УДК 615.272-03:616.379-008.64-092

А. В. Абрамов

Стимуляція синтезу інсуліну в β-клітинах підшлункової залози у інтактних щурів і щурів з діабетом при хронічному введенні аргінін-вазопресину

В исследованиях, выполненных на интактных крысах и крысах с диабетом установлено, что хроническое десятисуточное введение аргинин-вазопрессина (интрацереброventрикулярно 24 пг, или интраперитонеально 240 нг ежесуточно) приводит к повышению содержания инсулина в β-клетках поджелудочной железы в условиях нормогликемии на 6,6 % ± 0,2 % по сравнению с контролем, а в условиях диабетической гипергликемии на 25,9 % ± ± 0,6 % при интрацереброventрикулярном введении и на 15,9 % ± 0,8 % при интраперитонеальном введении. Введение вазопрессина животным с экспериментальным диабетом приводит к снижению уровня гликемии в среднем на 37 %, однако не влияет на процессы деструкции островков Лангерганса. Возможно, что инсулинстимулирующий эффект интрацереброventрикулярного введения вазопрессина связан с модуляцией функциональной активности гипоталамических центров пищевого поведения и дорсального моторного ядра блуждающего нерва, а при периферическом введении вазопрессин самостоятельно стимулирует секрецию инсулина.

Вступ

В останні роки проведено низку досліджень, які дозволяють розглядати вазопресинергічну нейросекреторну систему гіпоталамуса як одну із можливих ланок у центральній регуляції функціональної активності β-клітин підшлункової залози. Доведено, що при стрептозотоциновому цукровому діабеті у щурів [4], а також у мишей лінії C5BL/KsJ зі спадковим діабетом [2] спостерігається підвищення морфофункціональної активності вазопресинсинтезуючих великоклітинних суб'ядер паравентрикулярного і супраоптичного ядер гіпоталамуса. Це супроводжується підвищенням концентрації вазопресину в периферичній крові як у тварин з діабетом [4,6], так і у хворих людей на цукровий діабет [9]. Встановлено, що за умов гіперглікемії можлива стимуляція вазопресином синтезу інсуліну β-клітинами ізольованої підшлункової залози [8, 15].

Метою нашого дослідження було вивчення впливу хронічного центрального та периферичного введення аргінін — вазопресину інтактним щурам і щурам з діабетом на функціональний стан β-клітин підшлункової залози.

Методика

Дослідження проведено на 84 щурах-самцях лінії Вістар масою 250—270 г. Цукровий діабет моделювали одноразовим введенням стрептозотоцину фірми «SIGMA Chemical» (США) в дозі 50 мг/кг у 0,5 мл 0,1 моль/л цитратно-

© А. В. Абрамов

го буферу (pH 4,5) внутрішньочеревинно. Для центрального (інтрацеребровентрикулярного) введення вазопресину експериментальним тваринам попередньо імплантували сталеву канюлю (калібр G27) у правий латеральний шлуночок мозку за координатами AP = 9,5 мм; L = 1,5 мм; H = 4,5 мм [13]. На 8-му добу після операції тварин відбирали для експерименту. Синтетичний [Arg^8] — вазопресин фірми «Peninsula Laboratories Inc.» (США) у дозі 24 пг, розчинений у 3 мкл 0,9 %-го розчину NaCl, вводили інтрацеребровентрикулярно кожної доби протягом 10 діб, починаючи з 25-ої доби від введення стрептозотоцину (33-тя доба після операції), а у інтактних щурів на 33-тю добу після імплантації канюлі. Контрольній групі тварин за аналогічною схемою вводили 3 мкл 0,9 %-го розчину NaCl. Периферичне введення аргінін — вазопресину починали з 25-ї доби після введення стрептозотоцину в дозі 240 нг у 0,5 мл 0,9 %-го розчину NaCl інтраперитонеально кожної доби впродовж 10 діб. Контрольній групі тварин за аналогічною схемою вводили 0,5 мл 0,9 %-го розчину NaCl. Через 24 год після останнього введення пептиду (на фоні 16-годинного голодування) тварин декапітували під етаміналовим наркозом (40 мг/кг) та забирали кров для визначення концентрації глюкози, вилучали підшлункову залозу, фіксували її в рідині Буєна й після стандартної гістологічної обробки заливали в парафін. Для визначення вмісту інсуліну в β-клітинах підшлункової залози проводили імуноцитохімічне забарвлення за допомогою набору фірми «Peninsula Laboratories Inc.» (США). Кількісне денситометричне визначення вмісту інсуліну в β-клітинах проводили в ультрафіолетовому спектрі збудження 390—420 нм за допомогою автоматизованої комп'ютерної цитофлюориметричної системи ЛЮМАМ-И2 фірми «ЛОМО» (Росія) [3]. В кожній експериментальній групі досліджували 80—100 острівців Лангерганса в серійних зрізах різних відділів підшлункової залози, реєстрували кількість клітин у кожному острівці та вміст гормону в кожній клітині (в умовних мікроодиницях). Концентрацію глюкози в крові визначали глюкозоксидазним методом за допомогою набору «ДИАКОМ Глюкоза ГО» фірми «ДИАКОМ-СИНТЕКО» (Росія). Статистичну оцінку експериментальних результатів і вірогідність змін у групах визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Розвиток стрептозотоцинового цукрового діабету протягом 5 тиж призводив до деструкції β-клітин і вірогідного зниження їх кількості в острівцях Лангерганса, до зменшення вмісту інсуліну в самих клітинах і до закономірного розвитку гіперглікемії (таблиця). Хронічне інтрацеребровентрикулярне введення 0,9 %-го розчину NaCl інтактним щурам і щурам з діабетом не впливало ($P > 0,05$) на зміни основних показників функціонального стану β-клітин у цих тварин. У той же час, хронічне введення вазопресину експериментальним тваринам спричинювало виразний біологічний ефект на стан інсулінсинтезуючої функції β-клітин підшлункової залози.

Так, інтрацеребровентрикулярне введення вазопресину інтактним щурам призводило до вірогідного підвищення вмісту інсуліну в β-клітинах і до зниження концентрації глюкози в крові, не змінюючи при цьому середню кількість функціонуючих клітин в острівцях. Аналогічні ефекти вазо-

пресину спостерігалися й при його хронічному введенні тваринам з діабетом: вміст інсуліну в β-клітинах підвищувався, вірогідно перевищуючи значення в контролі; концентрація глюкози в крові хоча й була вірогідно вищою, ніж у контролі ($P < 0,001$), але значною меншою щодо значень щурів з діабетом ($P < 0,0001$). Характерно, що введення вазопресину не впливало на процеси деструкції β-клітин при діабеті й не призводило до змін їх середньої кількості в острівцях Лангерганса. Слід відзначити односпрямованість ефектів вазопресину на функціональний стан β-клітин при центральному та периферичному його введенні. Однак більш виражене підвищення вмісту інсуліну в β-клітинах спостерігалося при хронічному інтрацереброventрикулярному введенні вазопресину, ніж при інтраперитонеальному ($P < 0,0001$).

Результати проведених досліджень свідчать про стимулюючий ефект хронічного введення аргінін — вазопресину на синтез інсуліну в β-клітинах. При цьому інсулінстимулююча дія вазопресину реалізувалася за умов гіперглікемії, як раніше було показано в дослідах на ізольованій підшлунковій залозі [8] та спостерігалося в наших дослідженнях на щурах з діабетом. Крім цього, аналогічні ефекти гормону спостерігались й у контрольних «нормоглікемічних» тварин, що підтверджує експериментальні дані про глюкозонезалежну стимуляцію вазопресином секреції інсуліну ізольованими β-клітинами [15]. Експериментально встановлено, що розвиток цукрового діабету у щурів супроводжується підвищенням морфофункціональної активності паравентрикулярного й супраоптичного ядер гіпоталамуса [4], активізацією синтезу мРНК до вазопресину [13], збільшенням концентрації гормону в крові [4]. При цьому можлива реалізація центральних і периферичних ефектів вазопресину. Наявність еферентних проекцій від дрібноклітинних вазопресинергічних нейронів паравентрикулярного ядра

Концентрація глюкози в крові, кількість β-клітин у острівцях Лангерганса та вміст у них інсуліну у щурів при хронічному введенні аргінін — вазопресину (M ± m)

Група тварин	Концентрація глюкози, ммоль/л	Кількість β-клітин	Вміст інсуліну в β-клітинах, мкОд
Інтактні щури	3,59±0,06	49,9±2,3	1893,5±4,9
Контрольні щури за умов інтрацереброventрикулярного введення 0,9 %-го розчину NaCl	3,64±0,07	48,7±2,5	1874,8±7,0
Контрольні щури за умов інтрацереброventрикулярного введення вазопресину	3,37±0,06*	47,5±2,7	2019,4±4,2***
Щури з модельованим діабетом	8,49±0,41**	15,3±1,4***	1389,6±7,3***
Щури з діабетом за умов інтрацереброventрикулярного введення 0,9 %-го розчину NaCl	8,52±0,47**	15,7±1,3***	1382,7±8,9***
Щури з діабетом за умов інтраперитонеального введення вазопресину	5,30±0,39**	13,9±1,6***	2193,9±15,1***
Щури з діабетом за умов інтрацереброventрикулярного введення вазопресину	4,95±0,34**	17,2±1,2***	2383,2±11,8***

* $P<0,05$; ** $P<0,001$; *** $P<0,0001$ порівняно з групою інтактних тварин.

до вентромедіального ядра гіпоталамуса [16] та до дорсального моторного ядра блукаючого нерва [1] призводить до прояви нейротрансмітерних і нейромодуляторних ефектів вазопресину в центральній нервовій системі. Так, вазопресиніндукована модуляція гіпоталамічних центрів харчової мотивації може спричинити формування анорексичного ефекту [11] та підвищення функціональної активності дорсального моторного ядра блукаючого нерва [7, 11], котрий має прямий стимулюючий вплив на синтез і секрецію інсуліну в підшлунковій залозі [1, 7, 11]. Реалізація периферичних ефектів вазопресину пов'язана з тим, що основні проекції великоклітинних вазопресинсинтезуючих нейронів паравентрикулярного й супраоптичного ядер спрямовані до нейрогіпофіза [16]. Тому гіперфункція нейросекреторних клітин цих утворювань при цукровому діабеті, що спостерігалося за умов експерименту та клініки, призводить до підвищення концентрації вазопресину в периферичній крові [2, 4, 6, 9]. Це може мати компенсаторне значення, враховуючи можливість вазопресину підвищувати секрецію інсуліну, стимулюючи V-1b рецептори β-клітин [10]. Крім цього, добре відомі метаболічні ефекти вазопресину, що спричинюють посилення глікогенолізу й глюконеогенезу та послаблення кетогенезу в печінці [5]. Таким чином, отримані експериментальні результати свідчать, що центральні та периферичні ефекти вазопресину при його хронічному введенні створюють умови для зниження рівня глікемії при діабеті і нормалізації вуглеводного гомеостазу внаслідок стимуляції секреції інсуліну.

Висновки

1. Хронічне інтрацереброventрикулярне введення аргінін — вазопресину інтактним щурам призводить до посилення синтезу інсуліну в β-клітинах підшлункової залози та помірного зниження концентрації глюкози в крові.

2. Хронічне центральне й периферичне введення аргінін — вазопресину щурам з цукровим діабетом стимулює синтез інсуліну в β-клітинах, знижує рівень глікемії, але не впливає на процеси деструкції β-клітин.

3. Ефекти хронічного інтрацереброventрикулярного введення аргінін — вазопресину більш виражені, ніж при його хронічному інтраперитонеальному введенні.

Дослідження фінансовано грантами UDE000 і UDE200 Міжнародної наукової фундації Дж.Сороса.

A. V. Abramov

CHRONICAL ADMINISTRATIONS OF ARGININE-VASOPRESSIN STIMULATE INSULIN'S SYNTHESIS IN BETA-CELLS OF PANCREAS IN INTACT AND DIABETIC RATS

Investigations on the intact and diabetic rats show us that chronical administration of [Arg8]-vasopressin for ten days (intracerebroventricular 24 pg or intraperitoneal 240 ng every day) leds to the increasing of insulin's level in beta-cells of the pancreas in normoglycemic rats to 6, % ± 0,2 % in comparison with the control group, and in hyperglycemic diabetic rats to 25,9 % ± 0,6 % at the intracerebroventricular infusions, and to 15,9 % ± 0,8 % at the intraperitoneal injections. The administrations of vasopressin in animals with experimental diabetes mellitus leds to the devreasing of glycemia's level in average to 37 %, but do not have an influence on the destruction

of Lanhergan's islets. Probably an insulin-stimulating effect of intracerebroventricular infusions of vasopressin is connected with the modulation of functional activity of hypothalamic centres of food behaviour and dorsal motor nucleus of vagal nerve and in peripherial injections vasopressin directly stimulates insulin synthesis.

Zaporozhye Medical University Ministry of Public Health

This works is supported by grants UDE000 and UDE200 of ISF.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Акмаев И.Г.* Современные представления о взаимодействиях гипоталамической нейросекреторной и вегетативной нервной систем в регуляции эндокринной и гомеостатической функций // Морфология. — 1992. — **102**, № 3. — С. 5-39.
2. *Колесник Ю.М.. Василенко Г.В., Абрамов А.В.* Состояние островкового аппарата поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете различной степени тяжести у крыс // Арх. патологии. — 1992. — **54**, № 12. — С. 24-27.
3. *Колесник Ю.М., Василенко Г.В., Абрамов А.В.* Возможные механизмы гипоталамической регуляции эндокринной функции поджелудочной железы у мышей диабетической линии C5BL/KsJ // Там же. — 1994. — **56**, № 4. — С. 56-60.
4. *Колесник Ю.М., Орестенко Ю.Н., Абрамов А.В.* Состояние вазопрессин-, окситоцин- и кортиколиберинсинтезирующих структур гипоталамуса при экспериментальном сахарном диабете у крыс различного пола // Проблемы эндокринологии. — 1993. — **39**, № 1. — С. 45-48.
5. *Папсуевич О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В.* Нейрогипофизарные гормоны. — Рига: Зинатне, 1986. — 283 с.
6. *Brooks D.P., Nutting D.D., Crofton J.T., Share L.* Vasopressin in rats with genetic and streptozotocin-induced diabetes // Diabetes. — 1989. — **38**, № 1. — P. 54-57.
7. *Dreifuss J.J., Tribollet E., Dubois-Dauphin M., Raggenbass M.* Neurohypophysial hormones: neuronal effects in autonomic and limbic areas of the rat brain // Arch. Hystol.and Cytol. — 1989. — **52**, Suppl. — P. 129-138.
8. *Gao Z.-Y., Drews G., Nenguin M., et al.* Mechanisms of the stimulation of insuline relase by arginine-vasopressin in normal mouse islets // J. Biol. Chem. — 1990. — **256**, № 26. — P.15724-15730.
9. *Iwasaki Y., Kondo K., Murase T., et al.* Osmoregulation of plasma vasopressin in diabetes mellitus with sustained hyperglycemia // J.Neuroendocr. — 1996. — **8**, № 10. — P.755-760.
10. *Lee B., Yang C., Chen T.H., et al.* Effect of AVP and oxytocin on insulin release — involvement of V-1b receptors// Amer. J. Physiol.— 1995.— **32**, №6.— P.E1095-E1100.
11. *Leibowitz S.F.* Nutrient intake is modulated by peripheral peptide administration // Obesity Res. — 1995. — **3**, № 1. — P. S569-S572.
12. *Nagai N., Nagai K., Takezawa K. et al.* Supressive effect of vasopressin on the hyperglycemic response to intracranial injection of 2-deoxy-D-glucose // Neurosci. Lett. — 1995. — **190**, № 3. — P. 187-190.
13. *Paulmyerlacroix O., Anglade G., Grino M.* Insulin-inducedhypoglycemia increases colocalization of corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin messenger-RNAs in the rat hypothalamic paraventricular nucleus // J. Mol. Endocr. — 1994. — **13**, № 3. — P. 313-320.
14. *Paxinos G.B., Watson C.C.* The rat brain in stereotaxic coordinates. — Sydney: Academ. Press, 1986.
15. *Richardson S.B., Laya T., Vanooy M.* Vasopressin-stimulated insulin-secretion and inositol phosphate production — interactions with glucose and phorbol esters // J. Endocrin. — 1995. — **145**, № 2. — P. 221-226.
16. *Swanson L.W., Sawchenko P.E.* Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei // Ann. Rev. Neurosci. — 1983. — **6**. — P. 269-324.

Запоріз. мед. ун-т
М-ва охорони здоров'я України

Матеріал надійшов до редакції 14.02.98