийодтиронина к 3 суткам уменьшился в 1,38 раза по сравнению с исходными данными при $P < 0,001$, затем к 7 суткам он понижался до $1,22 \pm 0,02$ нмоль/л и статистически достоверно не изменялся до 1 месяца. В 1 месяц он равнялся $1,08 \pm 0,09$ нмоль/л, что в 2,24 раза ниже первоначального уровня при $P < 0,001$.

В отдаленные сроки (табл. 3) уровень инсулина до 3 месяца остается достоверно неизменным и к 6 месяцу уменьшается до $1,84 \pm 0,023$ мкМЕ/л при $P < 0,001$, что в 1,94 раза меньше нормы при $P < 0,001$ и статистически достоверно не отличается от 1 месячного показателя. Концентрация С-пептида статистически достоверно остается на стабильном низком уровне и к концу 9 месяца равняется $0,148 \pm 0,015$ нг/мл при $p < 0,05$, что в 4,95 раз достоверно ниже нормы. Уровень кортикостерона также оставался стабильным до конца опыта и равнялся к 9 месяцу $642,9 \pm 25,8$ нмоль/л, что в 1,81 раза достоверно выше нормы. Концентрация тироксина аналогично оставалась стабильной и к 9 месяцу составляла $16,41 \pm 0,51$ нмоль/л, что в 2,41 раза ниже нормы. Показатель трийодтиронина к 3 месяцу достоверно уменьшился до $0,57 \pm 0,04$ нмоль/л, т.е. в 2,08 раз по сравнению с предстоящим показателем, что в 4,65 раза меньше нормы при $P < 0,001$.

Таблица 3

Уровни инсулярных и контринсулярных гормонов при аллоксановом диабете у крыс в срок до 1 года ($M \pm m$)

Показатель	Норма	1 месяц	3 месяца	6 месяца	9 месяцев
Инсулин, мкМЕ/л	$3,53 \pm 0,21$	$1,94 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$ **	$1,84 \pm 0,02$ ****	$1,83 \pm 0,04$ **, ***
С-пептид, нг/мл	$0,733 \pm 0,02$	$0,152 \pm 0,01$	$0,154 \pm 0,025$ **	$0,15 \pm 0,03$ **	$0,148 \pm 0,015$ **, #
Кортикостерон, нмоль/л	$355,2 \pm 25,2$	$609,3 \pm 20,7$	$613,5 \pm 17,4$ **	$622,2 \pm 22,2$ **	$642,9 \pm 25,8$ **, #
Тироксин, нмоль/л	$39,54 \pm 1,93$	$20,12 \pm 0,82$	$18,7 \pm 0,94$ **	$17,6 \pm 0,67$ **	$16,4 \pm 0,51$ **, #
Трийодтиронин, нмоль/л	$2,42 \pm 0,15$	$1,08 \pm 0,09$	$0,57 \pm 0,04$ *	$0,52 \pm 0,02$ **	$0,51 \pm 0,03$ **, ****

Примечания: * – различие между предстоящим и сравниваемым показателем достоверно ($p < 0,05$); ** – различие между предстоящим и сравниваемым показателем недостоверно ($p > 0,05$); *** – различие между первоначальным и конечным показателем недостоверно ($p < 0,05$); **** – различие между предстоящим и сравниваемым показателем достоверно ($p < 0,001$); # – различие между первоначальным и конечным показателем достоверно ($p < 0,05$).

В результате проведенного морфологического исследования установлено, что при экспериментальном аллоксановом диабете на третий день наблюдается резкое уменьшение количества клеток в островках Лангерганса. Так как воздействие аллоксана приводит к активации в В-клетках островков поджелудочной железы процессов перекисного окисления липидов, то в них активируется генетическая программа самоуничтожения, т.е. происходит их апоптоз. Нами также не было обнаружено признаков некроза островковых клеток и фиброза на месте погибших островков. Также в пользу апоптоза говорит и отсутствие клеточной реакции на гибель клеток островкового аппарата. Также можно объяснить и апоптоз А-клеток и расположенных рядом с островком экзокринных и протоковых эпителиоцитов. Так как при апоптозе образовавшиеся апоптотические тельца, окруженные цитоплазматической мембраной, в которых происходит скопление свободных радикалов, захватываются соседними клетками, то и в них тоже происходит активация апоптоза. Данный процесс приводит к исчезновению большого количества островков, от которых не остается никаких следов. В сохранившихся островках остается не более 7 клеток, скорее всего это недифференцированные клетки, которые не участвуют в процессе поглощения апоптотических телец. В результате действия аллоксана к 30 дню удельный объем островков снижается в 14,3 раза по сравнению с нормой.

Развивающаяся при массивной гибели В-клеток гипоинсулинемия приводит к нарушению усвоения клетками глюкозы и дистрофическим изменениям, особенно в артериальных сосудах, что проявляется мукоидным и фибриноидным набуханием в их стенке, повышением проницаемости с развитием периваскулярных плазморрагий. Уже к 30 дню развивается выраженная диабетическая микроангиопатия, которая проявляется утолщением стенок сосудов всех органов за счет набухания и иногда гиалиноза, в совокупности с нарушениями гемостаза в них формируются гиалиновые тромбы. Микроангиопатия приводит к усугублению дистрофических изменений в различных органах. В почках кроме вакуольной дистрофии наблюдается накопление гликогена в извитых канальцах, что связано с активацией процессов реабсорбции глюкозы из мочи. В сердце развивается гипертрофия миокарда, которая может быть связана с развитием гипертензии у животных, и мелкие очаги дистрофических изменений кардиомиоцитов.

Выводы. Таким образом, введение аллоксана приводит к повреждению эндокринной части поджелудочной железы, что сопровождается понижением концентрации инсулина и С-пептида, а также патологическим повышением уровня кортикостерона, который усугубляет течение диабета у животных. Гормональный дисбаланс выражается в виде повышения концентрации глюкозы крови и гликозилированного гемоглобина. Данный процесс сопровождается нарушением липидного обмена, что приводит к повышению атерогенности

крови и соответственно приводит к развитию диабетической ангиопатии. Декомпенсация течения диабета приводит к тому, что у животных к 9 месяцу развивается весь спектр поздних диабетических осложнений, которые приводят к смерти животных.

Список литературы

1. Дифференцировка стволовых и прогениторных β -клеток поджелудочной железы в инсулинсекретирующие клетки у мышей при сахарном диабете / Е.Г. Скурихин, Н.Н. Ермакова, Е.С. и др. // БЭБМ. – 2013. – № 5. – С.681-687.
2. Мельниченко Г.А. «Другие типы» диабета: контринсулярные гормоны и генетическая предрасположенность, новые возможности диагностики и лечения / Г.А. Мельниченко, И.В. Глинкина, Д.М. Суровцева // Вестник РАМН. – 2012. – № 1. – С.50-53.
3. Трансплантация культуры клеток поджелудочной железы при аллоксановом диабете (сообщение 1) / О.И. Миминошвили, В.Ю. Михайличенко, А.Г. Попандопуло и др. // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2003. – Т.4. – № 3. – С.530-533.
4. Черкасова О.П. Адренокортикальная и ренин-ангиотензиновая системы в динамике экспериментального диабета / О.П. Черкасова, В.Г. Селятицкая // Биомедицинская химия. – 2013. – 59. – № 2. – С.183-191.
5. Черкасова О.П. Активность адренокортикальной системы при экспериментальном диабете у крыс / О.П. Черкасова, Н.В. Кузнецова, Н.А. Пальчикова, В.Г. Селятицкая // Сахарный диабет. – 2011. – № 2. – С.37-40.

Рецензенты:

Кубышкин А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической патофизиологии Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь;

Ильченко Ф.Н., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой хирургии № 2 Медицинской академии имени С.И. Георгиевского Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского» Министерства образования и науки Российской Федерации, г. Симферополь.