

## БИОГЕРОНТОЛОГИЯ

### ВЛИЯНИЕ ПАНКРАГЕНА НА УРОВЕНЬ ГЛЮКОЗЫ КРОВИ, ПРОНИЦАЕМОСТЬ И АДГЕЗИВНОСТЬ МИКРОСОСУДОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

В.Х.Хавинсон, Н.А.Гавришева\*, В.В.Малинин, С.Г.Чефу\*, Е.А.Трофимов\*

*Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН; \*Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова*

Исследовано влияние тетрапептида панкрегена (Lys-Glu-Asp-Trp-NH<sub>2</sub>) на уровень глюкозы крови, проницаемость и адгезивность микрососудов брыжейки крыс Вистар при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Панкреген при пероральном применении обладал выраженным гипогликемическим действием в период приема. При внутримышечном введении панкреген нормализовал адгезивность эндотелия микрососудов брыжейки, не влияя на проницаемость. Полученные результаты свидетельствуют о наличии гомеостатического и эндотелиопротекторного действия панкрегена на ранних сроках сахарного диабета.

**Ключевые слова:** панкреген, стрептозотцин, сахарный диабет, гипергликемия, эндотелий

Сахарный диабет (СД) занимает 3-е место в мире по распространенности после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [3]. Наиболее частой причиной инвалидизации и смертности больных СД являются диабетические ангиопатии — генерализованное повреждение кровеносных микрососудов, сочетающееся с нарушением гемостаза [1,4]. При СД развиваются системные нарушения функции органов, обусловленные состоянием микроциркуляции и транскапиллярного обмена, ключевую роль в регуляции которых играет эндотелий. Пусковым механизмом развития эндотелиальной дисфункции при СД являются метаболические нарушения, в первую очередь гипергликемия [6]. Диабетическая гипергликемия способствует увеличению синтеза мукополисахаридов, что приводит к повышению их уровня в сыворотке крови и отложению в микрососудах почек, сетчатки глаза и других органов. При дефиците инсулина превращение глюкозы в инсулинзависимых тканях происходит, главным образом, по полиольному пути с активацией фермента альдозоредуктазы, в результате чего в сосудистой стенке, хрусталике глаза, нервах и почках накапливаются сорбитол и фруктоза в повышенных осмотически

активных концентрациях. Являясь гидрофильными, эти продукты полиолов способствуют развитию гидропического отека клеток и нарушению активного транспорта веществ через мембраны [1]. Высокая концентрация глюкозы приводит также к неферментативному гликозилированию белков, липидов и других компонентов сосудистой стенки, что изменяет их антигенные и функциональные характеристики, вызывает нарушения проницаемости стенок микрососудов, сужение просвета и уменьшение площади их внутренней поверхности с развитием ишемии и нарушением трофики тканей. Одним из самых тяжелых осложнений СД является ангиосклероз [1,5].

Одним из перспективных пептидных биорегуляторов для фармакологической коррекции метаболических нарушений и эндотелиальной дисфункции при СД является тетрапептид панкреген (Lys-Glu-Asp-Trp-NH<sub>2</sub>; ПГ), синтезированный в Санкт-Петербургском институте биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН.

Целью работы явилось изучение гипогликемического действия ПГ и его влияния на функциональное состояние эндотелия при хронической гипергликемии на модели СД у крыс.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на крысах-самцах Вистар (возраст — 10-12 нед, масса — 170-210 г). Животных содержали при свободном доступе к корму (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 “Информ-корм”) и воде.

С целью моделирования СД животным вводили стрептозотцин (СТ; 50 мг/кг массы внутрибрюшинно однократно в 1 мл 0.9% раствора NaCl). СТ обладает избирательным цитотоксическим действием на  $\beta$ -клетки поджелудочной железы крыс, и через 2-3 нед после введения СТ у экспериментальных животных развивается СД (перманентная гипергликемия, полиурия, глюкозурия).

После введения СТ животным 1-й группы вводили ПГ внутримышечно (10 мкг/мл физиологического раствора) ежедневно в течение 10 сут. Животным 2-й группы ПГ вводили перорально через зонд (100 мкг в измельченной таблетке); объем вводимой взвеси составлял 2 мл ежедневно в течение 10 сут после введения СТ. Крысы 3-й группы после введения СТ по аналогичной схеме получали инъекции физиологического раствора. Группой сравнения служили здоровые интактные животные. Каждая группа состояла из 20 животных.

Уровень глюкозы крови определяли натощак (корм убирали за 14 ч до взятия крови) на 10, 15 и 20-е сутки после введения СТ с использованием глюкометра “Accu Chek”. На 20-е сутки после введения СТ определяли диурез и глюкозу мочи по унифицированной методике на биохимическом анализаторе “COBAS”. Проницаемость и адгезивность эндотелия исследовали на 20-е сутки после введения СТ.

Функциональные свойства эндотелия микрососудов изучали у наркотизированных животных (50 мг/кг тиопентала натрия внутрибрюшинно) комплексным методом прижизненной биомикроскопии [2]. Для изучения микроциркуляции брыжейки извлекали участок тонкой кишки. Брыжейку тонкой кишки, прилежащей к мезоаппендиксу, укладывали на световоде нагревательного термостатированного столика. Температуру столика и объектива поддерживали автоматически на уровне 37.5-38.0°C. Исследуемый участок брыжейки непрерывно со скоростью 0.5 мл/мин орошали подогретым до 37.5°C физиологическим раствором. Все исследования функциональных свойств эндотелия проводили на одном типе микрососудов — венулах диаметром 20-35 мкм, с использованием видео-микроскопического комплекса, состоящего из микроскопа МТ-9 (“ЛОМО”), CCD-видеокамеры (“ISTA Ltd.”), видеомагни-

тофона SLV-X55ME (“Sony”) и телевизора KV-2185MT (“Sony”). Определяли проницаемость эндотелия микрососудов для флюоресцеина Na комплексным методом прижизненной биомикроскопии. В оптическую систему вводили необходимые светофильтры, переводили проходящий световой поток в отраженный, внутривенно вводили флюоресцирующее вещество и производили видеозапись динамики флюоресценции выбранного региона. Видеоматериалы обрабатывали с помощью программно-аппаратного комплекса, включавшего вышеуказанный видеомагнитофон, аналого-цифровой преобразователь AV Master (“Fast Multimedia AG”), установленный на IBM-совместимом персональном компьютере, программы Fast Cap 2.5.0 (“FAST Multimedia Inc.”) и VideoTest 5.0 (“ISTA Ltd.”), что позволяло проводить поккадровый геометрический, скоростной и количественный анализ цифрового видеоизображения.

Основным показателем, характеризующим проницаемость сосудов, является коэффициент проницаемости ( $P$ ), определяемый как количество вещества, способное проходить через известную область (площадь) сосудистой стенки. В качестве индикатора для исследования проницаемости микрососудов был выбран флюорохром Na-флюоресцеин с молекулярной массой 376 Д в дозе 2.5 мг/кг массы. Индикатор разводили непосредственно перед экспериментом в физиологическом растворе и вводили внутривенно в объеме 0.2 мл раствора.

Коэффициент проницаемости рассчитывали по сводному уравнению:

$$P = 0.25 \times dIi(t) \times D \times [Ii(0)/Iv(0)] / [Iv(t) - Ii(t) \times dt],$$

где  $P$  — коэффициент проницаемости (см/с);  $dIi(t)$  — прибавка интенсивности флюоресценции флюорохрома в интерстициальном пространстве (ед. ярк/с);  $D$  — диаметр сосуда;  $Ii(0)$  — исходная средняя яркость вне сосуда при проходящем световом потоке (ед. ярк.);  $Iv(0)$  — исходная средняя яркость внутри при проходящем световом потоке (ед. ярк.);  $Iv(t)$  — интенсивность флюоресценции флюорохрома внутри сосуда (ед. ярк.);  $Ii(t)$  — интенсивность флюоресценции флюорохрома в интерстициальном пространстве (ед. ярк.);  $dt$  — промежуток времени (с).

Исходную картину микроциркуляции для изучения процесса адгезии лейкоцитов к сосудистой стенке записывали на видеопленку в проходящем свете без светофильтров. Видеоматериалы обрабатывали с помощью программно-аппаратного комплекса прижизненной биомикроскопии. Для определения адгезивных свойств эндотелия

использовать метод исследования неокрашенных лейкоцитов. При этом наибольшего контрастирования достигали путем введения в ход лучей освещения объекта светофильтра с длиной волны пропускания 360-560 нм. Адгезированными считали четко контрастированные лейкоциты, неуползшие в течение всего времени измере-

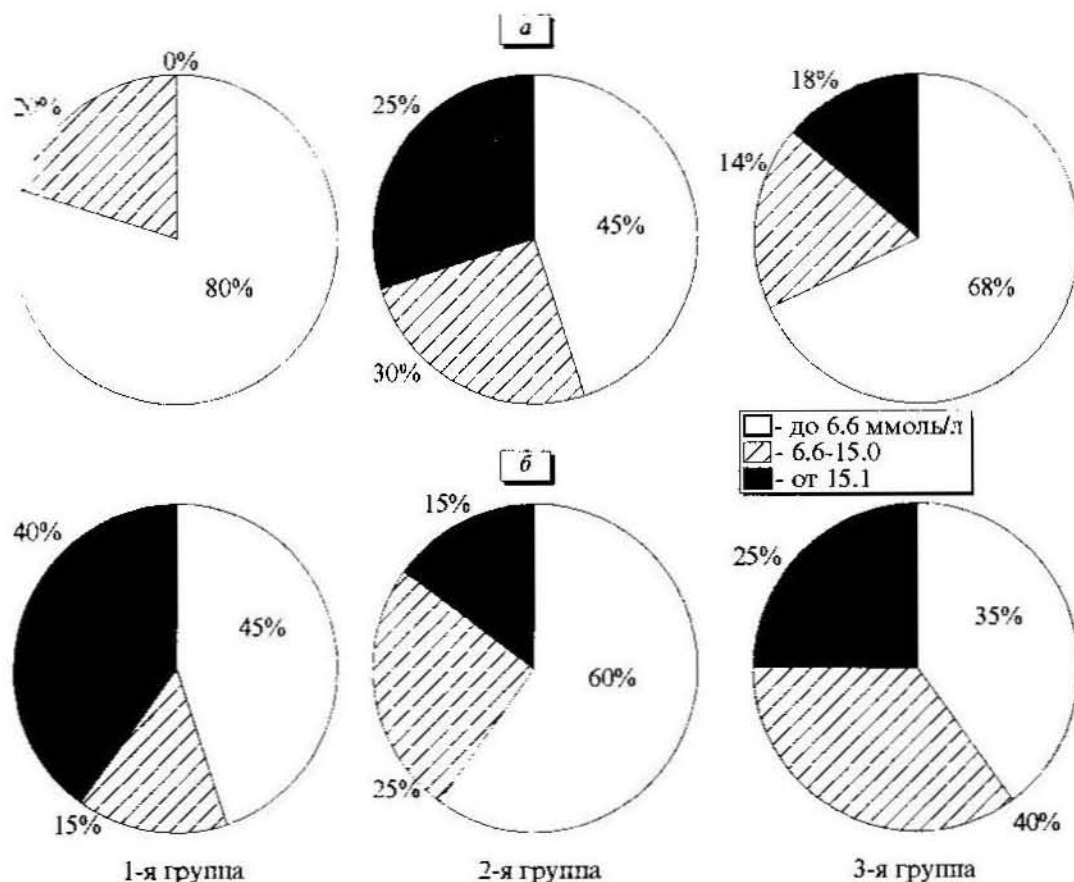
ний (5 с). Определяли отношение количества адгезированных лейкоцитов к площади сосудистой стенки.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью многомерного статистического анализа, используя *t* критерий Стьюдента и *U* критерий Манна-Уитни.

**Влияние Т<sub>2</sub> на уровень глюкозы крови, показатели адгезивности и проницаемости у животных с СТ-индуцированным СД (M±m)**

Показатель	Здоровые животные	Группа		
		1-я	2-я	3-я
Глюкоза крови, ммоль/л				
исходный уровень	4.2±0.4	4.5±0.4	4.6±0.4	4.5±0.3
на 10-е сутки	4.5±0.3	8.0±4.7*	5.6±1.5**	8.2±4.7*
на 20-е сутки	4.4±0.5	8.9±4.0**	9.2±5.3*	9.1±4.8*
Гликемия на 20-е сутки, мл/ч	0.16±0.05	0.61±0.52**	0.95±0.82**	0.50±0.40**
Глюкоза мочи на 20-е сутки, ммоль/л	0	31.4±26.0**	33.3±25.1**	31.4±26.0**
Коэффициент проницаемости на 20-е сутки, ×10 <sup>-5</sup> см/с	1.03±0.21	0.68±0.30*	0.65±0.36*	0.72±0.32*
Адгезивность на 20-е сутки	1.93±0.34	1.93±0.31*	1.22±0.32**	1.30±0.58*

**Примечание.** \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 по сравнению со здоровыми животными; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 по сравнению с 3-й группой.



Распределение крыс с СТ-индуцированным СД по уровню гликемии (ммоль/л) на 10-е (а) и 20-е (б) сутки опыта.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 10-е сутки после введения СТ у 30%, а на 20-е сутки — у большей части животных, не получавших препарат, по данным биохимических анализов крови и мочи был диагностирован СД, что соответствует данной модели (таблица, рисунок). У крыс 2-й группы на 10-е сутки отмечен выраженный гипогликемический эффект ПГ: число животных с гипергликемией было вдвое меньше, чем в контрольной группе после введения СТ. После прекращения приема ПГ эффект не сохранялся, и к 20-м суткам показатели у крыс этой группы практически не отличались от контроля (рисунок).

К 20-м суткам после введения СТ показатели, отражающие морфофункциональное состояние эндотелия, значительно изменялись. Проницаемость сосудистой стенки у большей части животных с СД снижалась по сравнению с контролем. ПГ не влиял на этот показатель транскапиллярного обмена при внутримышечном и пероральном применении (таблица). Адгезивность эндотелия сосудистой стенки у животных 3-й группы снижалась. Внутримышечное введение

ПГ восстанавливало адгезивные свойства эндотелия, при этом значения данного показателя практически не отличались от таковых у здоровых животных, причем вне зависимости от уровня глюкозы крови. При пероральном применении ПГ не влиял на адгезивность эндотелия (таблица). Таким образом, парентеральное введение ПГ оказывало долгосрочное эндотелиопротекторное влияние, а пероральный прием — кратковременный гипогликемический эффект (только в период приема ПГ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И. // Кардиология. 2000. № 10. С. 74-87.
2. Гавришева Н.А., Михайлова И.А., Власов Т.Д. и др. // Патология микроциркуляции и гемостаза/ Под ред. Н.Н.Петрищева. СПб., 1998. С. 246-262.
3. Adeghate E., Schattner P., Dunn E. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2006. Vol. 1084. P. 1-29.
4. Arikawa E., Cheung C., Sekirov I. et al. // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2006. Vol. 84, N 8-9. P. 823-833.
5. Harhaj N.S., Felinski E.A., Wolpert E.B. et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. Vol. 47, N 11. P. 5106-5115.
6. Rodella L., Lamon B.D., Rezzani R. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2006. Vol. 40, N 12. P. 2198-2205.

Получено 31.05.07