

УДК 616.379-008.64-092.9

А. А. ЧИРКИН, Е. О. ДАНЧЕНКО, Т. А. ТОЛКАЧЕВА,
О. М. БАЛАЕВА-ТИХОМИРОВА, С. С. СТУГАРЕВА

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ САХАРНОГО ДИАБЕТА У ЛЕГОЧНЫХ ПРСНОВОДНЫХ МОЛЛЮСКОВ

Витебский государственный университет имени П.М. Машиерова, Витебск, Беларусь

Моделирование биохимических признаков сахарного диабета у легочных пресноводных моллюсков (*Lymnaea stagnalis* и *Planorbis corneus*) проводили путем введения стрептозотоцина. Установлено, что после введения стрептозотоцина повышается содержание глюкозы в гемолимфе моллюсков и уменьшается содержание гликогена в тканях гепатопанкреаса. Эти изменения связаны с накоплением малонового диальдегида и активацией каталазы. Экстракт гемолимфы куколок дубового шелкопряда способен препятствовать изменениям биохимических показателей, вызванных введением стрептозотоцина.

Ключевые слова: легочные пресноводные улитки, стрептозотоцин, моделирование диабета, экстракт куколок дубового шелкопряда.

Введение. Метаболический синдром и сахарный диабет относятся к основным причинам заболеваемости и смертности населения. В патогенезе этих состояний видное место занимают нарушения биосинтеза инсулина и инсулинорезистентность тканей. Для моделирования этих процессов чаще всего применяют экзогенные вещества, нарушающие функционирование инсулин-продуцирующих клеток или состояние инсулиновых рецепторов плазматических мембран клеток-мишеней. Считают, что наиболее адекватной моделью является введение животным стрептозотоцина – препарата, получаемого из бактерий *Streptomyces achromogenes*. После однократного введения стрептозотоцина наблюдают две фазы гипергликемии: первая развивается в течение 1–4 ч и связана с уменьшением концентрации инсулина в плазме, вторая (финальная, устойчивая) – через 24–36 ч и характеризуется лабораторными признаками, характерными для диабета. Основной причиной повреждения инсулиноцитов стрептозотоцином является алкилирование биологических макромолекул, включая ДНК. Этот процесс сопряжен с нарушением энергетического обмена, уменьшением тканевых резервов НАД⁺ и АТФ, дисфункцией митохондриальных ферментов и митохондриального генома. Другой причиной цитотоксического действия стрептозотоцина может быть избыточное образование оксида азота за счет повышенной экспрессии NO-синтазы. Следствием этого является повреждение инсулиноцитов за счет развития окислительного стресса с участием свободных нитрозных радикалов-пероксинитритов, а также супероксидного анион-радикала, гидроксильного радикала и продукта катаболизма адениловых нуклеотидов – мочевой кислоты. Гибель инсулиноцитов после введения стрептозотоцина происходит за счет сочетания некротических изменений с активацией апоптоза [4–6].

При всех преимуществах моделирования сахарного диабета у млекопитающих имеется существенный недостаток, связанный с наличием системы замкнутого кровообращения, вследствие чего вводимые гидрофильные молекулы стрептозотоцина должны преодолевать гемато-клеточные барьеры и зависеть от нейрогуморальных механизмов регуляции кровообращения. В идеальном варианте модельная система должна включать клетки-продуценты инсулина, клетки-мишени для инсулина и биологическую жесткость, связывающую оба типа клеток. В эту трехкомпонентную систему следует вводить стрептозотоцин и в ней определять инсулинзависимые метаболиты. Такая модель была создана путем введения моллюскам прудовика и катушки стрептозотоцина. Это через 24 ч привело к повышению

уровня гексоз в гемолимфе и развитию диабетоподобного состояния. Через 3-е суток уровень гексоз в гемолимфе снижался [3, 9].

Целью работы явилось исследование действия экзогенных веществ, способных повышать или снижать содержание глюкозы в гемолимфе легочных пресноводных моллюсков. Для повышения уровня глюкозы в гемолимфе выбран стрептозотозин, для снижения его – экстракт куколки дубового шелкопряда (ЭКДШ). Ранее было показано, что препарат ЭКДШ препятствовал развитию инсулинорезистентности в эксперименте за счет антиоксидантного эффекта [1, 7].

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 144 особях легочных пресноводных моллюсков – прудовиках (*Lymnaea stagnalis*) и катушках (*Planorbis barbus cornuus*), разделенных на 18 групп по 8 моллюсков в каждой. Моллюски имеют незамкнутую кровеносную систему, поэтому гемолимфа омывает клетки тканей. Транспорт кислорода у прудовиков осуществляет медьсодержащий пигмент гемоцианин, а у катушек – железосодержащий гемоглобин. Считают, что организмы с гемоцианином более чувствительны к избытку углекислого газа [8]. Стрептозотозин готовили на 1М цитратном буфере и вводили в ногу животного с помощью инсулинового шприца в количестве 65 мкг/г массы тела; ЭКДШ – в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела. Контрольная группа моллюсков не подвергалась никаким воздействиям, а моллюскам групп соответствующего контроля вводили вместо стрептозотозина буферный раствор. Для исследования использовали гемолимфу, которую отбирали при раздражении ноги иголкой, и гомогенат ткани гепатопанкреаса моллюсков, приготовленный на холоду в 0,025М трис-НСl буфере (рН 7,4). Количество глюкозы оценивали в гемолимфе глюкозооксидазным методом с помощью наборов фирмы «Диакон Диасис» в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию гликогена гепатопанкреаса определяли по методу О. Yilmaz [10], малонового диальдегида (ТБК-реактивных субстанций, ТБКРС) по методу М. Uchiyama [11] и концентрацию восстановленного глутатиона – по методу С. R. Krisman [12]. Активность каталазы в гомогенате гепатопанкреаса определяли по М.А. Королуку [2]. Весь цифровой материал вводили для хранения и обработки в таблицы Microsoft Excel и Statistica. Для проверки нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова–Смирнова. После проверки на правильность распределения цифровой материал обрабатывали методами параметрической статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. В табл. 1 представлены данные о влиянии стрептозотозина и ЭКДШ на содержание глюкозы в гемолимфе улиток.

Табл. 1. Влияние стрептозотозина и ЭКДШ на содержание глюкозы в гемолимфе моллюсков

Показатель	Содержание глюкозы, моль/л	
	Прудовики	Катушки
Контроль	0,34±0,033	0,26±0,042
Буфер, 1-е сутки	0,37±0,071	0,22±0,041
Стрептозотозин, 1-е сутки	0,69±0,049*,**	0,42±0,039*,**
ЭКДШ, 1-е сутки	0,33±0,036***	0,33±0,040
ЭКДШ + стрептозотозин, 1-е сутки	0,30±0,037***	0,21±0,062***
Буфер, 2-е сутки	0,32±0,031	0,26±0,095
Стрептозотозин, 2-е сутки	0,50±0,049*,**	0,29±0,035
ЭКДШ, 2-е сутки	0,19±0,020*,***	0,14±0,031***
ЭКДШ + стрептозотозин, 2-е сутки	0,21±0,019*,***	0,19±0,066

Примечание: Здесь и в табл. 2, 3 * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем, ** – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем, *** – $p < 0,05$ по сравнению с группой «стрептозотозин»

Из приведенных данных следует, что в гемолимфе прудовиков и катушек до эксперимента, а также после введения буферного раствора содержалось одинаковое количество глюкозы. Через 24 ч после введения стрептозотозина отмечено повышение содержания глюкозы в гемолимфе моллюсков, причем у прудовиков это повышение было выражено сильнее, чем у катушек ($p < 0,01$). Спустя 48 ч у прудовиков сохранялось повышенное содержание глюкозы в гемолимфе, а у катушек оно нормализовалось. Следовательно, у прудовиков стрептозотозин вызывал более выраженное «гипергликемическое» действие по сравнению с катушками. Через 24 ч препарат ЭКДШ препятствовал повышению уровня глюкозы, вызванному стрептозотозином, а через 2-е суток обеспечивал снижение содержания

глюкозы в гемолимфе прудовиков. У катушек изменения носили аналогичный характер, но были менее выражены. Таким образом, прудовики с гемоцианином оказались более чувствительными к действию стрептозотина по сравнению с катушками, обладающими другим переносчиком кислорода (гемоглобин).

В связи с этими результатами представляло интерес исследование содержания гликогена в гепатопанкреасе улиток (табл. 2). Оказалось, что содержание гликогена в гепатопанкреасе у интактных улиток, а также после введения буферного раствора было одинаковым. Введение стрептозотина через 24 ч и 48 ч вызвало уменьшение содержания гликогена в гепатопанкреасе у прудовиков и катушек в 3–4 раза. Эти изменения оказались синхронными с повышением содержания глюкозы в гемолимфе. Можно полагать, что этот эффект подтверждает тот факт, что стрептозотин блокирует гликогеногенез, управляемый в нормальных условиях инсулином.

Табл. 2. Влияние стрептозотина и ЭКДШ на содержание гликогена в гепатопанкреасе моллюсков

Показатель	Содержание гликогена, мг/г	
	Прудовики	Катушки
Контроль	20,1±3,76	18,5±4,50
Буфер, 1-е сутки	17,1±1,72	21,4±2,08
Стрептозотин, 1-е сутки	6,9±0,88*,**	4,50±0,39*,**
ЭКДШ, 1-е сутки	17,0±0,56***	16,9±4,48***
ЭКДШ + стрептозотин, 1-е сутки	16,7±0,64***	22,2±4,21***
Буфер, 2-е сутки	17,3±1,22	19,2±0,53
Стрептозотин, 2-е сутки	5,2±0,21*,**	5,30±0,29*,**
ЭКДШ, 2-е сутки	19,6±0,28***	27,1±4,36***
ЭКДШ + стрептозотин, 2-е сутки	20,7±0,35***	30,6±5,38***

Введение ЭКДШ у обоих видов улиток способствовало сохранению содержания гликогена в гепатопанкреасе в течение 2 сут после введения стрептозотина. В предшествующих экспериментах на крысах был выявлен положительный эффект ЭКДШ на показатели метаболизма при развитии инсулинорезистентности, вызванной высокожировой диетой: уменьшились гипергликемия, концентрация инсулина и кортикостерона в сыворотке крови, индекс Нота, увеличилось содержание гликогена в печени, нормализовалась активность фосфорилазы гликогена, фосфоглюкомутазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы, глюкозо-6-фосфатазы, рибозо-5-фосфатметаболизирующих ферментов, транскетолазы, обнаружена тенденция к нормализации активности фосфофруктокиназы, альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата, гексокиназы и глюкокиназы. Наиболее выраженный эффект отмечался при использовании экстракта в дозе 7 мкг свободных аминокислот/100 г массы тела [1]. По всей видимости эти положительные эффекты ЭКДШ проявились и в экспериментах с применением стрептозотина у легочных пресноводных улиток.

Ранее показано, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда формируется в процессе запрограммированной гибели клеток и в периоде диапаузы накапливает антиоксидантный потенциал за счет разрушения макромолекул (увеличение количества мочевой кислоты, свободных аминокислот). Эндогенная антиоксидантная система гемолимфы содержит витамины С, А, Е, мочевую кислоту, аминокислоты, глутатион, биофлавоноиды, которые распределены в составе трех групп веществ (макромолекулы, пептиды-аминокислоты и низкомолекулярные биорегуляторы). Антиоксидантная активность гемолимфы при действии адгезии, хемотаксического фактора fMet-Leu-Phe и латекса на нейтрофильные лейкоциты проявляется в разведениях $1:10^1 - 1:10^2$. Гемолимфа и ее фракции не оказывают цитотоксического действия на нормальные фибробласты кожи и их рост усиливается лизин- и аргининсодержащими фракциями [7]. Поэтому были проведены исследования, которые позволили ориентировочно оценить роль окислительного стресса в формировании гипергликемических эффектов стрептозотина в экспериментах у легочных пресноводных улиток (табл. 3).

Установлено, что стрептозотин увеличивал вдвое содержание в гепатопанкреасе ТБКРС (ориентировочно малонового диальдегида – важного показателя свободнорадикальных процессов) и активность антиоксидантного фермента каталазы. Препарат ЭКДШ препятствовал таким изменениям, вероятно, за счет компонентов антиоксидантной системы экстракта. Вклад восстановленного глутатиона в ингибирование окислительного стресса не так очевиден. Можно

лишь отметить положительные изменения в содержании восстановленного глутатиона через 24 ч после введения стрептозотоцина у прудовиков и через 48 ч – у катушек. Однако следует отметить, что стрептозотин у прудовиков вызывал повышение содержания восстановленного глутатиона через 24 ч, а у катушек – снижение содержания восстановленного глутатиона уже через 48 ч. Возможно, это связано с различными механизмами транспорта кислорода у этих двух видов улиток.

Табл. 3. Влияние стрептозотоцина и ЭКДШ на содержание ТБКРС, активность каталазы и восстановленного глутатиона в гепатопанкреасе моллюсков

Группа улиток	ТБКРС, мкмоль/г	Каталаза, мкмоль/г/мин	SH-глутатин, мкмоль/г
Прудовики			
Контроль	12,1±1,15	13,6±1,72	0,048±0,003
Буфер, 1-е сутки	10,1±3,13	14,6±2,73	0,058±0,005
Стрептозотин, 1-е сутки	31,3±1,73*,**	32,1±1,59*,**	0,066±0,002*
ЭКДШ, 1-е сутки	11,8±0,89***	13,2±1,23***	0,045±0,004***
ЭКДШ + стрептозотин, 1-е сутки	12,3±0,67***	13,9±1,54***	0,042±0,003***
Буфер, 2-е сутки	12,9±2,64	15,0±1,24	0,046±0,006
Стрептозотин, 2-е сутки	38,4±3,31*,**	30,3±3,82*,**	0,049±0,004
ЭКДШ, 2-е сутки	14,5±0,66***	15,8±3,46***	0,050±0,005
ЭКДШ + стрептозотин, 2-е сутки	13,5±0,61***	14,7±2,01***	0,048±0,007
Катушки			
Контроль	11,2±0,91	17,6±1,65	0,069±0,003
Буфер, 1-е сутки	9,9±0,56	18,1±1,13	0,070±0,003
Стрептозотин, 1-е сутки	19,2±0,81*,**	25,0±1,85*,**	0,052±0,003*
ЭКДШ, 1-е сутки	9,4±0,77***	19,5±2,66***	0,068±0,005
ЭКДШ + стрептозотин, 1-е сутки	11,1±1,49***	16,4±3,32***	0,060±0,002
Буфер, 2-е сутки	11,4±2,75	17,3±2,09	0,064±0,005
Стрептозотин, 2-е сутки	47,5±2,62*,**	26,2±1,22*,**	0,041±0,002*,**
ЭКДШ, 2-е сутки	10,0±1,99***	15,6±1,72***	0,068±0,005***
ЭКДШ + стрептозотин, 2-е сутки	21,6±1,71*,**,*	15,1±3,56***	0,056±0,002*,**

Заключение. Проведенные исследования показали, что стрептозотиновая модель сахарного диабета 1-го типа у легочных пресноводных улиток является доступной и отличается дешивизной. В относительно простой системе незамкнутого кровообращения достигается прямой эффект взаимодействия компонентов гемолимфы с клетками тканей. Используя эту модель, удалось испытать антидиабетогенное действие ЭКДШ по двум направлениям: 1) защита обмена углеводов; 2) антиоксидантное действие.

Литература:

- [1] Балаева-Тихомирова О. М. Гормонально-метаболические взаимосвязи при развитии синдрома инсулинорезистентности. Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2013. 176 с.
- [2] Королюк М. А. // Лаб. дело. 1988. №1. С. 16–19.
- [3] Кузнецова Л. А. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2007. Т. 43, № 6. С. 460–467.
- [4] Можейко Л. А. // Журнал ГрГМУ. 2013. № 4. С. 5–10.
- [5] Можейко Л. А. // Новости мед.-биол. наук. 2014. Т. 10, № 3. С. 128–133.
- [6] Пальчикова Н. А. // Бюллетень СО РАМН. 2013. Т. 33, № 6. С. 18–24.
- [7] Толкачева Т. А. Гистологиз: теория и практика: монография. Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова. 2015. 136с.
- [8] Чиркин А. А., Данченко Е. О., Бокуть С. Б. Биохимия филогенеза и онтогенеза. Минск: Новое знание; М.: ИНФРА-М. 2012. 288 с.
- [9] Шпаков А. О. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. Т. 146, № 10. С. 404–408.
- [10] Kristman C. R. // Anal. Biochem. 1962. Vol. 4. P. 17–23.
- [11] Uchiyama M. // Analit. Biochem. 1978. Vol. 86. P. 271–278.
- [12] Yilmaz O. // J. Animal Vet. Adv. 2009. Vol. 8. P. 343–347.

Поступила в редакцию: 18.07.2016 г.

A. A. CHIRKIN, E. O. DANCHENKO, T. A. TOLKACHEVA, O. M. BALAEVA-TIKHOMIROVA,
S. S. STUGAREVA

**MODELLING OF BIOCHEMICAL SIGNS OF DIABETES IN PULMONARY
FRESHWATER MOLLUSKS**

Vitebsk State University named after P.M. Masherov, Vitebsk, Belarus

Summary

Modelling of biochemical signs of diabetes in pulmonary freshwater mollusks (*Lymnaea stagnalis* and *Planorbium corneus*) produced by introducing of streptozotocin. It was established that after the administration of streptozotocin increased glucose in the hemolymph of molluscs and reduced glycogen content in tissues of hepatopancreas. These changes are associated with the accumulation of malondialdehyde and catalase activation. Extract the hemolymph of silkworm pupae of oak is able to prevent changes in biochemical parameters caused by administration of streptozotocin.

Key words: pulmonary freshwater snails, streptozotocin, modeling of diabetes, the extract of silkworm pupae of oak.