

## АКТИВНОСТЬ АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДИАБЕТОГЕННОМУ ДЕЙСТВИЮ АЛЛОКСАНА

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

*Учреждение Российской академии медицинских наук «Научный центр  
клинической и экспериментальной медицины Сибирского отделения РАМН»,  
Новосибирск, e-mail: csem@soramn.ru*

Проведена оценка тяжести течения диабета у крыс после введения им аллоксана, выделено две группы – с тяжелым (70,2%) и легким (29,8%) течением заболевания. В динамике развития заболевания у крыс с тяжелым течением диабета увеличиваются диурез и глюкозурия, у крыс с легким течением диабета повышение величин этих показателей выражено в меньшей степени и к 8 суткам заболевания они начинают снижаться. У крыс с тяжелым течением диабета увеличен массовый индекс надпочечников и снижен – тимуса, в крови, надпочечниках и моче повышено содержание кортикостерона, а в печени – активность аланин- и аспаратаминотрансферазы; у крыс с легким течением заболевания величины этих показателей не отличаются от таковых у крыс из контрольной группы.

**Ключевые слова:** экспериментальный диабет, активность адренкортикальной системы

Вариабельность реактивности на внешние воздействия относится к проявлениям широкой дисперсности свойств организмов, сформированной в процессе филогенеза, и свидетельствует о биологической целесообразности поддержания неоднородности любой популяции с точки зрения возможности ее приспособления к меняющимся экологическим условиям [2, 6]. Известно, что даже у линейных экспериментальных животных имеется значительная дисперсия реактивности, обусловленная биохимической и физиологической индивидуальностью, а в неинбредных популяциях вариабельность различных биологических свойств достигает чрезвычайно широких пределов. Характерным примером проявления этой широкой дисперсии внутривидовой реактивности выступает различная устойчивость организмов к недостатку кислорода [1]. У высоко- и низкоустойчивых к гипоксии животных выявлены различия в параметрах гормональной регуляции [3].

Это относится к гормонам, связанным с регуляцией стресс-реакции и перераспределением энергетических ресурсов, т.е. к глюкокортикоидам и инсулину. Ранее нами было показано, что в ответ на введение аллоксана проявляются различия в индивидуальной устойчивости экспериментальных животных (крыс породы Вистар) к диабетогенному действию этого соединения [5]. Показано также, что у животных с аллоксановым диабетом повышается активность адренкортикальной системы (АКС), увеличивается содержание кортикостерона в надпочечниках и крови [9].

**Цель исследования:** изучить активность адренкортикальной системы у крыс с высокой и низкой устойчивостью к диабетогенному действию аллоксана.

### Материал и методы исследования

Работу проводили на половозрелых крысах самцах породы Вистар ( $n = 87$ ), 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. Опытным крысам однократно внутрибрюшинно вводили раствор аллоксана в дозе 17 мг на 100 г массы тела, животным контрольной группы – 0,9%-й водный раствор NaCl. На протяжении 2–10 суток после введения аллоксана у крыс собирали суточную мочу, измеряли диурез и глюкозурию, замораживали аликвоту мочи для определения содержания неметаболизированного кортикостерона.

Крыс выводили из эксперимента через 2 недели после введения аллоксана. Измеряли массу тела, почек, тимуса, жировых депо (эпидидимальный и забрюшинный жир) и надпочечников (НП), рассчитывали относительную массу органа/жировой ткани на 100 г массы тела (массовый индекс).

Содержание глюкозы в сыворотке крови и моче определяли ферментативным методом с использованием наборов «GLU» фирмы BioCon, иммунореактивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови – радиоиммунным методом (рио-ИНС-ПГ-<sup>125</sup>I «ХО-ПИБОХ НАНБ» Минск); содержание кортикостерона в сыворотке крови, моче и гомогенатах НП измеряли радиоиммунным методом с использованием [1, 2, 6, 7-<sup>3</sup>H]–Corticosterone (Amersham) и Corticosterone antiserum (Sigma-Aldrich); активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и содержание белка в ткани печени – с использованием наборов фирмы BioCon.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0 (Statsoft, США), для множественных сравнений применяли критерий Краскела–Уоллиса, для парных сравнений – критерий Манна–Уитни. Вероятность справедливости нулевой гипотезы принимали при 5%-м уровне значимости. Данные представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – выборочное среднее,  $m$  – стандартная ошибка.

### Результаты исследования и их обсуждение

Через 2 недели после введения аллоксана среди опытных животных по уровню глюкозы в крови было выделено две группы: первая – с уровнем глюкозы, превышающим величину этого показателя у крыс контрольной группы более чем в 4 раза, вторая – с превышением относительно контрольного уровня в 1,3 раза. Поскольку выраженность гликемии отражает тяжесть течения сахарного диабета, первая группа была определена как крысы с тяжелым, а вторая – с легким течением диабета (табл. 1). Частота случаев тяжелой и легкой форм диабета составила 70,2 и 29,8%.

У крыс с тяжелым течением диабета в большей степени, чем у животных с легким течением заболевания, снизились масса тела и массовый индекс жировых депо, увеличился массовый индекс почки. Эти изменения указывают на большие нарушения обменных процессов в органах и тканях крыс с тяжелым течением диабета. Однако, несмотря на значительную разницу в гликемии, у крыс с тяжелой и легкой формами диабета содержание иммунореактивного инсулина в сыворотке крови было снижено в одинаковой степени. Можно предполагать, что гетерогенность экспериментальных животных по чувствительности к диабетогенному действию аллоксана связана не только с выраженностью вызываемого им нарушения структуры и функции островкового аппарата поджелудочной железы крыс, но и с действием других гормонов, усиливающих метаболические эффекты недостатка инсулина в организме. К их числу можно отнести глюкокортикоидные гормоны, действие которых направлено на усиление синтеза глюкозы в реакциях глюконеогенеза.

В табл. 2 представлены результаты определения активности АКС и метаболических эффектов кортикостерона у крыс с разной тяжестью течения диабета.

Таблица 1

Оценка тяжести течения диабета после введения опытным крысам аллоксана ( $M \pm m$ )

Показатель	Крысы контрольной группы ( $n = 40$ )	Опытные крысы		p
		группа с тяжелым течением диабета ( $n = 33$ )	группа с легким течением диабета ( $n = 14$ )	
		1	2	
Глюкоза крови, ммоль/л	$6,36 \pm 0,13$	$28,85 \pm 2,93$	$8,49 \pm 0,53$	1-2,3 < 0,000 2-3 < 0,000
Иммунореактивный инсулин крови, пмоль/л	$130,2 \pm 8,9$	$53,3 \pm 7,7$	$60,8 \pm 3,7$	1-2 < 0,000 1-3 = 0,005
Масса тела, г	$307,1 \pm 11,3$	$234,7 \pm 7,1$	$288,6 \pm 9,2$	2-1,3 < 0,000
Массовый индекс почки, г/100 г массы тела	$0,30 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$	1-3 = 0,024 2-1,3 < 0,000
Массовый индекс жировых депо, г/100 г массы тела	$2,57 \pm 0,11$	$0,70 \pm 0,08$	$2,11 \pm 0,16$	1-3 = 0,031 2-1,3 < 0,000

Таблица 2

Активность адренокортикальной системы у крыс с различной тяжестью течения аллоксанового диабета ( $M \pm m$ )

Показатель	Крысы контрольной группы ( $n = 40$ )	Опытные крысы		p
		группа с тяжелым течением диабета ( $n = 33$ )	группа с легким течением диабета ( $n = 14$ )	
		1	2	
Кортикостерон в крови, нмоль/л	$207,9 \pm 32,0$	$357,7 \pm 27,8$	$214,3 \pm 20,3$	1-2 = 0,002 2-3 = 0,003
Кортикостерон в надпочечниках, пмоль/мг ткани	$46,3 \pm 4,8$	$70,4 \pm 6,9$	$45,3 \pm 6,6$	1-2=0,010
Массовый индекс надпочечников, мг/100 г массы тела	$7,07 \pm 0,25$	$11,66 \pm 0,43$	$8,85 \pm 0,31$	1-2,3 < 0,000 2-3 < 0,000
Активность АСТ в печени, Ед/ г белка	$431,5 \pm 30,2$	$792,8 \pm 64,1$	$468,8 \pm 39,5$	2-1,3 < 0,000
Активность АЛТ в печени, Ед/ г белка	$206,4 \pm 26,3$	$402,9 \pm 35,5$	$197,4 \pm 12,3$	2-1,3 < 0,000
Массовый индекс тимуса, г/100 г массы тела	$0,14 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	2-1,3 < 0,000

У крыс с тяжелым течением диабета концентрация в крови кортикостерона, основного глюкокортикоидного гормона у животных этого вида, была в 1,7 раза выше, чем у крыс контрольной группы. Содержание в надпочечниках этого гормона также было выше в 1,5 раза, что указывает на усиление синтеза кортикостерона у крыс с тяжелой формой диабета. У крыс с легкой формой диабета величины указанных показателей не отличались от соответствующих значений у крыс контрольной группы. Массовый индекс надпочечников также был повышен в большей степени у крыс группы с тяжелым течением диабета, чем у животных группы с легким течением заболевания, относительно величины этого показателя у крыс контрольной группы.

На тот факт, что у крыс с тяжелым течением диабета в крови повышено содержание физиологически активной формы кортикостерона, указывают результаты определения в печени активности ферментов, участвующих в реакциях вовлечения аминокислот в глюконеогенез. Так, активности АСТ и АЛТ были повышены относительно величин этих показателей у контрольных крыс в 1,8–1,9 раза. Поскольку хорошо известным следствием длительного повышения глюкокортикоидных гормонов в крови является тимиколитический эффект, был также измерен массовый индекс тимуса, величина которого оказалась сниженной в 1,5 раза у крыс с тяжелым течением диабета относительно контрольного уровня. Таким образом, полученные результаты указывают, что у крыс после введения аллоксана тяжесть течения диабета ассоциирована со степенью активации АКС.

Диабетогенное действие аллоксана связано с активацией процессов образования активированных форм кислорода в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, что приводит к их гибели и соответственно снижению содержания инсулина в циркуляции [8]. Поскольку снижение содержания иммунореактивного ин-

сулина в крови крыс с тяжелым и легким течением диабета проявлялось в равной степени, можно говорить об одинаковой выраженности поражения аллоксаном островкового аппарата поджелудочной железы у опытных крыс обеих групп. Следовательно, можно было предположить, что у крыс с тяжелым течением заболевания изначально повышена реактивность АКС на действие метаболических стрессоров, к числу которых можно отнести те нарушения метаболизма, которые характерны для диабета.

Для проверки этого предположения была изучена динамика развития диабета в начальные сроки после введения аллоксана крысам. Анализировали результаты определения величин объема мочи, уровня глюкозурии и содержания неметаболизированного кортикостерона в суточной моче крыс, собранной в течение первых 10 суток после введения аллоксана (табл. 3).

На 2–4 сутки после введения аллоксана у опытных крыс обеих групп отмечена выраженная реакция по глюкозурии. Так, если у животных контрольной группы экскреция глюкозы с суточной мочой составила тысячные доли грамма, то у крыс после введения аллоксана она выросла до нескольких грамм в сутки. Эти результаты также подтверждают высказанное выше мнение о сопоставимом поражении островкового аппарата поджелудочной железы у опытных крыс обеих групп после введения аллоксана. Однако повышение содержания в моче кортикостерона в начальные сроки после введения аллоксана было выше у крыс с тяжелым течением диабета. В последующие дни у крыс с тяжелым течением диабета выявленные изменения изученных показателей усугублялись, а у крыс с легким течением, наоборот, снижались. Через 8–10 дней после введения аллоксана содержание кортикостерона в моче опытных крыс с легким течением диабета нормализовалось, а в моче опытных крыс с тяжелым течением заболевания стало выше, чем у контрольных животных, в 8,3 раза.

Таблица 3

Динамика развития диабета у экспериментальных животных в группах с различной тяжестью течения аллоксанового диабета ( $M \pm m$ )

№ п/п	Группа животных	Срок после введения аллоксана	Показатель:		
			диурез, мл	глюкозурия, г/сут	кортикостерон в моче, нмоль/сут
1	Контрольная		$8,2 \pm 0,6$	$0,002 \pm 0,001$	$0,66 \pm 0,05$
2	Опытная: – тяжелое течение диабета	2–4 сутки	$64,6 \pm 5,3$	$3,8 \pm 1,4$	$1,42 \pm 0,32$
3		5–7 сутки	$102,2 \pm 5,0$	$10,8 \pm 1,5$	$4,48 \pm 0,74$
4		8–10 суток	$123,7 \pm 4,0$	$10,3 \pm 0,5$	$5,50 \pm 0,30$
5	– легкое течение диабета	2–4 сутки	$13,5 \pm 2,6$	$2,2 \pm 0,9$	$0,90 \pm 0,19$
6		5–7 сутки	$17,1 \pm 2,3$	$0,52 \pm 0,25$	$0,91 \pm 0,14$
7		8–10 суток	$9,6 \pm 2,4$	$0,02 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,15$
P			1–2, 3, 4, 6 < 0,000 2–3, 4 = 0,001 2, 3, 4–5, 6, 7 < 0,000	1–2, 5 = 0,001 1–3, 4 < 0,000 1–6 = 0,013	1–2 = 0,020 1–3, 4 < 0,000 3, 4–6, 7 = 0,000

Полученные результаты о различной реактивности АКС у крыс с тяжелым и легким течением аллоксанового диабета согласуются с данными литературы. Так, в работе [3] было показано, что у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии крыс различается реактивность АКС (по уровню кортикостерона в крови) в ответ на острую гипоксию. В работе [4] показано, что крысы породы Вистар через 5 и более недель после введения им стрептозотоцина могут быть разделены на две группы: с устойчивым диабетом или с последующей реверсией гипергликемии и клинических признаков диабета. Наличие двух вариантов течения стрептозотоцинового диабета у крыс авторы связали с различной степенью резистентности островковой ткани поджелудочной железы к ее токсическому повреждению и последующей компенсаторной регенерации. Этот механизм формирования двух вариантов течения экспериментального диабета и выдвинутая нами гипотеза о роли реактивности АКС в определении тяжести диабета у крыс не противоречат, а, наоборот, дополняют друг друга. На основе результатов морфологического исследования селезенки авторы рабо-

ты [4] показали, что у крыс при устойчивом течении диабета наблюдаются угнетение функциональной активности клеток лимфоидного ряда и иммунная дисрегуляция. Эти сведения совпадают с полученными нами результатами о выраженном снижении массового индекса тимуса у крыс с тяжелым течением диабета и также косвенно указывают на активацию АКС, поскольку именно глюкокортикоидные гормоны обладают выраженным свойством угнетать активность иммунной системы [7].

**Заключение.** Индукция аллоксаном сахарного диабета 1 типа вызывает у экспериментальных животных снижение уровня иммунореактивного инсулина в крови и повышение активности АКС. У 70,2% опытных крыс активация АКС имеет выраженный и дополнительно усугубляющийся в динамике заболевания характер, что проявляется не только в повышении содержания кортикостерона в надпочечниках, крови и моче, но и в усилении действия глюкокортикоидных гормонов на уровне тканей-мишеней, в частности, печени, где повышается активность ферментов глюконеогенеза; у 29,8% крыс активация АКС существенно ниже и

выявляется только в первые дни заболевания. Следовательно, тяжесть течения аллоксанового диабета ассоциирована с выраженностью активации АКС, что позволяет говорить о важной роли реактивности этой гормональной системы в механизмах развивающейся декомпенсации сахарного диабета 1 типа после первоначального повреждения инсулин-продуцирующей функции островков Лангерганса поджелудочной железы.

#### Список литературы

1. Критерии индивидуальной и популяционной устойчивости к острой гипоксии / Н.А. Агаджанян, Л.В. Сорокин, Е.П. Тамбовцев, В.И. Торшин // Бюл. exper. биол. и мед. – 1995. – № 9. – С. 239–241.
2. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности / под общ. ред. В.А. Березовского. – Киев: Наук. думка, 1978. – 216 с.
3. Различия гормонального статуса у высоко- и низкоустойчивых к гипоксии крыс / Т.В. Горячева, А.М. Дудченко, М.Е. Спаская, И.О. Михальская, Р.Н. Глебов, Л.Д. Лукьянова // Бюл. exper. биол. и мед. – 1993. – № 7. – С. 46–48.
4. Диабетические осложнения у крыс при длительных сроках моделирования сахарного диабета 1-го типа / А.Р. Закирьянов, М.А. Плехотный, Н.А. Онищенко, А.В. Володина, Е.Д. Клименко, Л.П. Кобозева, А.Б. Мичунская,

О.М. Поздняков // Пат. физ. и exper. тер. – 2007. – № 4. – С. 21–25.

5. Пальчикова Н.А. Количественная оценка чувствительности экспериментальных животных к диабетогенному действию аллоксана / Н.А. Пальчикова, В.Г. Селятицкая, Ю.П. Шорин // Пробл. эндокринологии. – 1987. – № 4. – С. 65–68.

6. Судаков К.В. Устойчивость к психоэмоциональному стрессу как проблема биобезопасности / К.В. Судаков // Вестник РАМН. – 2002. – № 11. – С. 15–17.

7. Costa-Pinto F.A. Neuroimmune interactions in stress / F.A. Costa-Pinto, J. Palermo-Neto // Neuroimmunomodulation. – 2010. – Vol. 17, №3. – P. 196–199.

8. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes / S. Lenzen // Diabetologia. – 2008. – Vol. 51. – P. 216–226.

9. Selyatitskaya V.G. Functional State of Adrenocortical System in Rats with Manifest Alloxan-Induced Diabetes Mellitus / V.G. Selyatitskaya, O.P. Cherkasova, T.V. Pankina, N.A. Palchikova // Bull. Exper. Biol. Med. – 2009. – Vol. 146. – P. 708–710.

#### Рецензенты:

Лушниковая Елена Леонидовна, д.б.н., профессор, зав. лабораторией цитологии и клеточной биологии НИИ региональной патологии патоморфологии Сибирского отделения РАМН, Новосибирск;

Усынин Иван Федорович, д.б.н., зав. лабораторией НИИ биохимии Сибирского отделения РАМН, Новосибирск.

## ADRENOCORTICAL SYSTEM ACTIVITY AT HIGHLY AND LOWLY RESISTANT TO ALLOXAN DIABETOGENIC ACTION RATS

Selyatitskaya V.G., Palchikova N.A., Kuznetsova N.V.,  
Rudenko N.S., Cherkasova O.P.

*Institutions of Russian Academy Medical Sciences Scientific Centre of Clinical and Experimental Medicine Siberian Branch RAMS, Novosibirsk, e-mail: ccem@soramn.ru*

The evaluation of diabetes severity in rats after administration of alloxan was carried out. The rats were divided into two groups – with a severe (70,2%) and mild (29,8%) disease. In the dynamics of disease progression in rats with severe diabetes volume of daily urine, level of glucosuria and excretion of unmetabolized corticosterone in urine were increasing; in rats with mild diabetes increase of these parameters was weaker, and on the eighth day of illness they began to decline. In rats with severe diabetes mass index of adrenal was increased but mass index of thymus was reduced, blood and adrenal corticosterone content and activity of alanine- and aspartateaminotransferase in the liver were increased; in rats with mild disease values of these parameters did not differ from those in the control group rats.

**Keywords: experimental diabetes, adrenocortical system activity**