

УДК 577.17

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМЫХ С-ПЕПТИДА И ИНСУЛИНА НА ТИРЕОИДНЫЙ И АНДРОГЕННЫЙ СТАТУС У САМЦОВ КРЫС СО СРЕДНЕТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ ДИАБЕТА 1-ГО ТИПА

© 2019 г. К. В. Деркач¹, В. М. Бондарева¹, А. О. Шпаков^{1,*}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: alex_shpakov@list.ru

Поступила в редакцию 21.06.2019 г.

После доработки 25.07.2019 г.

Принята к публикации 15.08.2019 г.

Ключевые слова: С-пептид проинсулина, инсулин, интраназальное введение, диабет, тиреоидный гормон, тестостерон

DOI: 10.1134/S0044452919060020

В настоящее время имеются свидетельства того, что С-пептид проинсулина, продукт биосинтеза инсулина в панкреатических β -клетках, контролирует множество физиологических и биохимических процессов в организме [1]. Свои регуляторные эффекты С-пептид может осуществлять самостоятельно или путем образования комплексов с инсулином, усиливая и модулируя тем самым действие инсулина на ткани-мишени [2]. При сахарном диабете 1-го типа (СД1) с характерным для него дефицитом инсулина и С-пептида показан восстанавливающий эффект С-пептида на функции сосудов, на нервную и выделительную системы, установлен его антиоксидантный и противовоспалительный эффекты в различных тканях [3].

Нами ранее показано, что одним из подходов для коррекции метаболических и гормональных нарушений при СД1 является интраназальный способ введения С-пептида и его смеси с инсулином [4, 5]. Это обусловлено восстановлением уровней С-пептида и инсулина в ЦНС и нормализацией центральной регуляции ими физиологических и биохимических процессов в организме. Совместное использование С-пептида и инсулина более эффективно, чем их применение по отдельности. Это может быть обусловлено синергизмом их эффектов на клеточные сигнальные каскады или повышенной активностью гетероолигомерных комплексов инсулина и С-пептида в сравнении с их гомоолигомерными комплексами. Нами показано, что при обработке крыс с СД1 смесью С-пептида и инсулина, взятых в эквимолярных количествах, ослабляется гипергликемия и частично восстанавливается активность аденилатциклазной системы в тканях-мишенях [5], а в случае крыс с декомпенсированным СД2 улучшается чувствительность тка-

ней к инсулину и глюкозе [4]. В основе этого лежит нормализация активности компонентов 3-фосфоинозитидного каскада в гипоталамических нейронах [6]. Поскольку эти нейроны играют ключевую роль в регуляции гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной и -гонадной осей, то интраназальное введение С-пептида и его смеси с инсулином может улучшить тиреоидный и андрогенный статус у крыс с СД1, нарушенный при этой диабетической патологии. Однако такие данные в настоящее время отсутствуют. Необходимо отметить, что, как было показано нами ранее, длительное введение интраназального инсулина крысам с СД1 стимулирует у них выброс тиреотропного гормона (ТТГ) и восстанавливает уровни тиреоидных гормонов [7].

Целью работы было изучить влияние лечения самцов крыс Wistar со среднетяжелым СД1 интраназально вводимыми С-пептидом и инсулином и их смеси на уровни ТТГ, тиреоидных гормонов и тестостерона. Как известно, ТТГ, вырабатываемый тиреотрофами гипофиза в ответ на стимуляцию гипоталамическим фактором тиролиберинном, индуцирует продукцию тироксина тиреоцитами щитовидной железы. Затем тироксин с помощью 2-дейодиназы превращается в трийодтиронин, основной эффекторный гормон тиреоидной оси. Тестостерон, продуцируемый клетками Лейдига семенников в ответ на стимуляцию гонадотропинами, является основным эффекторным гормоном гонадной оси у мужчин.

Для исследований были взяты трехмесячные самцы крыс Wistar. Все эксперименты проводили в соответствии с правилами, утвержденными Этическим Комитетом ИЭФБ РАН (30.12.2015 г.), и требованиями Директивы 1986 Европейского парламента. СД1 индуцировали однократной обработ-

Таблица 1. Масса тела и уровни глюкозы, HbA1c, инсулина, ТТГ и тиреоидных гормонов у крыс со среднетяжелой формой СД1 и влияние на них лечения интраназально вводимыми С-пептидом (36 мкг/кг), инсулином (0.5 МЕ/крысу) и их смесью

Показатель	К, <i>n</i> = 5	Д, <i>n</i> = 5	ДС, <i>n</i> = 5	ДИ, <i>n</i> = 5	ДСИ, <i>n</i> = 5
Масса тела, г	323 ± 11	204 ± 14*	214 ± 18*	223 ± 17*	224 ± 14*
Глюкоза, мМ	4.3 ± 0.3	21.7 ± 3.9*	18.0 ± 3.7*	17.5 ± 2.7*	17.0 ± 3.1*
HbA1c, %	4.1 ± 0.3	10.5 ± 1.8*	8.8 ± 0.6*	7.7 ± 1.2*#	7.8 ± 0.9*#
Инсулин, нг/мл	0.82 ± 0.18	0.15 ± 0.05*	0.16 ± 0.06*	0.13 ± 0.06*	0.17 ± 0.09*
ТТГ, мкМЕ/мл	0.57 ± 0.21	0.27 ± 0.13	0.31 ± 0.14	0.50 ± 0.19	0.67 ± 0.23#
<i>fT</i> ₄ , пМ	29.8 ± 3.9	18.8 ± 2.2*	21.1 ± 4.1	24.5 ± 3.6#	24.1 ± 3.1#
<i>tT</i> ₄ , нМ	129 ± 16	75 ± 12*	87 ± 17*	94 ± 15*	108 ± 16#
<i>fT</i> ₃ , пМ	4.3 ± 0.4	2.6 ± 0.3*	2.5 ± 0.4*	3.4 ± 0.4*#	3.8 ± 0.6#
<i>tT</i> ₃ , нМ	2.8 ± 0.3	2.0 ± 0.3*	2.1 ± 0.5*	2.3 ± 0.3*	2.7 ± 0.5

Примечание. * – различия между контрольной и диабетическими группами статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группой Д и группами ДС, ДИ и ДСИ статистически значимы при $p < 0.05$. Все значения представлены как $M \pm SD$.

кой крыс стрептозотоцином (“Sigma”, США) в дозе 50 мг/кг, растворяя его в 0.1 М Na⁺-цитратном буфере (рН 4.5). Через 5 нед отбирали крыс с уровнем глюкозы выше 15 мМ и рандомизировали их на 4 группы, в каждой по 5 крыс. Контрольной группе вместо стрептозотоцина вводили буфер. Были сформированы следующие группы (во всех $n = 5$): контроль (К), диабетические крысы, получавшие физиологический раствор (Д), обработанные интраназально вводимым С-пептидом в дозе 36 мкг/крысу (ДС), интраназально вводимым инсулином в дозе 0.5 МЕ/крысу (ДИ) или их смесью в тех же дозах (ДСИ). Продолжительность лечения составила 7 суток. Уровень глюкозы в крови, полученной из хвостовой вены, измеряли с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США). Уровни инсулина и ТТГ оценивали с использованием иммуноферментных наборов Rat Insulin ELISA (“Merco-dia AB”, Швеция) и Rat TSH ELISA (“Cusabio Bio-tech. Co., Ltd.”, Wuhan, China). Содержание гликированного гемоглобина (HbA1c) измеряли с помощью набора Multi Test HbA1c System (“Poly-mer Technology Systems, Inc.”, США). Уровни свободного (*fT*₄) и общего (*tT*₄) тироксина, свободного (*fT*₃) и общего трийодтиронина (*tT*₃) и тестостерона оценивали с помощью наборов фирмы “Иммунотех” (Россия). Измерения оптической плотности проводили с использованием спектро-фотометра Anthos Absorbance Reader 2020 (“Anthos Labtec Instruments”, Австрия). Забор крови для определения уровней ТТГ и тиреоидных гормонов проводили на седьмой день эксперимента, в 13.00, через 3 ч после интраназального введения препара-тов, в то время как уровень тестостерона измеряли в 13.00 до начала и на третий, пятый и седьмой дни эксперимента. Данные представлены как $M \pm SD$. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения

двух выборок с нормальным распределением использовали *t*-критерий Стьюдента, для сравнения трех и более групп – дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0.05$.

У крыс с СД1 масса тела была значительно снижена в сравнении с контролем. В диабетических группах перед лечением она составила 197 ± 6 г ($n = 20$), что почти в полтора раза ниже, чем в контроле (296 ± 10 г, $n = 5$). При лечении диабетических крыс С-пептидом и инсулином отмечали тенденцию к повышению массы тела, хотя ни в одном случае различия с группой Д не были статистически значимыми (табл. 1). В диабетических группах перед началом лечения отмечали сильно выраженную гипергликемию и относительный дефицит инсулина. Так, уровень постпрандиальной глюкозы в них составил 20.4 ± 0.8 мМ ($n = 20$), что в 4.5 раза выше, чем в контроле (4.5 ± 0.4 мМ, $n = 5$). Содержание HbA1c у диабетических крыс было значительно повышено в сравнении с контрольными животными ($10.7 \pm 0.9\%$, $n = 20$, vs. $4.2 \pm 0.4\%$, $n = 5$, $p < 0.05$). В то же время уровень инсулина в крови диабетических крыс был ниже, чем в контроле (0.19 ± 0.04 нг/мл, $n = 20$, vs. 0.71 ± 0.19 мМ, $n = 5$, $p < 0.05$). При лечении инсулином и смесью С-пептида и инсулина ослаблялась гипергликемия и снижался уровень HbA1c, однако в группах ДИ и ДСИ статистически значимо от группы Д отличалось только содержание HbA1c. При этом уровни инсулина при всех вариантах лечения не менялись (табл. 1).

Исследование тиреоидной системы показало, что у диабетических крыс достоверно снижены уровни тиреоидных гормонов, а также имеется тенденция к снижению уровня ТТГ, хотя различия с контролем в этом случае не были статистически значимыми ($p = 0.053$) (табл. 1). Лечение инсули-

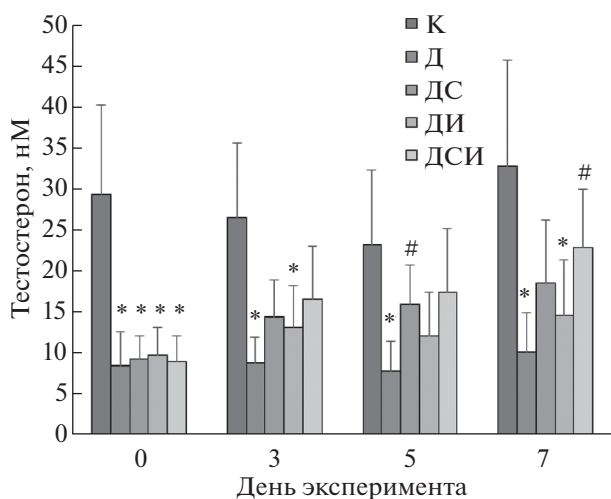


Рис. 1. Влияние лечения крыс с СД1 с помощью интраназально вводимых С-пептида и инсулина на уровни тестостерона в крови животных

Принятые сокращения: контрольная группа (К); крысы с сахарным диабетом 1-го типа без лечения (Д); диабетические крысы, получавшие в течение семи дней лечение интраназально вводимыми С-пептидом (ДС) или инсулином (ДИ) или их смесью (ДСИ). Взятие крови для измерения концентрации тестостерона осуществляли за день до начала эксперимента (точка "0"), а также на третий, пятый и седьмой дни эксперимента (в 13.00). * – различия между контрольной и диабетическими группами статистически значимы при $p < 0.05$; # – различия между группой Д и группами ДС, ДИ и ДСИ статистически значимы при $p < 0.05$. Все значения представлены как $M \pm SD$.

ном и его смесью с С-пептидом частично восстанавливало эти показатели, в то время как С-пептид в отдельности был не эффективен. Основываясь на этих результатах и на данных, полученных нами ранее при исследовании длительного введения диабетическим крысам одного интраназального инсулина [7], можно заключить, что поступающий в структуры мозга инсулин положительно влияет на гипоталамические нейроны, продуцирующие тиролиберин, и это приводит к повышению уровня ТТГ и усилению его регуляторного влияния на синтез и секрецию тиреоидных гормонов щитовидной железой. В комплексе с С-пептидом инсулин действует более эффективно, на что указывает обнаруженное нами усиление его стимулирующего эффекта на тиреоидную ось в группе ДИ (табл. 1).

Уровни тестостерона во всех диабетических группах до начала лечения были значимо снижены и составляли в среднем около 30% от таковых в контроле (рис. 1). Через 3 и 5 дней после начала лечения отмечали повышение уровня тестостерона во всех группах, в наибольшей степени в группах ДС и ДСИ. По окончании эксперимента, на седьмой день, уровни тестостерона в группах ДС и ДСИ превышали таковые в группе Д на 83 и 126%, причем различия между группами Д и ДСИ были ста-

тистически значимы (рис. 1). При повышении продолжительности лечения восстанавливающий эффект С-пептида как при раздельном применении, так и в смеси с инсулином, не только сохранялся, но даже усиливался, в то время как соответствующий эффект инсулина, напротив, ослабевал, и к седьмому дню становился небольшим (рис. 1). Это может быть обусловлено тем, что С-пептид в комплексе с эндогенным или дополнительно вводимым инсулином активирует сигнальные пути в гипоталамических нейронах, ответственные за продукцию гонадолиберина и активацию гонадной оси.

Таким образом, совместное интраназальное введение инсулина и С-пептида оказывает выраженный восстанавливающий эффект на продукцию тиреоидных гормонов и тестостерона у самцов крыс со среднетяжелой формой СД1. Монотерапия инсулином эффективно влияла только на восстановление продукции тиреоидных гормонов, в то время как монотерапия С-пептидом – на восстановление синтеза тестостерона, причем в обоих случаях монотерапия менее эффективна, чем комбинированная терапия. Совокупность полученных данных свидетельствует о синергизме стимулирующих эффектов инсулина и С-пептида на гипоталамические звенья тиреоидной и гонадной осей, что дает дополнительные свидетельства в пользу гипотезы о функциональной важности образования гетероолигомерных комплексов между инсулином и С-пептидом [2], в том числе для осуществления гипоталамической регуляции эндокринных функций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана РФФИ (№ 18-015-00144) и государственным заданием АААА-А18-118012290427-7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу и использованию животных выполняли в соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН, European Communities Council Directive 1986 (86/609/ЕЕС) и "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals". Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wahren J., Kallas A., Sima A.A.* The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes*. 61 (4): 761–772. 2012.
2. *Landreh M., Johansson J., Jörnvall H.* C-peptide: a molecule balancing insulin states in secretion and diabetes-associated depository conditions. *Horm. Metab. Res.* 45 (11): 769–773. 2013.

3. *Luppi P., Drain P.* Autocrine C-peptide mechanism underlying INS1 beta cell adaptation to oxidative stress. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 30: 599–609. 2014.
4. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Shpakov A.O.* Coadministration of intranasally delivered insulin and proinsulin C-peptide to rats with the types 1 and 2 diabetes mellitus restores their metabolic parameters. *Adv. Gerontol.* 8 (2): 139–146. 2018.
5. *Derkach K.V., Bondareva V.M., Perminova A.A., Shpakov A.O.* C-peptide and insulin during combined intranasal administration improve the metabolic parameters and activity of the adenylate cyclase system in the hypothalamus, myocardium, and epididymal fat of rats with type 2 diabetes. *Cell Tiss. Biol.* 13 (3): 228–236. 2019.
6. *Derkach K.V., Perminova A.A., Buzanakov D.M., Shpakov A.O.* Intranasal administration of proinsulin C-peptide enhances the stimulating effect of insulin on insulin system activity in the hypothalamus of diabetic rats. *Bull. Exp. Biol. Med.* 167 (3): 351–355. 2019.
7. *Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O.* The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Horm. Metab. Res.* 47 (2): 916–924. 2015.

REGULATORY EFFECTS OF INTRANASAL C-PEPTIDE AND INSULIN ON THYROID AND ANDROGENIC STATUS OF MALE RATS WITH MODERATE TYPE 1 DIABETES MELLITUS

K. V. Derkach^a, V. M. Bondareva^a, and A. O. Shpakov^{a,#}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#] *e-mail: alex_shpakov@list.ru*

Keywords: proinsulin C peptide, insulin, intranasal administration, diabetes mellitus, thyroid hormone, testosterone