

УДК 612.386:616-092.9

ВСАСЫВАНИЕ ГЛЮКОЗЫ В ТОНКОЙ КИШКЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 2

© 2019 г. Л. В. Громова^{1,*}, А. С. Полозов^{1,2}, О. В. Корнюшин², Н. М. Грефнер³,
Ю. В. Дмитриева¹, А. С. Алексеева¹, А. А. Груздков¹

¹ Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

² Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

*e-mail: gromovalv@infran.ru

Поступила в редакцию 22.04.2018 г.

После доработки 21.11.2018 г.

Принята к публикации 04.02.2019 г.

DOI: 10.1134/S0044452919020062

Известно, что одним из факторов, вносящих вклад в развитие гипергликемии при диабете, является повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке благодаря увеличению экспрессии основных транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах [1]. Это позволяет рассматривать всасывание глюкозы в тонкой кишке как ключевой процесс при разработке стратегий, направленных на нормализацию углеводного обмена при диабете. Вместе с тем существующие представления об изменении всасывания глюкозы при диабете и о механизмах, лежащих в основе этих изменений, базируются в основном на данных, полученных в опытах *in vitro* и острых опытах *in vivo*, которые не вполне адекватно отражают реальные закономерности функционирования живых систем [2]. В связи с этим выглядит весьма актуальной задача проанализировать особенности всасывания глюкозы при диабете в условиях, максимально близких к физиологическим, то есть в отсутствие наркоза и операционной травмы. С этой целью в данной работе всасывание глюкозы в тонкой кишке у крыс с экспериментальным диабетом типа 2 и у контрольных животных (в отсутствие диабета) оценивалось по скорости свободного потребления этими животными (после их предварительного голодания) концентрированного раствора глюкозы. Как было показано нами ранее [2], такой подход позволяет вполне объективно судить о скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке крыс в естественных условиях. По окончании опытов у части крыс методами иммуногистохимии и конфокальной микроскопии определялось содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов из тощей кишки.

В работе использовались самцы крыс Вистар (180–200 г), полученные из ЦКП Биокolleкция

ИФ РАН. Опыты проводились в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с животными. Во время опытов крысы содержались на жировой диете (20% белка, 22% жира, 25.4% крахмала и 1.83% сахарозы, в % от влажного веса, принятого за 100). Всасывание глюкозы в тонкой кишке определялось по скорости свободного потребления предварительно голодавшими (18–20 ч) животными 20% раствора глюкозы [2]. До начала опытов с диабетом у всех животных были определены исходные значения скорости всасывания глюкозы (в мкмоль/мин) и сформированы две группы животных: опытная ($n = 12$) и контрольная ($n = 8$) с близкими средними значениями этих скоростей. В опытной группе диабет типа 2 вызывали путем инъекции стрептозотоцина (в/б, доза 30 мг/кг) животным, содержащимся в течение двух месяцев на жировой диете [3]. При тех же условиях контрольным животным вместо стрептозотоцина вводили его растворитель (цитратный буфер, pH 4.5). Через 10 дней после введения указанных препаратов животных тестировали на толерантность к глюкозе, используя тест ОГТТ. В этих опытах уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены крыс, определяли в точке 0 (после голодания в течение 18 ч), а затем, после орального введения животным глюкозы в дозе 2 г/кг массы тела, каждые 30 мин в течение 2-х часов. На основании результатов опытов по всасыванию глюкозы, проводившихся через 21–23 дня после введения стрептозотоцина или цитратного буфера, в опытной группе были выделены животные с выраженными признаками диабета: уровень гликемии по интегральному показателю (площадь под глюкозной кривой в тесте ОГТТ), составлял 29.1–57.7 мМ ч ($n = 6$). У кон-

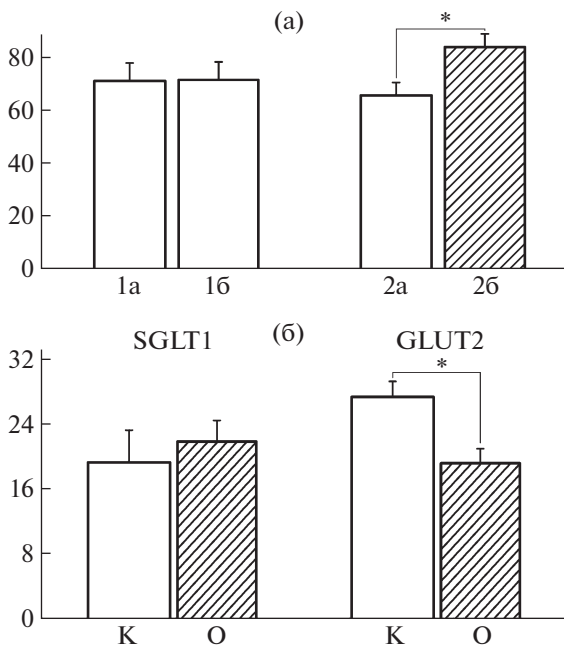


Рис. 1. Влияние экспериментального диабета типа 2 на всасывание глюкозы в тонкой кишке (а) и на содержание транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов (б). По вертикали на (а): скорость всасывания глюкозы (мкмоль/мин), на (б): интенсивность иммунофлуоресценции меток к транспортерам SGLT1 и GLUT2 (пиксель/мкм). Обозначения на (а): 1а и 1б – исходные уровни всасывания глюкозы до введения цитратного буфера в контрольной группе и стрептозотоцина в группе с диабетом, соответственно; 2а и 2б – уровни всасывания глюкозы в тех же группах через 21–23 дня после введения вышеуказанных препаратов; * $p < 0.02$. На (б): К и О – контрольная группа и группа с диабетом через 21–23 дня после введения цитратного буфера и стрептозотоцина, соответственно; * $p < 0.05$. В контрольной группе $n = 5$, в группе с диабетом $n = 6$. Указаны $M \pm SEM$.

трольных животных этот показатель был в диапазоне 10.2–10.8 мМ ч ($n = 5$).

В конце опытов с регистрацией потребления крысами раствора глюкозы, после их декапитации, отбирали образцы ткани из середины тощей кишки для иммуногистохимического анализа транспортеров глюкозы SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах по методике, описанной ранее [4]. Готовые срезы смотрели на конфокальном микроскопе Leica TCS SL (Германия). Содержание транспортеров глюкозы в апикальной мембране энтероцитов, расположенных в верхней трети кишечных ворсинок, оценивалось полуколичественным способом по программе Image J путем измерения интенсивности иммунофлуоресценции на полосках фиксированной длины и ширины, покрывающих апикальную мембрану.

Результаты выражались как $M \pm SEM$. При сравнении средних значений использовали непар-

ный t -критерий Стьюдента. Достоверными считались различия при $P < 0.05$.

После введения стрептозотоцина у крыс опытной группы в течение 4 недель опытов отсутствовал прирост массы тела, тогда как в контроле (введение растворителя препарата) за тот же период наблюдался ее достоверный прирост: 16.5 ± 3.4 г ($p < 0.05$). При этом скорость всасывания глюкозы в тонкой кишке у крыс с диабетом увеличилась на 27.7% ($p < 0.02$), а у контрольных животных – не изменялась по сравнению с исходным уровнем (до введения препаратов) (рис. 1а). Таким образом, в наших опытах, проводившихся в условиях, наиболее близких к естественным, как и в работах других авторов, использовавших острые опыты *in vivo* и *in vitro* [1, 5, 6], наблюдалась повышенная скорость всасывания глюкозы при экспериментальном диабете типа 2. В дополнение к этому у крыс с диабетом нами была впервые обнаружена обратная корреляция между приростом скорости всасывания глюкозы в тонкой кишке и уровнем гликемии по интегральному показателю у тех же животных (коэффициент корреляции $r = -0.71$). Данный факт обусловлен, по-видимому, снижением оттока глюкозы из энтероцитов через базолатеральную мембрану (с участием транспортера GLUT2) в кровь вследствие повышенной концентрации в ней глюкозы. Это может приводить к торможению поступления глюкозы через апикальную мембрану с участием транспортеров SGLT1 и GLUT2. Такое предположение подкрепляется нашими данными о сниженном на 30% ($p < 0.05$) уровне транспортера GLUT2 в апикальной мембране энтероцитов у крыс с диабетом по сравнению с контролем (рис. 1б). Важно отметить, что содержание транспортера SGLT1 в апикальной мембране энтероцитов при этих условиях не менялось по сравнению с контролем. В наших опытах у крыс с диабетом обнаружено также повышение массы слизистой оболочки в тонкой кишке (на 36% в двенадцатиперстной, $p < 0.0027$, и на 78.5% в подвздошной кишке, $p < 0.02$). Такое повышение могло быть следствием увеличения в этих отделах тонкой кишки высоты ворсинок и соответственно численности энтероцитов. Это предположение согласуется с данными других авторов, которые наблюдали у крыс с диабетом, вызванным введением стрептозотоцина, увеличение высоты ворсинок в тощей и подвздошной кишке [6].

Таким образом, у крыс с диабетом типа 2 повышенное всасывание глюкозы в тонкой кишке может происходить за счет прироста в ней массы слизистой оболочки (вследствие увеличения численности энтероцитов). Основной вклад в повышение всасывания глюкозы вносит, по-видимому, ее активный транспорт с участием SGLT1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследова-

ний государственных академий на 2013–2020 гг. (ГП-14, раздел 64) и грантов РФФИ № 18-015-00248 и РФФИ № 17-75-30052.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Song P., Onishi A., Koepsel H., and Vallon V. Sodium glucose cotransporter SGLT1 as a therapeutic target in diabetes mellitus // *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2016. V. 20. № 9. P. 1109–1125.
2. Груздков А.А., Громова Л.В., Дмитриева Ю.В. Алексеева А.С. Скорость свободного потребления крысами раствора глюкозы как критерий оценки ее всасывания в тонкой кишке (Экспериментальное исследование и математическое моделирование) // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2015. Т. 101. № 6. С. 708–720.
3. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin // *Journal of Diabetes Investigation*. 2014. V. 5. № 4. P. 349–358.
4. Грефнер Н.М., Громова Л.В., Груздков А.А., Комиссарчик Я.Ю. Сравнительный анализ распределения транспортеров SGLT1 и GLUT2 в энтероцитах тонкой кишки крыс и клетках Саго 2 при всасывании глюкозы // *Цитология*. 2010. V. 52. № 7. P. 580–587.
5. Wong T.P., Debnam E.S., Leung P.S. Diabetes mellitus and expression of the enterocyte renin-angiotensin system: implications for control of glucose transport across the brush border membrane // *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2009. V. 297. P. C601–C610.
6. Debnam E.S., Smith M.V., Sharp P.A., Srai S.K., Turvey A., Keable S.J. The effects of streptozotocin diabetes on sodium-glucose transporter (SGLT1) expression and function in rat jejunal and ileal villus-attached enterocytes // *Pflugers Arch*. 1995. V. 430. № 2. P. 151–159.

Glucose Absorption in the Rat Small Intestine under Experimental Type 2 Diabetes Mellitus

L. V. Gromova^a, A. S. Polozov^{a,b}, O. V. Korniyushin^b, N. M. Grefner^c,
Yu. V. Dmitrieva^a, A. S. Alekseeva^a, and A. A. Gruzdkov^a

^a Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

^b Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

^c Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia