

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА  
«ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ  
ІМ. В.Я.ДАНИЛЕВСЬКОГО» АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**

**ТРЖЕЦИНСЬКИЙ СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ**

УДК 615.357:577.175.82].015:616.379-008.64-092.9

**ВПЛИВ ЕКЗОГЕННИХ НЕЙРОПЕПТИДІВ НА ЕНДОКРИННУ ФУНКЦІЮ  
ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА АСОЦІЙОВАНІ МЕТАБОЛІЧНІ ПРОЦЕСИ В  
НОРМІ І ПРИ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ  
(експериментальне дослідження)**

**14.01.14 – ендокринологія**

**Автореферат**  
дисертації на здобуття наукового ступеня доктора  
біологічних наук

Харків – 2011

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті МОЗ України

**Науковий консультант:** доктор медичних наук, професор **Колесник Юрій Михайлович**, Запорізький державний медичний університет, ректор, завідувач кафедри патологічної фізіології

**Офіційні опоненти:**

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Калинська Людмила Миколаївна**, Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України», головний науковий співробітник відділу фундаментальних проблем ендокринології;

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Горбенко Наталія Іванівна**, Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», завідувачка відділу експериментальної фармакології і токсикології;

доктор медичних наук **Михайличенко Тетяна Євгенівна**, Донецький національний медичний університет ім. М. Горького, доцент кафедри клінічної імунології, алергології та ендокринології.

Захист відбудеться « 19 » травня 2011 р. о 13.00 годині на засіданні спеціалізованої ради Д 64.564.01. при Державній установі «Інституті проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України» за адресою: 61002, м. Харків, вул. Артема, 10.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України» (61002, м. Харків, вул. Артема, 10).

Автореферат розісланий « 12 » квітня 2011р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
кандидат біологічних наук

Ж.А. Лещенко

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Однією з найбільш актуальних проблем клінічної медицини є хвороби обміну речовин і, зокрема, цукровий діабет (ЦД), який посідає лідируючі позиції не лише в структурі ендокринних хвороб, але і серед захворювань неінфекційної природи. Частота ЦД в промислово розвинених країнах складає в середньому 3-6 % загальної чисельності населення. Згідно з оцінками ВОЗ і Міжнародної Діабетичної Асоціації кількість хворих на ЦД збільшилася зі 100 млн. у 1994 році до 246 млн. у 2007 році, а за прогнозами в 2025 році хвороба може досягти 380 млн, серед яких 95 % складатимуть хворі на ЦД 2 типу (Wild S. et al., 2004).

В Україні за офіційною статистикою нараховують біля одного мільйона хворих на ЦД, проте їх реальна кількість може бути в кілька разів більшою (Тронько М.Д., 2000; Ефімов А.С., Маньковський Б.М., Костюк Е.П та співавт. 2000). Велика соціальна значущість цього захворювання полягає в тому, що воно призводить до ранньої інвалідазації і летальності у зв'язку з судинними ускладненнями діабету, серед яких - діабетичні мікроангіопатії, макроангіопатії та невропатії, гангрена, інфаркт міокарду, інсульт (Campbell R.K., Martin T.M., 2009).

Попри те, що довгий час ЦД 1 типу розглядали як результат незворотної втрати панкреатичних бета-клітин, а початковою причиною розвитку ЦД 2 типу вважали інсулінорезистентність, на сьогодні основною патогенетичною ланкою, що пов'язує обидва типи ЦД, називають дефіцит маси бета-клітин і відповідне зниження секреції інсуліну (Meier J.J., 2008).

Припускають, що однією з основних причин значного зниження маси панкреатичних бета-клітин як при 1 типі, так і при 2 типі ЦД є посилення в них апоптичних процесів (Butler A.E., Janson O., 2003; Campbell R.K., 2009).

Відповідно до сучасних уявлень про патогенез ЦД 2 типу він є результатом прогресуючого погіршення функціональної активності панкреатичних бета-клітин на тлі хронічної інсулінорезистентності. Центральна роль дисфункції бета-клітин у патогенезі ЦД 2 типу була підтверджена такими широкомасштабними клінічними дослідженнями, як UKPDS, ADOPT і Belfast Diet Study, які встановили зниження секреторної активності інсулін-продукуючих клітин до 28 % від норми за шість років захворювання незалежно від виду антидіабетичної терапії (Del Prato S. et al., 2007; Bonora, E., 2008).

Оскільки існуюча фармакотерапія ЦД 2 типу не перешкоджає зниженню функції бета-клітин, що неминує призводить до погіршення глікемічного контролю і прогресування діабетичних мікро- і макросудинних ускладнень, особливої актуальності набуває пошук нових фармакологічних засобів, які здатні забезпечити збереження ендокринної функції підшлункової залози.

За останні роки накопичені численні факти, що вказують на участь гіпоталамічних структур і синтезованих в цих структурах нейропептидів у регуляції та моделюванні ендокринної функції, секреції гормонів, так і їх периферійні ефекти (Слепушкин С.Д., 1988), зокрема, ендокринної функції підшлункової залози (Askermann A.M., Gannon M., 2007; Колесник Ю.М., 2003). Це обумовлює перспективність клінічного застосування

регуляторних пептидів для лікування ендокринної патології і, зокрема, для корекції вуглеводного гомеостазу при діабеті (Панков Ю.А., 2005).

Проте істотним недоліком попередньо проведених досліджень щодо впливу нейрогормонів на функцію ендокринних клітин підшлункової залози було те, що вони, як правило, проводилися в експериментах *in vitro* на культурі  $\beta$ -клітин (Richardson S. B. et al., 1990; Yibchok-anum S., Hsu W. H. 1998; Le Dran G. et al., 1999), ізольованих панкреатичних острівцях (Gao Z. Y. et al., 1990) чи перфузованих підшлункових залозах (Wallin L. A. et al. 1989; Widmaier E. P. et al., 1991; Morgan D. G., 1998), та за умов їх одноразового введення добровольцям (Paolisso G. et al., 1990) на тлі нормоглікемії (Gao Z. Y. et al., 1991; Bray G. A., 1995). Це не сприяло створенню повної картини щодо впливу нейропептидів на ендокринну функцію підшлункової залози і процеси метаболізму в організмі, оскільки не враховувалися особливості гормон-рецепторних і регуляторних взаємодій за умов деструкції панкреатичних острівців і метаболічних порушень при діабеті. Крім того, ефекти екзогенних нейрогормонів можуть залежати від шляхів їх введення, тривалості надходження в організм і від рівня глікемії, що є вкрай важливим при вивченні їх ефектів при розвитку цукрового діабету (Gao Z. Y. et al., 1990; Sohlstrom A. et al., 1999; Sohlstrom A. et al., 2000).

Також недостатньо досліджена роль нейропептидів у регуляції тканинного метаболізму і обміну речовин в нормі і при цукровому діабеті. Саме з цих причин вивчення центрального і периферійного введення холецистокініну, бомбезину, нейропептиду Y, вазопресину й окситоцину на синтетичну і секреторну функції  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин підшлункової залози і пов'язаний з цим ряд метаболічних змін має важливе значення не лише в теоретичному плані, але й дозволить обґрунтувати ефективність клінічного застосування нейропептидів з метою збереження або відновлення ендокринної функції підшлункової залози при цукровому діабеті.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження, результати яких відображені в даній роботі, виконувалися в рамках науково-дослідної роботи кафедр патофізіології, госпітальної терапії-1, фармакології і ЦНІЛ Запорізького державного медичного університету «Роль пептидергічної системи гіпоталамусу в регуляції ендокринної функції підшлункової залози і стану міокарду в нормі і при цукровому діабеті і обґрунтування способів корекції її порушень за допомогою синтетичних нейрогормонів (експериментально-клінічне дослідження)» (№ держреєстрації 0198U004224).

**Мета і завдання дослідження.** Метою даного дослідження було вивчення впливу нейропептидів на гормональний статус та морфо-функціональний стан альфа- і бета-клітин підшлункової залози та експериментальне обґрунтування ефективності застосування синтетичних нейропептидів для збереження і/або відновлення ендокринної функції підшлункової залози.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

1. Вивчити вплив курсового центрального і периферійного введення синтетичних нейропептидів: вазопресину, холецистокініну-тетрапептиду, бомбезину, нейропептиду Y і окситоцину на морфо-функціональний стан  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців за умов нормоглікемії та цукрового діабету.

2. Дослідити гормональний статус щурів з нормоглікемією та цукровим діабетом після центрального і периферійного введення синтетичних нейропептидів.

3. Вивчити вплив курсового центрального і периферійного введення синтетичних нейропептидів на показники вуглеводного обміну в нормі і виразність глюкотоксичності у діабетичних щурів.

4. Дослідити вплив різних способів застосування синтетичних нейропептидів на показники ліпідного обміну в нормі і виразність ліпотоксичності у діабетичних щурів.

5. Оцінити інтенсивність перекисного окислення ліпідів в нормі і розвиток оксидативного стресу при діабеті на фоні центрального і периферійного введення синтетичних нейропептидів.

6. Обґрунтувати вибір найбільш перспективного пептиду для подальшого вивчення як потенційного препарату для збереження і/або відновлення ендокринної функції підшлункової залози.

7. Розробити оптимальні способи застосування цього нейропептиду для корекції ендокринної функції підшлункової залози при цукровому діабеті.

*Об'єкт дослідження* - ендокринна функція підшлункової залози в нормі та при цукровому діабеті і корекція цієї функції.

*Предмет дослідження* - морфо-функціональний стан  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців, гормональний статус, вуглеводний і ліпідний обміни у нормоглікемічних і діабетичних тварин на тлі введення синтетичних нейропептидів.

*Методи дослідження*: для дослідження показників вуглеводного і ліпідного обмінів, активності вільнорадикального окислення ліпідів і антиоксидантного захисту використовувалися спектрофотометричні біохімічні методи, гормональний гомеостаз досліджувався радіоімунологічним і флюорометричним методами; визначення вмісту інсуліну і катехоламінів в еритроцитах проводилося цитофотометричним методом; для вивчення стану ендокринних клітин панкреатичних острівців був застосований метод непрямой імуофлюоресценції у поєднанні з методами кількісного аналізу зображень в автоматичному і напівавтоматичному режимі; у роботі застосовувалися статистичні методи аналізу.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Результати проведених досліджень значно розширюють уявлення про роль нейропептидів у регуляції ендокринної функції підшлункової залози в нормі і при цукровому діабеті, що має велике значення для сучасної ендокринології і діабетології. У дисертаційній роботі вперше експериментально обґрунтована концепція перспективності включення регуляторних нейропептидів до складу мультифакторної антидіабетичної терапії, згідно з якою ці регуляторні пептиди позитивно впливають не тільки на ендокринну функцію підшлункової залози, але й на асоційовані метаболічні процеси.

Вперше в результаті проведених досліджень було доведено, що синтетичні нейропептиди (вазопресин, холецистокінін-тетрапептид, бомбезин, нейропептид Y і окситоцин) по-різному впливають на морфофункціональний стан  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин підшлункової залози і гормонально-метаболічний статус у здорових і діабетичних тварин.

При цьому ефекти нейропептидів залежать як від стану тварин (норма або діабет), так і від шляху введення нейрогормонів (центральної або периферійної).

Вперше в результаті порівняльного аналізу фармакологічних властивостей досліджуваних нейропептидів, встановлено, що найбільш виражена антидіабетична активність властива окситоцину. Так, вперше встановлено, що при курсовому введенні окситоцину здоровим тваринам спостерігається збільшення кількості  $\beta$ -клітин у панкреатичних острівцях підшлункової залози і посилення їх функціональної активності, це підтверджується підвищенням площі острівців і вмістом у них інсуліну, а також супроводжується збільшенням концентрації цього гормону в крові. Одночасно окситоцин має стимулюючий ефект щодо функціональної активності  $\alpha$ -клітин панкреатичних острівців, що призводить до підвищення вмісту контрінсулінового гормону - глюкагону та забезпечує збереження базальної нормоглікемії.

Вперше продемонстровано, що як периферійне, так і центральне введення окситоцину тваринам з абсолютною інсуліновою недостатністю гальмує деструкцію панкреатичних  $\beta$ -клітин і стимулює їх регенерацію, а також сприяє підвищенню функціональної активності інсулін-продукуючих клітин, підвищенню рівня цього гормону в крові та зниженню базальної глікемії і глюкотоксичності. Водночас вплив окситоцину на  $\alpha$ -клітини підшлункової залози діабетичних тварин залежить від способу застосування нейропептиду. Так, периферійне введення окситоцину діабетичним тваринам гальмує функціональну активність  $\alpha$ -клітин, тоді як при центральному надходженні нейропептиду спостерігається збільшення їх кількості в острівцях і підвищення функціональної активності.

Вперше виявлено, що окситоцин може спричиняти не тільки прямий стимулюючий ефект на масу і функціональну активність панкреатичних бета-клітин, але також здатний знижувати виразність таких метаболічних чинників, як ліпотоксичність і оксидативний стрес, що визначають інтенсивність деструктивних процесів у панкреатичних острівцях.

Показано, що регулюючий вплив окситоцину на метаболічні процеси, пов'язані з ендокринною функцією підшлункової залози, може також реалізовуватися через зміну рівня тиреоїдних гормонів і глюкокортикоїдів.

**Практичне значення одержаних результатів.** Виявлена біологічна активність синтетичних нейропептидів, спрямована на відновлення і збереження ендокринної функції підшлункової залози, є підставою для їх використання як потенційних препаратів для профілактики і лікування цукрового діабету. Отримані дані про перспективність застосування регуляторних пептидів у комплексній терапії цукрового діабету наводяться при читанні лекційних курсів кафедр фармакології Харківського, Сумського, Одеського, Запорізького й Івано-Франківського державних медичних університетів, Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, а також Національного фармацевтичного університету.

У роботі вперше експериментально обґрунтована доцільність включення окситоцину до комплексної терапії цукрового діабету, застосування якого разом з інсуліном сприяє більш вираженій нормалізуючій дії на функцію ендокринних острівців підшлункової залози й асоційовані метаболічні процеси у діабетичних тварин, аніж монотерапія. Перевагою

використання інсуліну в поєднанні з окситоцином є більш стійке зниження гіперглікемії при меншій дозі інсуліну і зменшеному ризику розвитку гіпоглікемічних станів. Результати проведених досліджень знайшли віддзеркалення в методичних рекомендаціях «Нові підходи до фармакотерапії цукрового діабету I типу» (м. Київ, 2005р.) і декларативному патенті на відкриття «Спосіб лікування цукрового діабету I типу» (№71310 А Пріоритет 19.12.2003. Опубл. 15.11.2004 р. Бюл. №11.).

**Особистий внесок здобувача.** Автором самостійно проведено пошук та аналіз наукової літератури, були визначені напрям, мета і завдання наукової роботи, самостійно розроблена методологія дослідження, виконані фармакологічні, біохімічні та морфологічні дослідження, проведена статистична обробка отриманих даних і аналіз усього матеріалу, сформульовані основні положення і висновки, написані всі розділи дисертації. Автор безпосередньо брав участь у експериментальному моделюванні цукрового діабету, а також у дослідженнях із впливу центрального і периферійного введення нейропептидів на гормонально-метаболічний статус у здорових і діабетичних тварин. Дисертантом самостійно виконані аналіз і статистична обробка отриманих результатів. Морфометричні й імуноцитохімічні дослідження ендокринної функції підшлункової залози здобувачем проведені в лабораторії кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету під керівництвом д.мед.н., професора О.В. Абрамова.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати досліджень були представлені на Всеросійській конференції «Гіпоксія: механізми, адаптація, корекція» (Москва, 1997 р.), VII-ій Міжнародній науково-практичній конференції зі створення і апробації нових лікарських засобів «Ліки - людині» (Москва, 1998 р.), пленумі товариства фізіологів України (Чернівці, 1998 р.), 5-му національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 1999 р.), 3-му національному конгресі патофізіологів України (Одеса, 2000 р.), республіканській науковій конференції „Наукові напрями у створенні лікарських засобів у фармацевтичному секторі України” (Харків, 2000 р.), науково-практичній конференції „Учені України - вітчизняній фармації” (Харків, 2000 р.), 2-му національному з'їзді фармакологів України (Дніпропетровськ, 2001 р.), міжнародній науково-практичній конференції «Історія і перспективи розвитку фармацевтичної науки і освіти» (Запоріжжя, 2004 р.), I-ій міжнародній науково-практичній конференції «Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів» (Тернопіль, 2004 р.), IV-ій Української науково-практичній конференції з клінічної фармакології (Вінниця, 2004 р.), VI-ому Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2005 р.), VII-му з'їзді ендокринологів України (Київ, 2007 р.), III-му з'їзді фармакологів Росії “Фармакологія - практичній охороні здоров'я” (Санкт-Петербург, 2007 р.), першому національному конгресі "ЛЮДИНА І ЛКІ - Україна» (Київ, 2008 р.), науково-практичній конференції з міжнародною участю “Експериментальна і клінічна ендокринологія: від теорії до практики (Шості, сьомі, восьмі, дев'яті Данилевські читання)” (Харків, 2007, 2008, 2009, 2010 роки).

Апробація матеріалів дисертації проведена на спільному засіданні кафедр патофізіології, нормальної фізіології, патологічної фізіології, нормальної анатомії, патологічної анатомії, гістології, цитології і ембріології, біофізики і медичної апаратури, біохімії, фармакології з основами медичної рецептури, клінічної фармакології і

фармакотерапії, мікробіології і імунології, центральної науково-дослідної лабораторії Запорізького державного медичного університету (протокол №4 від 16.12.09 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 50 наукових робіт, з яких - 26 статей, зокрема 21 у фахових журналах і збірках, з них 18 - у вітчизняних журналах, 3 - в іноземних (Росія), 9 робіт опубліковані без співавторів, отримано 1 патент, видано 1 методичний посібник; 24 роботи у наукових збірках, матеріалах і тезах конференцій.

**Структура і обсяг дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 316 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, 9 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел, який містить 635 джерела, зокрема 540 іноземних авторів та займає 65 сторінок. Матеріал дисертації ілюстрований 75 таблицями, 74 рисунками і мікрофотографіями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали і методи дослідження.** Дослідження виконані на 420 щурах лінії Вістар масою 250-270 г. в осінньо-зимовий період (жовтень-березень). Тварин утримували в стандартних умовах віварію при відповідному освітленні і годуванні *ad libitum*. Дослідження проводилися відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), які відповідають положенням „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1985). Процедури, які викликають біль (гострі дослід, вилучення органів, евтаназія та інші) проводили під наркозом (вводили внутрішньоочеревно натрію етаміналу в дозі 40 мг/кг маси тіла).

На щурах було проведено дослідження перебігу експериментального цукрового діабету різної тривалості. У цій серії досліджень тварини були розділені на три групи: контрольна група і щури з експериментальним діабетом три- і п'ятижневої тривалості.

Проведено п'ять серій досліджень з вивчення впливу курсового (двотижневого) центрального і периферійного введення холецистокініну-тетрапептиду (ССК-4), [Arg<sup>8</sup>]-вазопресину (Ваз), окситоцину (Окс), бомбезину (ББ), нейропептиду Y (нпY) на ендокринну функцію підшлункової залози й асоційовані метаболічні процеси здорових і діабетичних тварин. Тварини кожної експериментальної серії були розділені на чотири групи: нормоглікемічні щури з центральним (група 1) і периферійним (група 2) введенням пептиду, діабетичні щури з центральним (група 3) і периферійним (група 4) введенням нейропептиду.

Для контролю ефектів, що виникають при курсовому введенні нейропептидів, проведена серія досліджень з вивчення впливу центрального введення нормоглікемічним і діабетичним тваринам стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду (чотири групи тварин).

В окремій серії досліджень було проведено порівняльне вивчення роздільного і сумісного введення інсуліну і окситоцину на перебіг експериментального діабету (сім груп тварин).

Також була проведена серія досліджень з вивчення впливу центрального і периферійного введення окситоцину на процеси проліферації у нормальних та діабетичних



тварин (сім груп тварин) за ступенем включення бромдезоксидуридину (БрДУ) в ДНК-синтезуючі клітини.

Для відтворення цукрового діабету застосовували стрептозотоцинову модель захворювання, яка є однією з найбільш поширених експериментальних моделей діабету в щурів (Полторак В.В., 1996). Стрептозоточин (SIGMA Chemical, США) вводили щурам внутрішньоочередно в дозі 50 мг/кг. Час, що пройшов з дня введення препарату, в подальшому викладі матеріалу, позначатиметься як тривалість перебігу діабету.

Синтетичні аналоги нейропептидів виробництва фірми Peninsula Laboratories Ins., США вводили протягом 14 діб. Вибір доз для введення нейрогормонів здійснювався на підставі даних літератури. (про що ?)

Для центрального - інтрацеребровентрикулярного (іцв) введення нейрогормонів щурам заздалегідь імплантували канюлю в правий латеральний шлуночок мозку. На 8 добу після операції тварин відбирали для експерименту. Інфузії діабетичним тваринам починали на 21 добу після введення стрептозоточину (29 доба після операції). Щоденна доза для кожного з нейропептидів, що вводилися, складала: для Ваз - 0,12 мкг/кг (0,12 пмоль/кг), Окс - 1,5 мкг/кг (1,5 нмоль/кг), ХЦК-4 - 50 нг/кг (0,1 нмоль/кг), ББ - 1,2 мкг/кг (7,5 пмоль/кг), нпУ - 50 нг/кг (12,5 пмоль/кг).

Периферійне - інтраперитоніальне (іп) введення нейрогормонів здійснювали в аналогічному режимі в дозах: для Ваз - 1,2 мкг/кг (1,2 нмоль/кг), Окс - 15 мкг/кг (16,5 нмоль/кг), ХЦК-4 - 25 мкг/кг (50 нмоль/кг), ББ - 10 мкг/кг (6 нмоль/кг), нпУ - 12,5 мкг/кг (2,5 нмоль/кг) в 0,5 мл 0,9 % NaCl.

Інсулін S.N.C. („Берлін-хемі”, Німеччина) вводили підшкірно в дозі 2 ОД/кг двічі на добу, а також в дозі 3 ОД/кг, яка в попередніх експериментах знижувала рівень базальної глікемії нижче 8,5 ммоль/л і таким чином викликала компенсацію діабетичного стану у тварин.

Дослідження ендокринної функції підшлункової залози і асоційовані метаболічні процеси у діабетичних тварин проводили відповідно до методичних рекомендацій «Доклінічні дослідження лікарських засобів» (Стефанов О.В., 2001)

Стан глюкозного гомеостазу визначали за показниками базальної глікемії, рівнем глікозильованого альбуміну, інсулінемії, під час внутрішньочередного тесту толерантності до глюкози, вмісту глікогену в гомогенатах печінки і скелетній мускулатурі. Рівень глюкози визначали уніфікованим фотометричним глюкозооксидазним методом за допомогою набору ДІАКОМ Глюкоза ГО (ДІАКОМ-СИНТЕКО, Росія). Глікемічну реакцію при проведенні тесту толерантності до вуглеводів оцінювали за площею під глікемічною кривою, яку розраховували за допомогою комп'ютерної програми “Mathlab”. Дослідження глікозильованого альбуміну проводили методом (Вікторова Л.Н., Городецький В.К., 1990). Вміст глікогену в тканинах визначали за методом (Прохорова М.І., 1982). Чутливість периферійних тканин на дію інсуліну визначали за допомогою „короткого інсулінового тесту” (Akinmoku A. et al., 1992).

Для дослідження стану ліпідного обміну проводили вивчення вмісту в плазмі крові загальних ліпідів, тригліцеридів, загального холестерину,  $\beta$ -ліпопротеїдів і

неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) уніфікованими методами (Меньшиков В.В., 1987).

Оксидативний стрес характеризували за станом мембран еритроцитів, у яких проводили вивчення вмісту первинних (дієнові кон'югати), вторинних (триєнові й оксодієнові кон'югати і сполуки, що реагують з тіобарбітуровою кислотою), а також кінцевих продуктів ліпоксидації (сполуки типу шифових основ) (Коробейніков Є.М., 1989; Волчегорський І.А. та співавт., 1991). Для оцінки інтенсивності антиоксидантного захисту еритроцитів було досліджено активність каталази (Королук М.А. та співавт., 1988), глутатіонредуктази (Прохорова М.І., 1982), а також вміст одного з основних компонентів неферментативної ланки АОЗ -  $\alpha$ -токоферолу (Elmadf J., et al., 1989).

Для оцінки гормонального статусу в плазмі крові тварин визначали імунореактивний інсулін за допомогою наборів для імунорадіометричного визначення фірми "ДП ХОп Ібох НАН Білорусі", а також вільний трийодтиронін (fT3) і тироксин (fT4) за допомогою наборів фірми "Immunotech" (Чеська республіка) згідно з доданими до наборів протоколів визначення. Кількість радіоактивних імпульсів у калібрувальних і досліджуваних пробах вимірювали на лічильнику Гамма-12 (СРСР). Вміст кортикостероїдів у крові оцінювали за рівнем некон'югованих 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) в плазмі флюориметричним методом (Балашов Ю.Г., 1990).

Після вилучення та стандартної гістологічної проводки підшлункову залозу заливали в парафін. Для виявлення інсуліну в  $\beta$ -клітинах підшлункової залози використовувався метод непрямой імунofлюоресценції. Процес обробки серійних зрізів підшлункової залози здійснювався згідно з протоколом, що додається до комерційного набору фірми Peninsula Laboratories Inc. (США). Для ідентифікації  $\alpha$ -клітин як первинних антитіл використовувалися мишачі моноклональні антитіла до глюкагону, а вторинних - кролячі антитіла проти IgG миші, кон'юговані з FITC (SIGMA Chemical, США). Імунофлюоресценцію, пов'язану із вмістом інсуліну в  $\beta$ -клітинах і глюкагону в  $\alpha$ -клітинах вивчали в ультрафіолетовому спектрі збудження 390-420 нм на комп'ютерній системі цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Німеччина). Зображення, що отримували в спектрі люмінесценції на мікроскопі Axioscop (Zeiss, Німеччина), за допомогою спеціальної високочутливої відеокамери CONU 4722 (CONU Inc., США), вводилося в комп'ютер VIDAS- 386 і аналізувалося пакетом прикладних і статистичних програм VIDAS- 2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). У автоматичному режимі проводилося вимірювання площі панкреатичних островців, площі та концентрації інсулінімунореактивного матеріалу (ІІРМ) в  $\beta$ - клітинах, або глюкагонімунореактивного матеріалу (ГІРМ) в  $\alpha$ -клітинах, які пов'язані із вмістом інсуліну та глюкагону. Також визначався вміст гормонів в островцях, котрий обчислювався як визначення похідного площі імунореактивного матеріалу на концентрацію відповідного гормону.

Інтенсивність проліферації вивчали за включенням бромдезоксипіридину (БрДУ) в ДНК-синтезуючі клітини. Внутрішньочеревне введення БрДУ в дозі 40 мг/кг раз на добу впродовж 5 діб починали за два дні до початку введення Окс.Через 12 годин після останнього введення Окс тварин декапітували і вилучали підшлункову залозу, у якій, після стандартної гістологічної обробки, виявляли мічені БрДУ клітини методом непрямой

імунофлюоресценції. (Як первинні антитіла використовували моноклональні антитіла до БрДУ, а як вторинні - козячі IgG проти миші, кон'юговані з FITC.) У підшлунковій залозі реєстрували кількість флюоресцюючих ядер у центральній і периферійній частинах панкреатичних острівців. Обстежували не менше 200 острівців в серії і розраховували середню кількість флюоресцюючих ядер на 1 острівець.

Цитохімічне вивчення вмісту інсуліну в еритроцитах проводили за методом (Сандуляк Л.І., 1987), а вміст катехоламінів за методом (Мордар Г.І., 1996). Після фарбування оптичну щільність еритроцитів визначали в автоматичному режимі в світлі, що проходить, на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Німеччина). Зображення, отримане за допомогою спеціальної високочутливої відеокамери COHU 4722 (COHU Inc., США), вводилося в комп'ютер VIDAS-386 і аналізувалося пакетом прикладних і статистичних програм VIDAS-2.5 (Kontron Elektronik, Німеччина). У кожному мазку аналізували не менше 200 клітин. Розраховували відсоток еритроцитів, які містили інсулін або катехоламіни (оптична щільність яких більша 0,1).

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснений методами варіаційної статистики за допомогою стандартних пакетів програм Excel ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (Statsoft Inc., США) на персональному комп'ютері Pentium III. Визначення виду розподілу ознаки у вибірці проводили з використанням критерію Шапіро-Уїлка, а рівність дисперсій розподілу ознак у групах - за допомогою критерію Левена. Порівняння двох груп з нормальним розподілом здійснювали із застосуванням параметричного класичного t-критерію Ст'юдента для незалежних вибірок і модифікованого t-критерію Ст'юдента з роздільними оцінками дисперсій. При порівнянні двох груп з розподілом вибірки, відмінним від нормального, використовували непараметричний U-критерій Манна-Уїтні. Для множинних порівнянь даних з нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) і застосовували метод Ст'юдента-Ньюмена-Кейлса, а в інших випадках - ранговий аналіз варіацій за Крускалом-Уоллісом і апостеріорне порівняння середніх за допомогою критерію Дана. Розбіжності вважали статистично значущими при ( $P < 0,05$ ) (Мінцер О.П., 2003).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Відомо, що загальна маса панкреатичних  $\beta$ -клітин, яка відповідає за продукцію інсуліну та регулює глюкозний гомеостаз в організмі, визначається їх кількістю та розмірами. Оскільки ЦД характеризується абсолютною (ЦД 1 типу) або відносною (ЦД 2 типу) недостатністю синтезу і секреції інсуліну  $\beta$ -клітинами, основною метою сучасної антидіабетичної терапії є забезпечення організму інсуліном і відновлення/збереження функції панкреатичних  $\beta$ -клітин (Askermann A.M., Gannon M., 2007). На сьогодні загальноприйнятим вважається той факт, що зниження маси  $\beta$ -клітин при ЦД обумовлене їх посиленою апоптотичною загибеллю і, меншою мірою, атрофією, тоді як неогенез клітин (принаймні при ЦД 2 типу) практично не порушений, але дуже сповільнений (Sporn N. et al., 2005).

Нейропептиди володіють широким спектром біологічної активності, яка охоплює найважливіші функції організму - від участі в організації загальної поведінки до тонких регуляторних взаємодій на клітинному рівні (Rozengurt, E., 2002). Вибір нейропептидів для проведення даного дослідження пов'язаний з отриманими раніше даними про те, що

розвиток ЦД викликає в гіпоталамусі поступове підвищення синтезу і секреції цілого ряду регуляторних пептидів (Абрамом А.В., 1998). Ця активація пептидергічної системи гіпоталамусу, ймовірно, має компенсаторне значення при діабеті і спрямована як на стимуляцію функції  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців, так і на нормалізацію гомеостазу в організмі загалом. Для дослідження були обрані наступні нейропептиди: [Arg8]-вазопресин, холецистокінін-тетрапептид, бомбезин, нейропептид Y та окситоцин. Оскільки ефекти нейропептидів залежать від шляхів їх введення, тривалості надходження в організм і його гормонально-метаболического стану, було проведено вивчення впливу курсового (14 діб) центрального і периферійного введення вищезгаданих нейропептидів на стан  $\beta$ - і  $\alpha$ - клітин панкреатичних острівців, їх гормональний статус, а також параметри вуглеводного, ліпідного обмінів і оксидативного стресу у здорових і діабетичних тварин.

Центральне і периферійне введення нейропептидів проводилося для визначення відмінностей в ефективності впливу на показники, що вивчалися, при дії на відповідні рецептори в центральній нервовій системі, або на периферії. У клінічній практиці попадання пептидів у гіпоталамічні центри, минаючи гематоенцефалічний бар'єр, досягається інтраназальним краплинним введенням розчинів, з метою їх всмоктування в порожнині носа (Бахарев, В.Д., 1989). Концентрації нейропептидів, які використовувалися нами для центрального введення були на порядок нижчими за дозу, необхідну для активації рецепторів на периферії, тому ефекти, які спостерігалися при центральному введенні могли бути викликані винятково їх впливом на структури центральної нервової системи.

Однією з особливостей даного дослідження було застосування нового методичного підходу в оцінці параметрів  $\beta$ - і  $\alpha$ -клітин панкреатичних острівців, що вивчалися. Цей підхід полягав у використанні сучасної системи цифрового аналізу зображення VIDAS-386 (Kontron Electronic, Німеччина) з оригінальним програмним забезпеченням. Це дозволило після постановки імуноцитохімічної реакції, що має кількісний характер, досліджувати в автоматичному режимі зміни параметрів панкреатичних острівців і власне  $\beta$ -клітин (площа острівців, площа інсулін-імунореактивного матеріалу, вміст і концентрацію інсуліну в них), а також  $\alpha$ - клітин (площа, вміст і концентрація глюкагон-імунореактивного матеріалу) у різних експериментальних групах, що дало нам можливість зробити висновки про стан синтетичної і секреторної активності клітин.

Оскільки для регуляторних нейропептидів відмічені як активуючі, так і модулюючі ефекти, експерименти проводилися на здорових тваринах і на щурах зі стрептозотоцин-індукованим ЦД.

Так, у експериментах на нормоглікемічних тваринах порівняльне вивчення впливу обраних доз і способів введення досліджуваних регуляторних пептидів на стан панкреатичних острівців показало, що найбільш виражене збільшення кількості функціонуючих  $\beta$ -клітин в острівцях спостерігалося при центральному введенні нпY, а також при обох шляхах введення Окс (табл. 1).

Подібна зміна маси  $\beta$ -клітин певною мірою може бути пов'язана зі здатністю цих пептидів стимулювати процеси проліферації в різних органах і тканинах (Decressac M., 2009).

**Впливи досліджуваних регуляторних пептидів на площу панкреатичних  
острівців, кількість  $\beta$ -клітин, концентрацію і вміст ПРМ в острівцях у  
нормоглікемічних щурів, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ), n=10.**

Група тварин	Площа острівця мкм <sup>2</sup>	Кількість клітин в острівці	ПРМ в острівці		
			площа, мкм <sup>2</sup>	концентрація, уОД	вміст, уОД
Контроль	4407,5±188,2	50±2	2340,9±89,0	1,37±0,02	2554,8±75,7
Нормоглік+ХЦК (іп)	4531,3±231,2	48±2	2631,8±129,2	1,56±0,03	3071,1±125,1
Нормоглік+ХЦК(іцв)	6643,0±197,0	48±3	2827,8±82,4 <sup>a</sup>	1,64±0,02	4370,1±113,5 <sup>a</sup>
Нормоглік+ББ (іп)	5030,6±406,9	49±3	2733,3±212,8	1,44±0,04	3322,8±199,3 <sup>a</sup>
Нормоглік+ББ (іцв)	5298,7±706,0	51±5	2999,9±315,3 <sup>a</sup>	1,57±0,05 <sup>a,г</sup>	3819,3±268,0 <sup>a,г</sup>
Нормоглік+НПУ (іп)	4331,3±231,2	48±2	2731,8±129,2 <sup>a</sup>	1,24±0,02 <sup>a</sup>	3109,3±109,7 <sup>a</sup>
Нормоглік+НПУ(іцв)	7643,0±197,0 <sup>a,г</sup>	59±2 <sup>a</sup>	4216,5±125,0 <sup>a,г</sup>	1,04±0,02 <sup>a,г</sup>	3977,0±103,5 <sup>a,г</sup>
Нормоглік+Ваз (іп)	3869,7±313,0	47±2	2603,1±202,7	1,49±0,04 <sup>a</sup>	3137,0±188,1 <sup>a</sup>
Нормоглік+Ваз (іцв)	2717,3±362,1 <sup>a,г</sup>	41±3	1874,9±197,0 <sup>a,г</sup>	1,57±0,05 <sup>a,г</sup>	2387,0±167,5 <sup>г</sup>
Нормоглік+Окс (іп)	4717,3±240,5	58±2 <sup>a</sup>	2873,3±142,9 <sup>a</sup>	1,16±0,02 <sup>a</sup>	2695,9±111,5
Нормоглік+Окс (іцв)	5091,8±223,2 <sup>a</sup>	65±3 <sup>a</sup>	3134,1±126,6 <sup>a</sup>	1,72±0,05 <sup>a</sup>	5215,6±279,8 <sup>a</sup>

Примітки:

<sup>a</sup> – рівень значущості відносно контрольної групи ( $p < 0,05$ );

<sup>г</sup> – рівень значущості відносно групи тварин з інтраперитоніальним введенням нейропептиду ( $p < 0,05$ ).

Даний факт був встановлений і в наших дослідженнях, які підтвердили активацію процесів проліферації  $\beta$ -клітин під впливом курсового введення Окс. Один з можливих шляхів реалізації подібного впливу нейропептидів пов'язаний зі здатністю як нпУ, так і Окс стимулювати секрецію пролактину (Ozawa H., 1993; Barker-Gibb M.L., 1995), який, у свою чергу, може підсилювати проліферацію  $\beta$ -клітин і гальмувати їх апоптоз (Bordin S., 2004).

Разом з тим, дослідження останніх років, присвячені встановленню сигналінгових шляхів, які активуються під впливом нейропептидів, призвели до виявлення раніше не прогнозованих фактів того, що робота їх специфічних рецепторів, які містять G-білок, пов'язана не тільки з утворенням ряду відомих вторинних месенджерів, але і з індукцією каскаду тирозинової фосфорилізації мітогенного характеру (Rozengurt E., 2002). На сьогодні активно ведуться роботи по встановленню конкретних молекулярних учасників даних сигналінгових процесів.

З іншого боку, необхідно відзначити, що введення нпУ в більшій мірі призводило до збільшення площі острівців, аніж до зростання в них кількості  $\beta$ -клітин і, відповідно, зниження концентрації інсуліну в острівці не може свідчити про інтенсифікацію секреції гормону в кров. У той же час периферійне застосування Окс, окрім збільшення площі острівців, також викликало значне зростання кількості  $\beta$ -клітин, тому зниження в них концентрації інсуліну, скоріш за все, свідчить про активацію специфічної функції  $\beta$ -клітин під впливом даного нейропептиду. Центральне введення Окс, підсилюючи мітогенні

процеси у  $\beta$ -клітинах, ймовірно, меншою мірою активувало процеси секреції, що призвело до деякого накопичення інсуліну в острівцях.

Помітне збільшення вмісту ІРМ в острівцях викликали також ХЦК-4 і ББ, особливо при їх центральному введенні (див. табл. 1). Необхідно відзначити, що механізм впливу даних нейропептидів різний, оскільки якщо для ХЦК відзначено самостійний вплив на синтез і секрецію гормону панкреатичними  $\beta$ -клітинами (Berthoud H.R., 1996), то ББ впливає на даний процес опосередковано, через пов'язану з роботою бомбезинових рецепторів 2 типу активацію секреції інкретинів, зокрема, ГПП-1 (Persson K., 2002), який, окрім інсулінотропної дії, підсилює транскрипцію гена проінсуліну.

Більш виражений ефект при центральному шляху введення нейропептидів можна пояснити не тільки їх взаємодією зі специфічними рецепторами, але і включенням центральних механізмів регуляції синтезу інсуліну. Провідну роль у даному випадку може відігравати здатність деяких пептидів активувати нейрони дорсального комплексу блукаючого нерва, які завдяки прямим проєкціям до панкреатичних острівців стимулюють синтез і секрецію інсуліну (Krowicki Z.K., 1996).

Відмічене збільшення площі панкреатичних острівців під впливом курсового введення нейропептидів супроводжувалося також морфо-функціональними змінами  $\alpha$ -клітин. Так, при обох шляхах введення ХЦК-4, а також при центральному введенні ББ спостерігалось істотне збільшення їх кількості. Даний ефект, ймовірно, також пов'язаний з активацією процесів проліферації в підшлунковій залозі, яка встановлена при дії цих пептидів (Morisset J., 2008).

Разом з тим, введення нейропептидів по-різному впливало на синтетичну функцію  $\alpha$ -клітин. Тільки ХЦК-4 при обох шляхах введення збільшував вміст ІРМ (на 18 і 25 %, відповідно), тоді як застосування решти нейропептидів призводило до зниження даного параметра. Слід зазначити, що при центральному введенні Окс це падіння (на 22,4 %) поєднувалося зі збільшенням площі ІРМ, що, ймовірно, пов'язано зі збільшенням синтезу глюкагону в  $\alpha$ -клітинах і підвищенням секреції цього гормону в кров. При периферійному шляху введення пептидів зниження вмісту не супроводжувалося вірогідними змінами площі ІРМ, що свідчить про зменшення синтезу глюкагону.

Використовуючи дані про середню кількість  $\alpha$ - і  $\beta$ -клітин в острівцях і вмісті в них імунореактивного матеріалу, можна розрахувати відносний вміст інсуліну і глюкагону в панкреатичних острівцях (рис. 1).

Проведені розрахунки свідчать, що під впливом центрального введення ББ, нпУ і Окс відносний вміст ІРМ значно збільшувався. Менш виражений ефект спостерігався при периферійному введенні ХЦК-4, нпУ і Окс.

При центральному введенні ХЦК-4 і при обох шляхах введення Ваз відносний вміст ІРМ в острівці збільшувався, що не суперечить літературним даним про глюкозо-залежну стимуляцію  $\alpha$ -клітин даними нейропептидами (Folny V., 2003).

Результати даних розрахунків знайшли підтвердження при дослідженні базальної інсулінемії, яке показало, що при центральному введенні ХЦК-4, ББ, нпУ, а також при обох шляхах введення Окс у здорових тварин спостерігалось підвищення рівня інсуліну в крові, і лише при введенні Ваз базальна інсулінемія істотно не змінювалася, що можна пояснити його глюкозо-залежним ефектом на острівцеві клітини підшлункової залози.

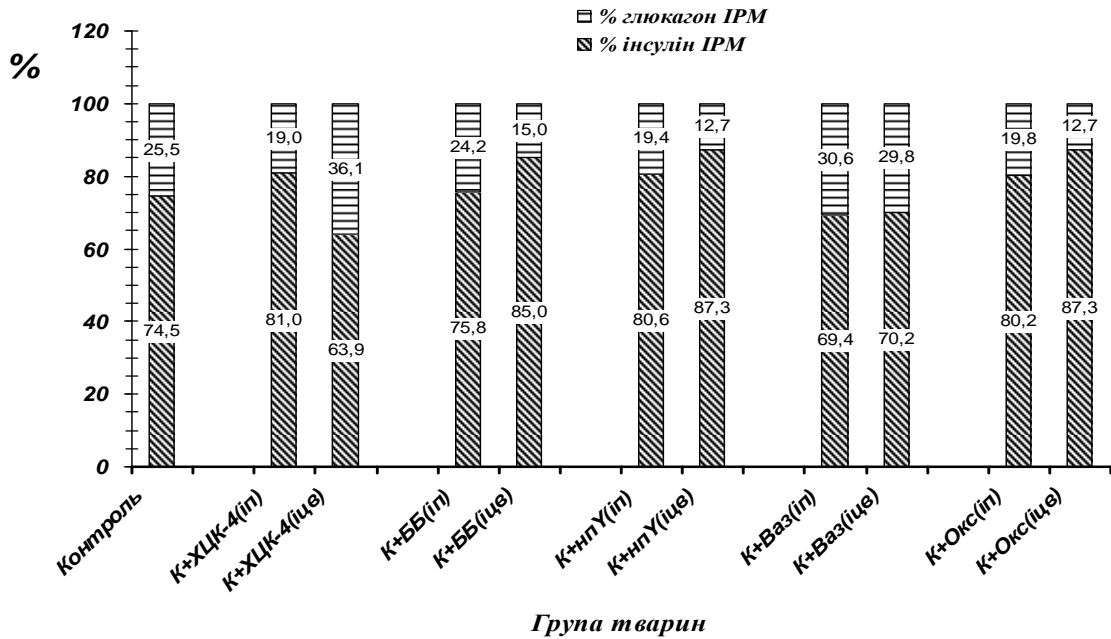


Рис. 1. Вплив введення регуляторних пептидів на відносний вміст інсуліну і глюкагону в панкреатичних острівцях здорових тварин.

У той же час визначення базальної глікемії показало, що лише при периферійному введенні Окс спостерігалось істотне зниження цього показника, тоді як у решті груп рівень глікемії не відрізнявся від контролю, або був дещо підвищений. Подібну невідповідність між вмістом інсуліну і рівнем глюкози в крові можна пояснити стимулюючим впливом нейропептидів на секрецію глюкокортикоїдів, які, будучи наділені контрінсуліновою дією, здійснюють вплив на рівень глікемії шляхом активації ключових ферментів глюконеогенезу (Buhl E.S., 2007). Про нестабільну базальну глікемію в даних умовах свідчив показник глікозильованого альбуміну, підвищений у всіх групах, за винятком тварин з периферійним введенням Окс.

Під час експериментів була встановлена така послідовність нейропептидів за їх здатностями до підвищення рівня глюкокортикоїдів у крові при курсовому центральному введенні: Ваз, нпУ, ХЦК-4, ББ. Відомо, що Ваз, продемонструвавши максимальний ефект, стимулює викид АКТГ аденогіпофізом (Guillon G., 1998), тоді як ББ не має подібної дії (Gregersen S., 1996). Менш виражене підвищення рівня глюкокортикоїдів спостерігалось при периферійному введенні пептидів; за активністю їх можна розтошувати в наступній послідовності: нпУ, Ваз, ХЦК-4, ББ. Окс, на відміну від інших нейропептидів, здійснював різноспрямований вплив на концентрацію глюкокортикоїдів – при центральному його введенні рівень підвищувався, а при периферійному – знижувався. У зв'язку з цим необхідно відзначити, що індекс резистентності, розрахований як співвідношення концентрації глюкокортикоїдів до інсуліну, при периферійному введенні Окс був нижче контрольного.

Проведений аналіз кореляційної залежності між концентраціями інсуліну, глюкокортикоїдів, індексу резистентності і базальної глікемії показав, що найбільш істотний кореляційний зв'язок спостерігався між двома останніми показниками ( $r = 0,69$ ,

$p < 0,05$ ), тобто рівень глікемії більше залежав від співвідношення між концентраціями глюкокортикоїдів та інсуліну, аніж від величини концентрацій цих гормонів.

Відомо, що тиреоїдні гормони також здатні впливати на вуглеводний обмін організму шляхом регуляції гліоконеогенезу на рівні циклу Корі і глюкозо-аланінового циклу. Рециркування глюкози в цих метаболічних шляхах зменшується при гіпотиреоїдному стані і зростає при гіпертиреоїдному (Кендиш І.Н., 1985). З іншого боку, регуляція процесів термогенезу, безпосередньо залежна від рівня тиреоїдних гормонів, відіграє велику роль у патогенезі ЦД 2 типу і ожирінні (Guan H.P., 2002). Раніше було встановлено, що більша частина циркулюючого в крові  $T_3$  (близько 80 %) синтезується не в самій щитоподібній залозі, а утворюється за рахунок дейодування  $T_4$  в периферійних тканинах під впливом ферментів дейодиназ. Швидкість цього процесу може змінюватися під впливом різних чинників як ендогенної, так і екзогенної природи (Моргунова Т.Б., 2005). Проведені дослідження показали істотне пригнічення функції щитоподібної залози у нормальних щурів під впливом центрального введення ББ, що узгоджується з даними, отриманими іншими дослідниками, котрі встановили зниження секреції тиреотропного гормону при активації бомбезинових рецепторів 1 типу (Baranowska V. et al. 2005).

При центральному введенні нпУ і обох шляхах введення Ваз спостерігалось зменшення коефіцієнта конверсії  $fT_3/fT_4$ , що, ймовірно, пов'язано з пригніченням процесів дейодування  $T_4$  в периферійних тканинах. Разом з тим, окситоцин незалежно від шляху введення, призводив до активації процесів дейодування тироксину в периферійних тканинах, що узгоджується з літературним даним (Ciosek J., Stempniak B., 1997).

Всі досліджувані нейропептиди так чи інакше викликали зменшення вмісту глікогену в тканинах, що, ймовірно, значною мірою пов'язано зі здатністю підвищувати рівень глюкокортикоїдів у крові, аніж із змінами в концентрації циркулюючого глюкагону або тиреоїдних гормонів. Так, проведений кореляційний аналіз показав сильний зв'язок між індексом резистентності і вмістом глікогену в м'язах ( $r = 0,878$ ,  $p < 0,05$ ), і тісну кореляцію між концентрацією глюкокортикоїдів у крові і вмістом глікогену в печінці ( $r = 0,544$ ,  $p < 0,05$ ). Найбільш значуще зниження вмісту глікогену в м'язах і печінці викликало введення Ваз, який, як відомо, окрім здатності підвищувати рівень кортикостероїдів, спроможний безпосередньо пригнічувати глікогенсинтетазу (Ciudad C., 1984). Поряд з тим периферійне введення Окс не викликало істотних змін у вмісті глікогену.

Вивчення впливу нейропептидів на параметри ліпідного обміну нормоглікемічних тварин показало, що ХЦК-4, ББ і нпУ підвищували вміст усіх визначуваних фракцій ліпідів, тоді як введення Ваз і Окс сприяло зниженню рівня ліпідемії, що, можливо, пов'язано з їх здатністю пригнічувати процеси ліполізу (Nigouyama M., et al., 2009).

Оцінка оксидативного статусу здорових тварин продемонструвала, що введення тваринам нейропептидів у вибраних нами дозах не викликає істотних змін.

Таким чином, курсове введення нейропептидів призводило до деяких змін гормонально-метаболічних процесів у нормоглікемічних тварин. При цьому центральне введення пептидів характеризувалося більш вираженими зрушеннями оцінюваних параметрів, що, ймовірно, пов'язано з активацією центральної ланки регуляції гомеостазу.



Результати, отримані в експериментах на нормоглікемічних тваринах, дозволили припустити, що серед досліджуваних нейропептидів найбільш перспективним щодо впливу на морфо-функціональний стан панкреатичних острівців і супутні метаболічні процеси, задіяні в патогенезі ЦД, а відтак, який потребує детальнішого вивчення на моделі даної патології, є окситоцин.

При дослідженні тварин з експериментальним діабетом було встановлено, що обрані нейропептиди при курсовому введенні по-різному впливали на показники вуглеводного обміну (рис. 2).

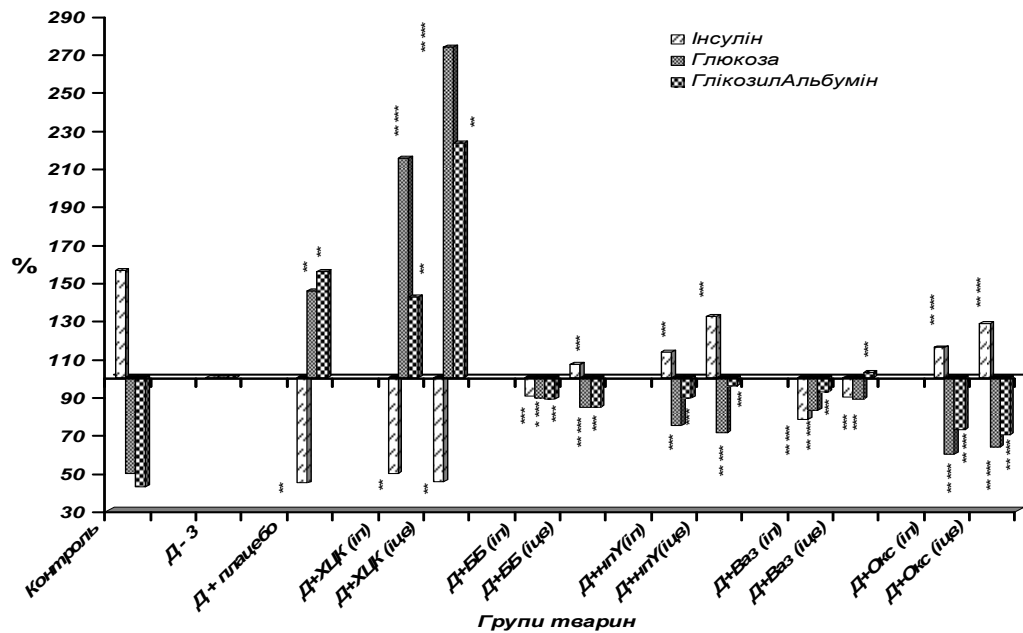


Рис. 2. Вплив введення регуляторних пептидів на рівень базальної інсулінемії, глікемії та глікозилзованого альбуміну у діабетичних тварин (в відсотках відхилень від показників групи тварин з трьохтижневим діабетом):

\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин із трьохтижневим діабетом ( $p < 0,05$ );

\*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ ).

Так, введення XJK-4 діабетичним тваринам спричиняло більш виражену гіперглікемію і зростання вмісту глікованих білків, не впливаючи при цьому на рівень інсуліну в крові порівняно з діабетичними тваринами, що отримували плацебо. Введення решти нейропептидів гальмувало прогресуючий розвиток експериментального діабету.

При цьому істотне зниження базальної глікемії спостерігалось при центральному введенні nY і BB, при периферійному введенні Vaz і при обох шляхах введення Oks (див. рис. 2).

Слід відзначити, що тільки при введенні nY і Oks було встановлено значне підвищення рівня інсуліну в крові. У той же час вагоме зменшення рівня глікованих білків порівняно з трьохтижневим діабетом реєструвалося лише в групах щурів, які отримували

окситоцин, що свідчить про стабільність зниження концентрації глюкози в крові цих тварин.

Вивчення морфометричних і морфофункціональних параметрів  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців діабетичних тварин показало, що розвиток експериментального діабету супроводжувався значним прогресуючим зменшенням площі острівців (рис. 3).

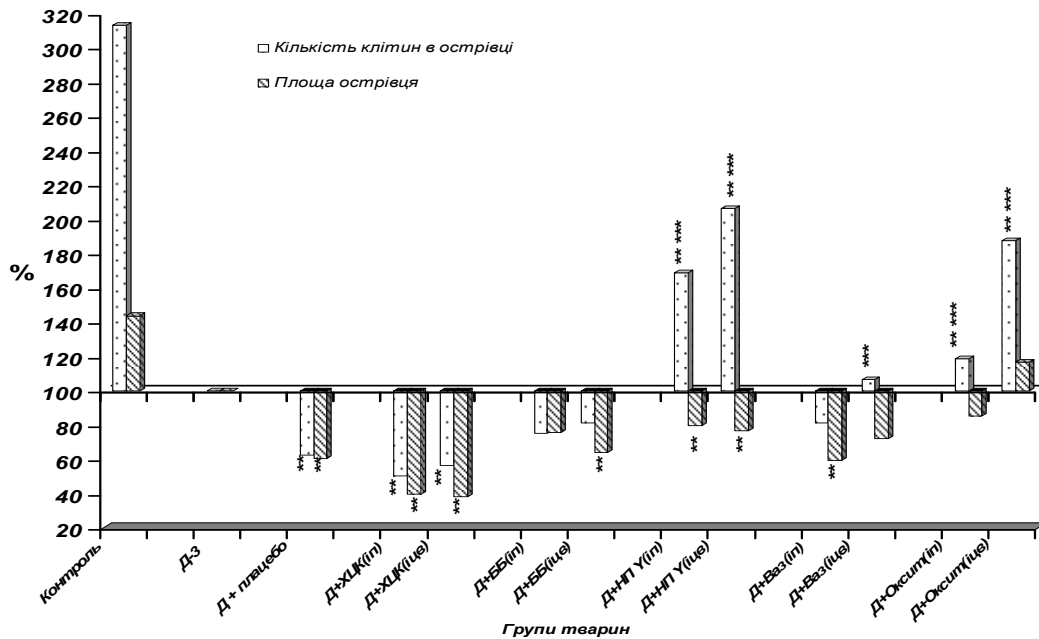


Рис. 3. Вплив введення регуляторних пептидів на площу панкреатичних острівців і кількість  $\beta$ -клітин у діабетичних тварин. (в відсотках відхилень від показників групи тварин з трьохтижневим діабетом);

\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин із трьохтижневим діабетом ( $p < 0,05$ );

\*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ ).

Так, на третьому тижні патологічного процесу зменшення площі острівців складало 15 %, а на п'ятому тижні площа скоротилася ще на 40 %. Ці зміни були пов'язані зі значним зменшенням кількості  $\beta$ -клітин в острівцях ( $r = 0,76$ ;  $p < 0,05$ ), зокрема, якщо в групі контрольних тварин середня кількість цих клітин в острівці складала 50, то через три тижні після індукції діабету залишалася 16, а при введенні плацебо до кінця п'ятого тижня зменшувалося до 10.

Таку прогресивну загибель  $\beta$ -клітин після введення стрептозоточину можна пояснити не тільки  $\beta$ -цитотоксичністю антибіотика, але і подальшим запуском у панкреатичних острівцях аутоімунних процесів, що беруть участь у деструкції цих клітин, що і було доведено в роботах (Камишний О.М., 2006), а крім того, ініціацією обумовленого глюко- і ліпотоксичністю апоптозу (Robertson P.R. et al., 2004).

Введення регуляторних пептидів спричиняло різний вплив на цей процес: ХЦК-4 підсилював процеси деструкції острівців (кількість  $\beta$ -клітин значно знизилася відносно показника в групі тварин, що отримували плацебо), ББ і Ваз – гальмували процеси деструкції (кількість  $\beta$ -клітин залишалася на рівні трьохтижневого діабету), тоді як при введенні нПУ і Окс кількість  $\beta$ -клітин значно збільшувалася, що може бути наслідком стимуляції процесів проліферації і гальмування апоптотичної загибелі  $\beta$ -клітин в острівцях підшлункової залози діабетичних тварин.

По-різному здійснювали вплив нейропептиди і на процеси, пов'язані з синтезом і секрецією інсуліну (рис. 4).

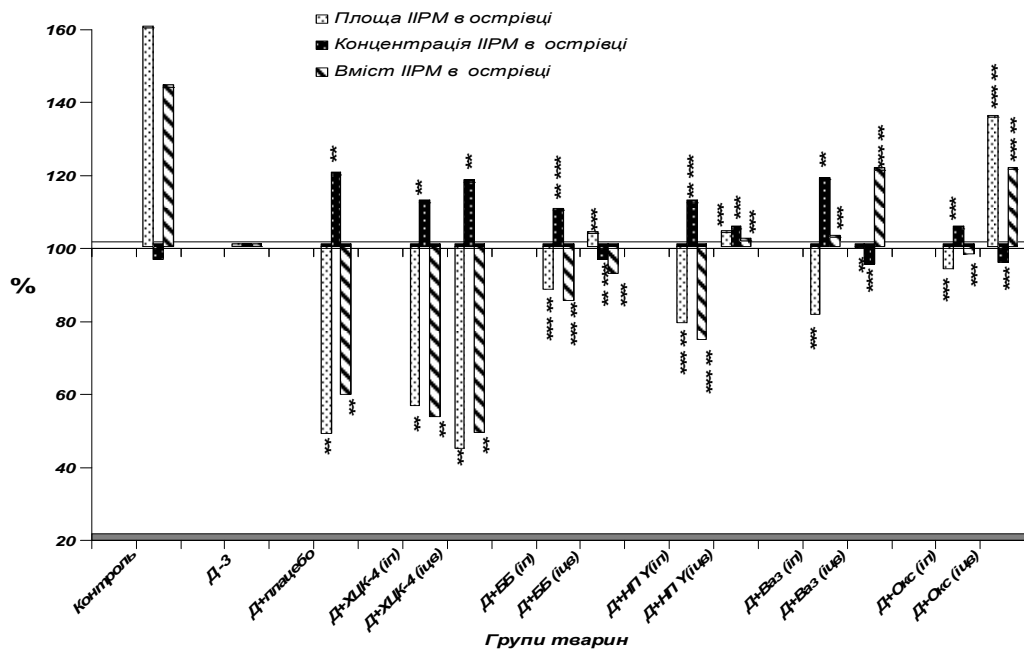


Рис. 4. Вплив введення регуляторних пептидів на площу, концентрацію і вміст ІІРМ в острівцях діабетичних тварин (в відсотках відхилень від показників групи тварин із тритижневим діабетом);

\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин із тритижневим діабетом ( $p < 0,05$ );

\*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ ).

У групі діабетичних щурів, що отримували плацебо, реєстрували значне зниження площі і вмісту ІІРМ, що можна пояснити зменшенням синтезу інсуліну  $\beta$ -клітин, разом з тим концентрація ІІРМ зростала, що, ймовірно, свідчить про пригнічення процесів секреції гормону.

Аналогічні зміни спостерігалися і в групах діабетичних тварин, яким вводили ХЦК-4. Відсутність активації синтезу інсуліну, на відміну від тієї, що спостерігалася у нормоглікемічних тварин, можна пояснити недостатньою експресією рецептора ХЦК у діабетичних щурів (Funakoshi A., 1996), або виснаженням пулу  $\beta$ -клітин, що залишився, з

посиленням проапоптотичного шляху їх загибелі, пов'язаного з накопиченням надмірної кількості білкових молекул у цитоплазмі клітин при пониженій секреції гормону в кров (Araki E. Et al., 2003).

Підтвердженням останнього служить висока концентрація ІРМ в острівцях тварин, які отримували ХІЦК-4 (див. рис. 4).

У тих групах тварин, яким ББ і нпУ вводили периферійно, спостерігалось менш виражене пригнічення синтезу і секреції інсуліну, яке все ж таки відрізнялося від показників тварин з тритижневим діабетом. При цьому центральне введення ББ і нпУ спричиняло нормалізуючий вплив на синтез і секрецію інсуліну. Площа, концентрація і вміст ІРМ в острівці в цих групах тварин не відрізнялися від показників у групі тварин з тритижневим діабетом і значно перевищували параметри, відмічені у діабетичних тварин, що отримували плацебо (див. рис. 4).

Центральне введення Ваз призводило до активації синтезу і секреції інсуліну в залишкових  $\beta$ -клітинах, що узгоджується з літературними даними (Folny V. et al., 2003). Проте, подібна функціональна напруга інсулін-синтезуючого апарату, як вже було зауважено вище, здатна з часом призводити до виснаження і загибелі  $\beta$ -клітин (Grill V., Bjorklund A., 2001).

Привертає увагу той факт, що відзначене раніше збільшення кількості  $\beta$ -клітин в острівцях тварин з експериментальним діабетом при центральному введенні Окс супроводжувалося статистично достовірним збільшенням площі і вмісту ІРМ, тоді як концентрація ІРМ в острівцях не відрізнялася від контрольної. Це дозволяє припустити, що в панкреатичних острівцях під впливом Окс не тільки підвищувався синтез, але і нормалізувалася секреція інсуліну в кров.

З отриманих даних можна зробити висновки, що центральні введення нейропептидів чинили більш ефективний вплив на морфофункціональну активність  $\beta$ -клітин (див. рис. 4). Оскільки нейропептиди, що вводяться в шлуночок мозку, через низьку дозу не могли в достатній кількості проникати в кровотік, досліджуваний ефект не пов'язаний з прямою дією на рецептори  $\beta$ -клітин або запальний процес в острівцях. Ми припускаємо, що посилення морфофункціональної активності  $\beta$ -клітин при внутрішньомозкових введеннях обумовлене активуючою дією нейропептидів на структури гіпоталамусу і моторне ядро блукаючого нерва, які мають рецептори до них. Можливо, що в умовах функціональної недостатності пептидергійної системи гіпоталамусу при ЦД введення екзогенних нейропептидів виявляє замісну дію та створює умови для компенсації центральних механізмів регуляції ендокринної функції підшлункової залози.

Дослідження кількості і морфометричних параметрів  $\alpha$ -клітин в панкреатичних острівцях у діабетичних тварин показало, що зі збільшенням терміну діабету спостерігається прогресивне збільшення кількості  $\alpha$ -клітин і підвищення вмісту ГІРМ у них (рис. 5).

На противагу ХІЦК-4, введення діабетичним тваринам ББ, нпУ і Ваз перешкоджало прогресуючому зростанню кількості  $\alpha$ -клітин, площі і вмісту в них ГІРМ. Отримані результати не суперечать даним літератури, згідно з якими деякі пептиди у нормоглікемічних тварин стимулюють синтез глюкагону, а за умов гіперглікемії

виявляють протилежний ефект – гальмують його синтез (Ponery A.S., Adeghate E. 2000).

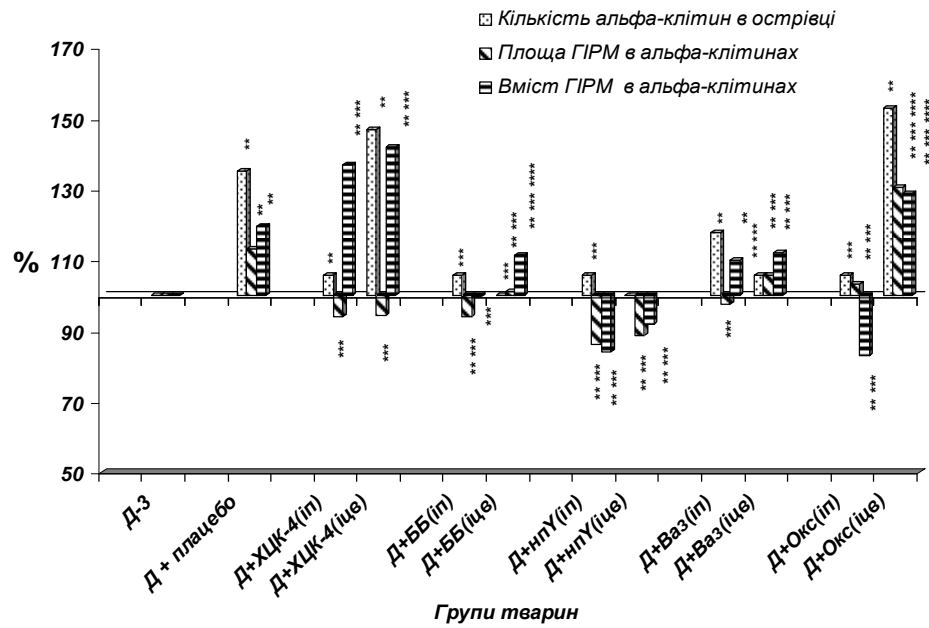


Рис. 5. Вплив введення регуляторних пептидів на кількість  $\alpha$ -клітин, площу і вміст ГІРМ в  $\alpha$ -клітинах діабетичних тварин (в відсотках відхилень від показників групи тварин з тритижневим діабетом):

- \*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин із тритижневим діабетом ( $p < 0,05$ );
- \*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ );
- \*\*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, яким нейропептид вводили іп ( $p < 0,05$ ).

Встановлено, що ведення Окс спричиняє різноспрямовану дію на морфофункціональний стан  $\alpha$ -клітин (див. рис. 5). Периферійне надходження гормону перешкоджало прогресуючому зростанню кількості  $\alpha$ -клітин, площі і вмісту в них ГІРМ, тоді як його центральне введення стимулювало вищезазначені процеси, що, ймовірно, реалізується через V1b- або Окс-рецептори (Fujiwara Y. et al., 2007).

Розрахунок відносного вмісту глюкагону й інсуліну в панкреатичних острівцях показав, що при введенні ХЦК більше, ніж у 3 рази збільшувався відносний вміст ГІРМ (рис. 6). Як відомо, у діабетичних тварин спостерігається порушення внутрішньоострівцевої паракринної регуляції синтезу і секреції гормонів, що пов'язано з гіпертрофією  $\alpha$ - і  $\Delta$ -клітин, яка поєднується з підвищенням синтезу і секреції глюкагону і соматостатину в кровотоці (Колесник Ю.М., Абрамов О.В., 1993). Отримані нами результати дослідження свідчать про те, що при діабеті переважає стимулююча дія ХЦК на  $\alpha$ -клітини підшлункової залози, що узгоджується з літературними даними, які відзначають транзиторну гіперглікемію після одноразового центрального введення ХЦК (Khalid P. Et al., 1989).

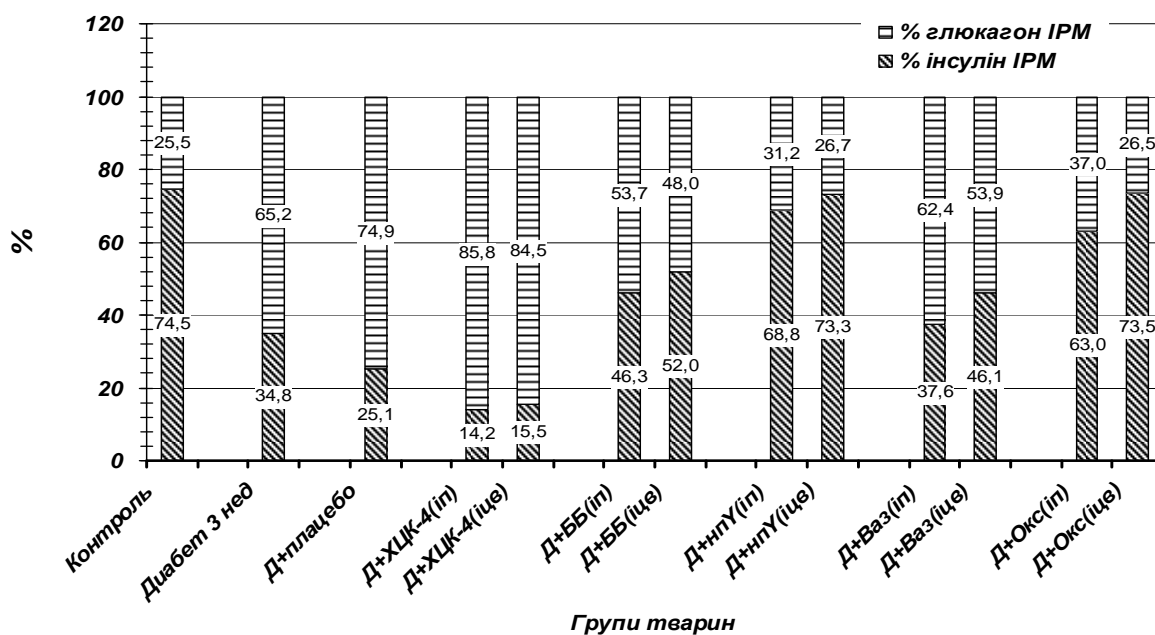


Рис. 6. Вплив введення регуляторних пептидів на відносний вміст ПРМ і ГРМ в панкреатичних острівцях діабетичних тварин.

При цьому спостерігалось зміщення рівноваги в балансі інсулін/глюкагон на користь останнього, чим можна пояснити комплекс виявлених нами порушень у вуглеводному і гормональному обміні при введенні ХЦК-4 діабетичним тваринам.

Введення ББ і Ваз перешкоджало прогресивному збільшенню частки ГРМ в острівцях, яке спостерігалось в групі діабетичних тварин що отримували плацебо. Проте співвідношення ГРМ і ПРМ в острівцях при цьому достеменно не відрізнялося від показника тварин з тритижневим діабетом.

Введення діабетичним тваринам нпУ і Окс зумовлювало виражене збільшення частки ПРМ в острівці, внаслідок чого співвідношення ГРМ і ПРМ максимально наближалось до показника групи контрольних тварин (див. рис. 6).

При дослідженні вмісту гормонів у крові було встановлено, що в групі діабетичних тварин реєструвалось прогресивне зниження рівня інсуліну (до кінця третього тижня діабету на 35 %, а до кінця п'ятого тижня - на 70 % порівняно з контрольною групою тварин (рис. 7).

Разом з тим спостерігалось зростання концентрації глюкокортикоїдів у 3,6 раза і, відповідно, збільшення індексу резистентності в 13 разів. Введення ХЦК не викликало значних змін у динаміці розвитку діабету, тільки при центральному введенні пептиду спостерігалось статистично достовірне підвищення концентрації глюкокортикоїдів, що не суперечить літературним даним, які також показують, що ХЦК-4 може стимулювати симпато-адреналову систему і підвищувати вміст кортикостероїдів у крові (Strohle A., Holsboer F., Rupprecht R., 2000).

Решта нейропептидів сприяла зменшенню негативного гормонального дисбалансу у діабетичних тварин. Так, при введенні ББ і Ваз, концентрації інсуліну та глюкокортикоїдів мало відрізнялися від аналогічних показників у групі з тритижневим діабетом. В той же час

введення нпУ і особливо Окс викликало підвищення концентрації інсуліну порівняно з групою тварин з тритижневим діабетом (див. рис. 7).

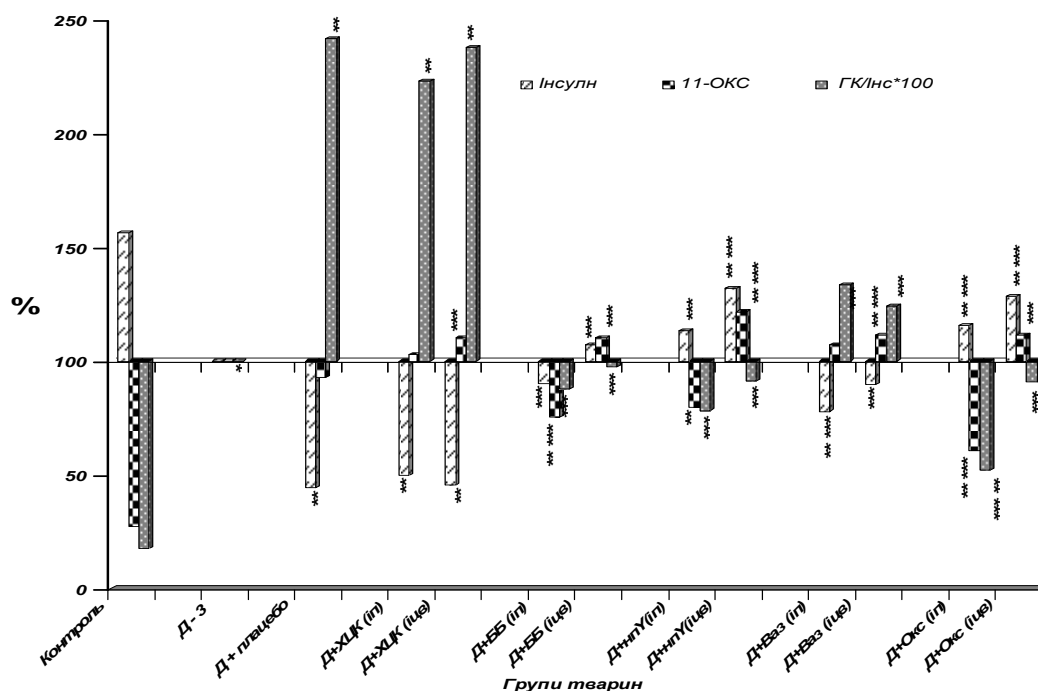


Рис. 7. Вплив введення регуляторних пептидів на концентрацію інсуліну і глюкокортикоїдів у крові й індекс резистентності (ГК/ІНС) у діабетичних тварин (у відсотках відхилень від показників групи тварин з тритижневим діабетом):

- \*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин із тритижневим діабетом ( $p < 0,05$ );
- \*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ ).

Слід зазначити, що при периферійному введенні Окс реєструвалося значне зменшення концентрації глюкокортикоїдів у крові і, відповідно, індексу резистентності.

Визначення концентрації тиреоїдних гормонів у крові показало, що розвиток експериментального діабету супроводжувався значним зниженням рівня визначуваних гормонів і зростанням індексу  $fT_4/fT_3$ , що свідчить не тільки про пригнічення функції щитоподібної залози, але і про гальмування процесів дейодування  $T_4$  у периферійних тканинах.

Дефіцит тиреоїдних гормонів спричиняє гальмування глікоконезу у печінці, уповільнює утилізацію і рециркулювання глюкози в циклі Корі і глікозоаланіновому циклі, зменшує активність мітохондріальних «холостих» циклів при термогенезі і при цьому викликає зниження секреції інсуліну (Potenza M., Via M.A., Yanagisawa R.T., 2009).

Введення нейропептидів діабетичним тваринам призводило до диференційованого впливу на рівні тиреоїдних гормонів у крові. При обох шляхах введення ХЦК-4, ББ і

периферійному введенні нПҮ спостерігалось подальше зниження концентрації досліджуваних гормонів, як і в групі діабетичних тварин, що отримували плацебо. Разом з тим, центральне введення нПҮ викликало найбільш виражене зниження рівня тиреоїдних гормонів у крові. Як показали дослідження інших авторів, даний ефект пептиду пов'язаний з активацією Y1 і Y5 рецепторів у гіпоталамусі і подальшим зменшенням секреції тиреотропного гормону гіпофізом (Fekete C. et al., 2002). На відміну від попередніх пептидів, введення Ваз і Окс сприяло нормалізації рівня тиреоїдних гормонів у крові, яка супроводжувалася підвищенням індексу конверсії, що свідчить про активацію процесів дейодування в периферійних тканинах. Ймовірніше, ці ефекти при центральному введенні реалізуються шляхом посилення секреції тиреотропного гормону гіпофізу (Ciosek J., Drobnik J., 2004), а при периферійному введенні – шляхом безпосереднього впливу на щитоподібну залозу (Krasnovskaia I.A., Sheibak T.V., 1990).

Моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів викликало значне зниження вмісту глікогену в тканинах м'язів і печінки. При цьому введення ХЦК-4, незалежно від шляху надходження нейропептиду, посилювало цей процес, що, скоріш за все, пов'язано з вираженою стимуляцією секреції глюкокортикоїдів і відповідним збільшенням індексу інсулінорезистентності у даних тварин. Введення Ваз також дещо знижувало вміст глікогену в печінці, що можна пояснити його інгібуючим впливом на глікогенсинтетазу (Ciudad C. et al., 1984), тоді як решта нейропептидів подібним чином нормалізували вищезгаданий компонент вуглеводного обміну у діабетичних щурів, що узгоджується з їх гормональним статусом.

Важливою патогенетичною ознакою ЦД є гіперліпідемія і пов'язана з нею ліпотоксичність. Досліджувані регуляторні нейропептиди в умовах патологічного процесу здатні змінювати характер свого впливу, що було продемонстровано на прикладі ББ і НПҮ, які, на відміну від дії в умовах нормаглікемії, у діабетичних тварин сприяли антиліполітичному ефекту. Зокрема, концентрація НЕЖК у крові була значно нижча, ніж у діабетичних тварин, що отримували плацебо. Разом з тим, високий рівень тригліцеридів свідчить про неповну нормалізацію ліпідного гомеостазу і збереження діабетичної дисліпідемії у тварин, яким вводили ББ або НПҮ.

Введення діабетичним тваринам ХЦК-4 як центральне, так і периферійне, виявляло виражену ліполітичну дію, яка спостерігалася і у здорових щурів. Проте, необхідно додати, що у досліджуваних тварин з ЦД у даній групі також виявлено високий рівень глюкокортикоїдів, що могло у свою чергу потенціювати виявлений ефект.

Як і в умовах нормаглікемії, введення діабетичним тваринам Ваз виявляло антиліполітичну дію і практично відновлювало показники ліпідного обміну до рівня контрольних тварин, тоді, як при введенні Окс недостатньо знижувався рівень тригліцеридів в крові, що свідчить про збереження деякого дисбалансу якісного і кількісного складу ліпопротеїнів.

Діабетична дисліпідемія разом з гіперглікемією призводила до розвитку оксидативного стресу, що знайшло своє відображення в підвищенні вмісту продуктів ліпопероксидації в крові і зниженні антиоксидантного захисту у діабетичних тварин.



Центральне введення ББ і нпУ викликало більш виражене гальмування інтенсивності перекисного окислення ліпідів порівняно з периферійним, ймовірно, завдяки включенню регуляторних механізмів загальної стрес-реакції на рівні транскрипції (Fekete C. et al., 2002). Це супроводжувалося деякою активацією каталази на тлі нормального стану глутатіонової ланки антиоксидантного захисту, але виснаженням пулу активного токоферолу. Останнє, мабуть, пов'язано з підвищенням вмісту і окисленням ліпопротеїнів низької і дуже низької щільності, про що свідчили високі рівні тригліцеридів і МДА у крові тварин цих груп.

Центральне введення Ваз нормалізувало параметри оксидативного статусу, але при цьому спостерігалася гіперактивація глутатіонредуктази, що свідчить про напругу в роботі глутатіонової ланки захисту.

Периферійне введення даного нейропептиду, не зважаючи на вищу, ніж при центральному надходженні, активність каталази, нормалізувало параметри ліпопероксидації меншою мірою. Неповне відновлення рівня продуктів ліпідної пероксидації у діабетичних тварин, яким вводили Окс, на нашу думку, пов'язано зі збереженням дещо підвищеного рівня тригліцеридів у циркуляції, що було менш виражене при центральному надходженні нейропептиду. Разом з тим, вивчені показники активності компонентів антиоксидантного захисту в групах тварин з введенням Окс були вищими, ніж при тритижневому діабеті, і найбільш наближалися до таких показників в контрольній групі щурів.

Узагальнюючи результати, отримані в серії експериментів на тваринах із стрептозотоцин-індукованим діабетом, можна констатувати, що за винятком ХЦК-4, всі обрані для дослідження регуляторні нейропептиди тією чи іншою мірою проявляли достовірний антидіабетичний ефект, спрямований на різні ланки патології, як метаболічні, так і пов'язані зі збереженням функціонально-активної маси панкреатичних  $\beta$ -клітин. Визначена в літературі терапевтична дія ХЦК при експериментальному діабеті *in vivo*, мабуть, в основному реалізується через ХЦК-рецептори 1 типу, які не активуються дослідженням нами ХЦК-тетрапептидом (Луцик Н.С., 1987). Ймовірно, гальмівного впливу на запальний процес і посилення секреції інсуліну, які забезпечує активація ХЦК-рецепторів 2 типу (Ubink R. et al., 2000), у змодельованих нами умовах виявилось недостатньо для компенсації контрінсулінових ефектів і істотної нормалізації патологічного стану.

Таким чином, враховуючи ступінь прояву антидіабетичного ефекту, а також той факт, що у пацієнтів з ЦД зустрічається висока частота супутньої патології, серед якої гіпертонічна хвороба (що виключає застосування вазопресину) і ожиріння (завдяки лептинорезистентності, яке не передбачає використання нейропептиду Y) (Tiesjema B. et al., 2007), а крім того, враховуючи те, що багато типів пухлин активно експресують бомбезинові рецептори 2 і 3 типів (Ladenheim E.E. et al., 1996), найбільш перспективним об'єктом для поглибленого вивчення було обрано окситоцин. Оскільки центральне введення Окс, крім сприятливої дії на інсулін-продукуючий апарат і метаболічні ланки, задіяні в патогенезі ЦД, викликало також виражену активацію  $\alpha$ -клітин панкреатичних острівців, нейропептид надалі вивчався в умовах його периферійного надходження.

Загальноприйнятим на сьогодні є той факт, що основний принцип лікування ЦД полягає у нормалізації порушення обміну речовин. При цьому, корекції потребують не лише показники вуглеводного обміну, але й стан ліпідного, білкового і водно-сольового обмінів, а також оксидативний статус пацієнтів, що є важливим для попередження розвитку діабетичних судинних ускладнень.

У наступній серії експериментів нами було проведено дослідження спільного впливу периферійного введення Окс та інсуліну (Інс) протягом двох тижнів на перебіг стрептозотоцин-індукованого діабету, при цьому Інс застосовувався в дозі 2 ОД/кг (доза 1), яка не викликала повної компенсації метаболічного статусу у діабетичних тварин. Групи порівняння отримували плацебо, Окс або Інс в аналогічній (доза 1), а також у вищій дозі (доза 2-3 ОД/кг), що призводить до субкомпенсації і компенсації метаболічних параметрів.

Отримані результати показали, що за основними показниками, які характеризують гліко- і ліпотоксичність, що є патогенетичною складовою ЦД і його ускладнень, тварини в групі з сумісним введенням Окс і Інс не відрізнялися від тварин з діабетом у стані компенсації, а в більшості випадків і від контрольних інтактних тварин. Це такі показники, як динаміка зміни маси тіла, базальна глікемія, ступінь неферментативного глікозилювання білків, вміст глікогену в тканинах, рівень НЕЖК і холестерину в циркулюючій крові, вміст продуктів ліпопероксидації й активність окремих компонентів антиоксидантного захисту в еритроцитах.

Крім нормалізації метаболічних параметрів сумісне введення Окс та Інс покращувало гормональний фон діабетичних тварин, що виявлялося у підвищенні рівня інсуліну і кількості еритроцитів у крові, які містять інсулін, зниженні рівня 11-ОКС і підвищенні рівня тиреоїдних гормонів у крові до величин, які істотно не відрізнялися від аналогічних показників у групі нормоглікемічних тварин.

Імуногістохімічні дослідження показали, що самостійне введення інсуліну, незалежно від дози, практично не гальмувало прогресуюче зменшення кількості  $\beta$ -клітин у панкреатичних острівцях, хоча і призводило до деякого збереження в них інсулін-імунореактивного матеріалу (табл. 2). Разом з тим введення Окс і, більшою мірою, Окс разом з Інс призводило до збільшення кількості функціонально-активних  $\beta$ -клітин порівняно з показником у щурів до лікування і в плацебо-групі (табл. 2).

Морфометричні дослідження виявили, що моделювання стрептозотоцин-індукованого діабету супроводжувалося зменшенням вмісту в підшлунковій залозі великих ( $S > 7000 \text{ мкм}^2$ ) і середніх ( $2000 < S < 7000 \text{ мкм}^2$ ) за розміром острівців, тоді як подальша маніфестація призводила до повного зникнення великих острівців і додаткового зменшення кількості середніх острівців, що вже не було пов'язане з токсичним ефектом антибіотика, а мало в своїй основі діабетогенну апоптотичну загибель  $\beta$ -клітин.

Відомо, що великі острівці, які складаються, головним чином, зі зрілих клітин, у першу чергу схильні до дії проапоптотичних сигналів (Gunev M. A., Gannon M., 2009). На цьому фоні спостерігалось виражене збільшення частки маленьких острівців, що свідчить про початок репаративного процесу в залозі (Banerjee M. et al., 2005).

**Стан  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців підшлункової залози у діабетичних тварин при сумісному введенні інсуліну та окситоцину, ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ ), n=15**

Групи тварин	Кількість $\beta$ -клітин в острівці	Площа острівця мкм <sup>2</sup>	ПРМ в острівці		
			Площа мкм <sup>2</sup>	Концентрація уОД	Вміст уОД
Контроль	51±2	3574±278	1690±57	0,91±0,03	1526±65
Діабетичні, 3 тижні	17±2 <sup>a</sup>	2644±229 <sup>a</sup>	1113±49 <sup>a</sup>	0,98±0,04 <sup>a</sup>	1062±56 <sup>a</sup>
Діабетичні + плацебо	10±1 <sup>a,б</sup>	1215±95 <sup>a,б</sup>	305±13 <sup>a,б</sup>	1,27±0,04 <sup>a,б</sup>	393±19 <sup>a,б</sup>
Діабетичні + окситоцин	23±3 <sup>a,в</sup>	2693±235 <sup>a,в</sup>	1104±56 <sup>a,в</sup>	1,10±0,03 <sup>a,б,в</sup>	1187±66 <sup>a,в</sup>
Діабетичні + інсулін (доза 1)	13±3 <sup>a</sup>	1787±139 <sup>a,б,в,г</sup>	484±19 <sup>a,б,в,г</sup>	0,95±0,02 <sup>б,г</sup>	441±17 <sup>a,б,г</sup>
Діабетичні + інсулін (доза 2)	15±3 <sup>a</sup>	2155±188 <sup>a,в,г</sup>	552±28 <sup>a,б,в,г,д</sup>	1,02±0,03 <sup>a,в,г,д</sup>	550±31 <sup>a,б,в,г,д</sup>
Діабетичні + інсулін + окситоцин	28±3 <sup>a,б,в,д,е</sup>	2910±230 <sup>в,д,е</sup>	1340±48 <sup>a,б,в,г,д,е</sup>	1,10±0,02 <sup>a,б,в,г,д,е</sup>	1413±42 <sup>б,в,г,д,е</sup>

Примітки:

- <sup>a</sup> - вірогідність відмінності з інтактною групою (p< 0,05);
- <sup>б</sup> - вірогідність відмінності з групою тварин на 3 тижні діабету (p< 0,05);
- <sup>в</sup> - вірогідність відмінності з групою діабетичні + плацебо (p< 0,05);
- <sup>г</sup> - вірогідність відмінності з групою діабетичні + окситоцин (p<0,05);
- <sup>д</sup> - вірогідність відмінності з групою діабетичні + інсулін (доза 1) (p<0,05);
- <sup>е</sup> - вірогідність відмінності з групою діабетичні + інсулін (доза 2) (p<0,05).

У зв'язку з цим, слід зазначити, що двотижнєве окреме введення інсуліну при тому ж ступені метаболічної компенсації не сприяло збереженню числа острівців, тоді як сумісне застосування Інс і Окс ефективно гальмувало прогресуючу загибель острівців і, разом з активацією проліферативних процесів, призводило до того, що кількісний склад ендокринної частини підшлункової залози статистично не відрізнявся від показників в контрольній групі.

Самостійна активуюча дія Окс на проліферацію переважно  $\beta$ -клітин підшлункової залози як при центральному, так і при периферійному введенні нейропептиду була доведена в додатковій серії експериментів по включенню БрДУ у ДНК-синтезуючі клітини острівців. Такий вплив Окс може бути обумовлений як мітогенною дією, пов'язаною з його впливом на секрецію пролактину (Ozawa H., 1993), ІФР-1 і ІФР-2 (Sohlstrom A., 2000), так і безпосередньою дією Окс на метаболічну активність і інтенсивність транскрипції у  $\beta$ -клітинах, які сприяють їх виживанню в умовах функціональної напруги (Agumugam R., 2008).

Крім відзначеного позитивного впливу спільного введення інсуліну і Окс на інсулін-продукуючі клітини панкреатичних острівців діабетичних тварин, був виявлений його гальмуючий ефект на обумовлене ЦД збільшення кількості  $\alpha$ -клітин і площу глюкагон-імунореактивного матеріалу в острівцях, а також зниження вмісту катехоламінів в еритроцитах. Останнє можна пояснити відомим анксиолітичним ефектом Окс (Landgraf R., 2004), що також спричиняє позитивний вплив на стійкість метаболічної компенсації ЦД.

Нормалізація гормонального статусу діабетичних тварин, які отримували Окс разом з Інс, супроводжувалася вірогідним покращенням толерантності до глюкози і відновленням чутливості периферійних тканин до дії інсуліну (рис. 8).

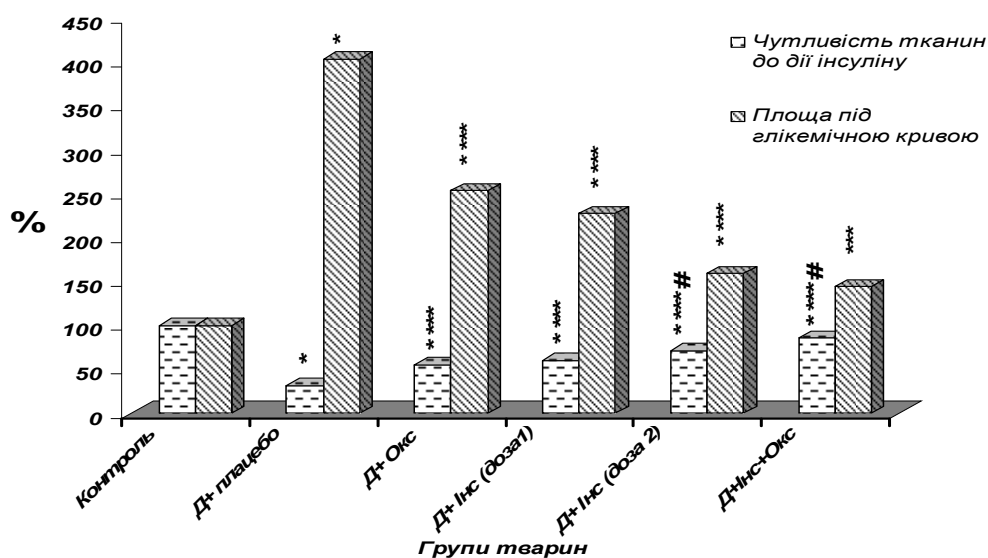


Рис. 8. Вплив самостійного та сумісного введення Окс та Інс на чутливість тканин до дії інсуліну та площу під глікемічною кривою у діабетичних тварин (в відсотках відхилення від показників контрольної групи тварин):

- \* - вірогідність відмінності з групою контрольних тварин ( $p < 0,05$ );
- \*\*\* - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували плацебо ( $p < 0,05$ );
- # - вірогідність відмінності з групою діабетичних тварин, що отримували інсулін (доза 1).

Таким чином, отримані в цій серії експериментів результати дозволяють зробити висновки, що як периферійне, так і центральне введення вибраних для дослідження регуляторних нейропептидів викликало метаболічні ефекти, які проявляють антидіабетичну дію різного ступеня виразності, обумовлену одночасною активацією ряду контрінсулінових механізмів. Зокрема, всі нейропептиди, за винятком Окс при периферійному його введенні, в тій чи іншій мірі активували секрецію глюкокортикоїдів, тиреоїдних гормонів, а також стимулювали роботу  $\alpha$ -клітин підшлункової залози, що не дозволяло досягти стійкої метаболічної компенсації за умов цукрового діабету. Слід зазначити також, що холецистокініну-тетрапептид, який активував секрецію інсуліну у нормоглікемічних тварин, за умов експериментального ЦД терапевтичної дії не виявив.

Бомбезін викликав, головним чином, метаболічні антидіабетичні ефекти, можливо, частково опосередковані активацією секреції інкретинів (Yavropoulou M.P. et al., 2010). У той же час нейропептид Y більшою мірою сприяв збереженню маси панкреатичних  $\beta$ -клітин, тоді як достатньої метаболічної компенсації у діабетичних тварин не відбувалося.

Виявлений за умов експериментального діабету виразний антиапоптотичний і стимулюючий регенерацію  $\beta$ -клітин панкреатичних острівців ефекти окситоцину свідчать про перспективність його використання з метою попередження і гальмування прогресуючої втрати маси функціонально-активних інсулін-синтезуючих клітин у хворих на ЦД 2 типу. Окрім того, той факт, що спільне введення окситоцину та інсуліну сприяє досягненню більш стійкої метаболічної компенсації при меншій дозі останнього, може бути підґрунтям для його використання в терапії ЦД 1 типу.

## ВИСНОВКИ

Експериментально обґрунтована перспективність включення регуляторних нейропептидів до складу мультифакторної антидіабетичної терапії з метою попередження і гальмування прогресуючого погіршення функціональної активності панкреатичних бета-клітин при ЦД 2 типу, а також для досягнення більш стійкої метаболічної компенсації при меншій дозі інсуліну у разі ЦД 1 типу.

1. Ефекти досліджуваних нейропептидів на ендокринну функцію підшлункової залози й асоційовані метаболічні процеси залежать як від початкового рівня інсулінової забезпеченості організму (нормоглікемія або гіперглікемія), так і від шляху введення нейрогормонів (центральний або периферійний).

2. У результаті порівняльного аналізу впливу досліджуваних регуляторних пептидів в умовах нормоглікемії було встановлено, що за ступенем виразності стимулюючого ефекту на морфо-функціональний стан бета-клітин панкреатичних острівців (маса клітин і вміст у них ІРМ) вони розташовуються в наступному порядку: Окс, ББ, нпY, Ваз, ХЦК-4, причому, дія підвищувалася при центральному введенні нейропептидів. Максимальне збільшення панкреатичних  $\alpha$ -клітин і вміст у них ГРМ спостерігалось при обох шляхах введення ХЦК-4.

3. Досліджувані регуляторні пептиди виявляють різноспрямований вплив на морфо-функціональний стан панкреатичних острівців після їх субтотальної деструкції стрептозотоцином: ХЦК-4 сприяє зниженню кількості  $\beta$ -клітин, ББ і Ваз – гальмують процеси деструкції, тоді як при введенні нпY і Окс відзначається стимуляція процесів проліферації і гальмування апоптотичної загибелі  $\beta$ -клітин в панкреатичних острівцях. Центральне і периферійне введення діабетичним тваринам ББ, нпY і Ваз, а також тільки периферійне застосування Окс перешкоджає прогресуючому зростанню кількості  $\alpha$ -клітин, площі і вмісту в них ГРМ. При введенні діабетичним тваринам нпY і Окс реєструється виражене збільшення відносного вмісту інсуліну в острівцях, внаслідок чого нормалізується в них співвідношення глюкагон/інсулін.

4. Центральне введення ХЦК-4, ББ, нпY, Окс, а також периферійне застосування Окс сприяє одночасному підвищенню рівня інсуліну і контрінсулінового гормону – кортикостерону в крові інтактних тварин, що забезпечує збереження базальної

нормоглікемії. При центральному введенні нпУ і обох шляхах введення Ваз спостерігається зменшення коефіцієнта  $fT3/fT4$ , що, ймовірно, пов'язано з пригніченням процесів дейодування  $fT4$  у периферійних тканинах. Разом з тим Окс, при обох шляхах введення, викликає істотне підвищення даного коефіцієнта, що свідчить про активацію процесів конверсії тироксину в периферійних тканинах.

5. Введення всіх досліджуваних нейропептидів, крім ХЦК, призводить до поліпшення глікемічного контролю у тварин з експериментальним ЦД, проте тільки при введенні нпУ і Окс спостерігається значне підвищення рівня інсуліну в крові. Слід зазначити, що при периферійному введенні Окс також реєструється істотне зменшення концентрації глюкокортикоїдів у крові. Введення Ваз і Окс призводить до нормалізації рівня тиреоїдних гормонів у крові, що супроводжується відновленням індексу  $fT3/fT4$  і свідчить про активацію процесів дейодування в периферійних тканинах.

6. Введення всіх досліджуваних нейропептидів, крім ХЦК, діабетичним тваринам сприяє зниженню ліпотоксичності, що підтверджується зменшенням концентрації НЕЖК у сироватці крові. При центральному введенні нпУ і обох шляхах введення Ваз і Окс в умовах гіперглікемії реєструється зниження виявлення оксидативного стресу на тлі підвищення активності ферментативної ланки АОЗ.

7. Порівняльний аналіз фармакологічних ефектів антидіабетичної спрямованості показав, що серед досліджуваних нейропептидів найбільш виразні антидіабетичні властивості притаманні Окс при периферійному введенні.

8. Окситоцин у дозі 1 МЕ/КГ маси тіла стимулює проліферацію альфа- і бета-клітин за умов нормоглікемії. У діабетичних тварин, після субтотальної деструкції острівців стрептозотоцином, окситоцин переважно стимулює регенерацію бета-клітин у панкреатичних острівцях. Виявлений стимулюючий ефект Окс на регенерацію і неогенез бета-клітин у панкреатичних острівцях свідчить про перспективність його використання з метою попередження і гальмування розвитку інсулінової недостатності.

9. Сумісне введення окситоцину з інсуліном гальмує морфологічні і метаболічні прояви абсолютної інсулінової недостатності, що характеризується збільшенням кількості функціонуючих  $\beta$ -клітин і нормалізацією співвідношення інсулін/глюкагон у панкреатичних острівцях, зниженням глюкотоксичності, підвищенням толерантності до глюкози, поліпшенням ліпідного обміну і оксидативного статусу у діабетичних тварин. Виявлені фармакологічні ефекти Окс свідчать про перспективність його використання в комплексній терапії цукрового діабету з метою збереження ендокринної функції підшлункової залози, а також нормалізації метаболічних процесів, що асоційовані з інсуліновою недостатністю.

## **СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Тржецинский, С.Д. Изменения в липидном обмене и свободно-радикальном окислении у животных с экспериментальным диабетом [Текст] / С.Д. Тржецинский // Актуальні питання фарм. та мед. науки і практики: зб. наук. статей. – Запоріжжя, 1999. – Вип. 4. – С. 97-103.

2. Тржецинский, С.Д. Состояние углеводного обмена у диабетических животных при повторном введении окситоцина [Текст] / С.Д. Тржецинский // Вісник фармації. 1999. – №2 (20). – С. 130-133.

3. Тржецинський, С.Д. Стан гормонального, вуглеводного, ліпідного обмінів та вільнорадикального окислювання у тварин з експериментальним діабетом [Текст] / С.Д. Тржецинський, Н.П. Красько // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – Львів, 2001. – №2. – С. 83-88. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті).

4. Тржецинський, С.Д. Вплив холецистокініну-тетрапептиду на стан гормонального та вуглеводного обміну у діабетичних тварин [Текст] // С.Д. Тржецинський, Ю.М. Колесник, В.В. Дунаєв // Медична хімія. – 2003. – Т.5, №4. – С. 66-69. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті).

5. Тржецинский, С.Д. Влияние совместного введения инсулина и окситоцина на течение сахарного диабета у животных [Текст] / С.Д. Тржецинский // Запорожский медицинский журнал. – 2004. – Т. 2, №1. – С. 57-61.

6. Тржецинський, С.Д. Стан глюкозного гомеостазу і глюкозотолерантності у діабетичних тварин при спільному застосуванні інсуліну та окситоцину [Текст] / С.Д. Тржецинський // Ендокринологія. – 2004. – Т. 9, №2. – С. 170-176.

7. Тржецинський, С.Д. Стимулююча дія окситоцину на процеси регенерації в панкреатичних острівцях [Текст] / С.Д. Тржецинський // Одеський медичний журнал. – 2004. – №5 (85). – С. 18-20.

8. Тржецинський, С.Д. Вплив сумісного введення окситоцину з інсуліном на стан альфа- і бета-клітин панкреатичної залози у діабетичних тварин [Текст] / С.Д. Тржецинський, Ю.М. Колесник // Проблеми ендокринної патології. – 2006. – №2. – С. 46-53. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті)

9. Тржецинский, С.Д. Влияние повторного введения холецистокинина-тетрапептида на состояние альфа- и бета-клеток поджелудочной железы [Текст] / С.Д. Тржецинский, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов // Проблеми ендокринної патології. – 2008. – № 3. – С. 34-42. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті).

10. Тржецинский, С.Д. Влияние вазопрессина на функциональное состояние панкреатических островков поджелудочной железы у интактных и диабетических животных [Текст] / С.Д. Тржецинский, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов // Патологія. – 2008. – Т.5, №1. – С. 62-67. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті).

11. Тржецинский, С.Д. Некоторые метаболические показатели и состояние секреции инсулина поджелудочной железой при курсовом введении вазопрессина у интактных и диабетических животных [Текст] / С.Д. Тржецинский // Запорожский медицинский журнал. – 2008. – Т.1, №2. – С. 37-39.

12. Тржецинский, С.Д. Влияние курсового введения окситоцина на гормонально-метаболический статус у здоровых и диабетических животных [Текст] / С.Д. Тржецинский // Патологія. – 2008. – Т. 5, №3. – С. 98-102.

13. Тржецинский, С.Д. Влияние курсового введения бомбезина на гормонально-метаболический статус у здоровых и диабетических животных [Текст] / С.Д. Тржецинский, Ю.М. Колесник, А.В.Абрамов // Проблеми ендокринної патології. – 2009. – №4. – С. 71-77. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлення у вигляді статті).

14. Тржецинский, С.Д. Влияние окситоцина на про- антиоксидантное состояние у диабетических животных [Текст] / С.Д. Тржецинский // Проблеми ендокринної патології. – 2010. – №4. – С. 54-60.

15. Вплив хронічного введення нейропептиду Y на стан бета-клітин острівців Ларгерганса у інтактних і діабетичних тварин [Текст] / А.В. Траїлін, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, С.Д. Тржецинський // Медичні перспективи. – 1998. – Т. III, №2, – С. 21-24. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

16. Бомбезин стимулирует функцию бета-клеток поджелудочной железы при хроническом введении диабетическим крысам [Текст] / А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, С.Д. Тржецинский, О.В.Ганчева // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 1998. – Т. 126., №7. – С. 33-36. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

17. Влияние нейропептидов на функциональное состояние эндокринной функции поджелудочной железы. I. Эффекты хронического введения [Arg<sup>8</sup>]-вазопрессина [Текст] / А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, С.Д. Тржецинский, О.В. Ганчева // Пробл. эндокринологии. – 1998. – Т. 44, №6 – С. 44-47. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

18. Ганчева, О.В. Сравнительная характеристика эффектов введения окситоцина и вазопрессина на состояние  $\alpha$ - и  $\beta$ -клеток островков Лангерганса у интактных и диабетических крыс [Текст] / О.В.Ганчева, С.Д. Тржецинский // Актуальні питання фарм. та мед. науки і практ. – 1999. – Вип. 3. – С. 92-97. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

19. Эффекты хронического введения нейропептида Y на состояние бета- и альфа-клеток островков Лангерганса у интактных и диабетических крыс [Текст] / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, С.Д. Тржецинский, А.В. Траилин // Пробл.



эндокринологии. – 1999. – Т. 45, №2. – С. 42-45. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

20. Стан окситоцинсинтезуючої системи гіпоталамуса щурів з цукровим діабетом, які піддавалися гіпоксичним тренуванням [Текст] / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, С.Д. Тржецинський, О.В. Ганчева // Фізіологічний журнал. – 1999. – Т. 45, №5. – С. 31-37. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

21. Колесник, Ю.М. Вплив окситоцину на стан  $\beta$ -клітин островців Ларгенганса і показники вуглеводного обміну у інтактних щурів і щурів з діабетом [Текст] / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, С.Д. Тржецинський, О.В. Ганчева // Фізіологічний журнал. – 2000. – Т. 46, №1. – С. 37-43. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, імуноморфометричні та біохімічні дослідження, статистичну обробку даних, та їх аналіз).

22. Пат. G09B23/28, A61K38/11 Спосіб лікування цукрового діабету I типу в експерименті [Текст] / С.Д. Тржецинський, Ю.М. Колесник, В.В. Дунаєв (UA); заявник: патентовласник Запорізький державний медичний університет (UA) – № 20031211949; заявл. 19.12.2003; опубл. 15.11.04, Бюл. №11. – 3с. (Дисертантом особисто здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, проведено статистичну обробку даних, їх аналіз та оформлено у вигляді патенту).

23. Нові підходи до фармакотерапії цукрового діабету I типу (методичні рекомендації) [Текст]: методичні рекомендації / М-во охорони здоров'я; [авт. С.Д. Тржецинський, Ю.М. Колесник, В.В. Дунаєв] – К., 2005. – 19с. (Дисертантом розроблено теоретичну та експериментальну основу методичних рекомендацій, здійснено їх оформлення).

24. Тржецинский, С.Д. Характер секреции инсулина поджелудочной железой и некоторые метаболические показатели при хроническом введении вазопрессина в норме и в условиях экспериментального диабета [Текст] / С.Д. Тржецинский //Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: зб. наук. статей. – Запоріжжя, 1998. – Т. II, вип. 2. – С. 70-74.

25. Роль окситоцина в регуляції функції бета-кліток [Текст] / Ю.М. Колесник, А.В. Абрамов, С.Д. Тржецинський, О.В. Ганчева, М.А. Орловський, А.В. Трайлин // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики: сб. наук. статей. – Запоріжжя, 1997. – Вип. I. – С. 229-234. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

26. Эффекты хронического введения вазопрессина на состояние инсулярного аппарата поджелудочной железы [Текст] / А.В. Абрамов, Ю.М. Колесник, С.Д. Тржецинский, А.В. Трайлин, О.В. Мельникова, О.В. Ганчева // Лекарства человеку: междунар. сборник научн. тр.; IV научн.-практ. конф. по созданию и апробации новых лекарственных средств, Москва, 4-5 июня 1997г. – М.,

1997. – Т. 4. – С. 4-8. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

27. Влияние холецистокинина-тетрапептида (30-33) на синтез инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы [Текст] / А.В.Абрамов, Ю.М. Колесник, С.Д. Тржецинский, М.А. Орловский // Лекарства человеку: междунар. сборник научн. тр.; V научн.-практ. конф. по созданию и апробации новых лекарственных средств, Каунас, 3-5 ноября 1997 г. – Каунас, 1997. – Т. 5. – С. 3-7. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

28. Гормональные эффекты нейропептида Y у интактных и диабетических животных [Текст] / А.В. Траилин, Ю.М. Колесник, А.В. Абрамом, С.Д. Тржецинский // Лекарства-человеку; междунар. сб. научн. тр.; VI научно-практ. конф. по созданию и апробации новых лекарственных средств. Харьков, 1998 г. – Харьков, 1998. – Т. 6. – С. 232-235. (Дисертантом здійснено постановку експерименту, біохімічні дослідження, статистичну обробку даних та їх аналіз).

За матеріалами дисертації опубліковано також 24 тези в журналах та збірниках матеріалів вітчизняних та закордонних з'їздів і конференцій.

## АНОТАЦІЯ

**Тржецинський С.Д.** Вплив екзогенних нейропептидів на ендокринну функцію підшлункової залози та асоційовані метаболічні процеси в нормі і при цукровому діабеті (експериментальне дослідження) – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 14.01.14 – ендокринологія. Державна установа «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України», Харків 2011.

Дисертація присвячена вивченню ефективності застосування синтетичних нейропептидів: холецистокініну-тетрапептиду (ХЦК-4), бомбезину (ББ), нейропептиду Y (НПУ), вазопресину (Ваз), окситоцину (Окс) для збереження і/або відновлення ендокринної функції підшлункової залози за умов експериментального цукрового діабету. У роботі обґрунтована перспективність включення регуляторних нейропептидів до складу мультифакторної антидіабетичної терапії з метою попередження і гальмування прогресуючого погіршення функціональної активності панкреатичних бета-клітин при ЦД 2 типу, а також для досягнення більш стійкої метаболічної компенсації при меншій дозі інсуліну при ЦД 1 типу.

Порівняльний аналіз фармакологічних ефектів антидіабетичної спрямованості показав, що серед досліджуваних нейропептидів найбільш виразні антидіабетичні властивості притаманні Окс при периферійному введенні. За умов гіперглікемії, після субтотальної деструкції острівців стрептозотоцином, Окс переважно стимулює регенерацію бета-клітин у панкреатичних острівцях. Доведено, що сумісне введення Окс з інсуліном гальмує морфологічні і метаболічні прояви абсолютної інсулінової недостатності, що характеризується збільшенням кількості функціонуючих  $\beta$ -клітин і нормалізацією співвідношення інсулін/глюкагон у панкреатичних острівцях, зниженням

глюкотоксичності, підвищенням толерантності до глюкози і чутливості тканин до дії інсуліну, поліпшенням ліпідного обміну і оксидативного статусу у діабетичних тварин. Виявлені фармакологічні ефекти окситоцину є експериментальним обґрунтуванням для його клінічних досліджень як потенційного препарату для збереження ендокринної функції підшлункової залози, а також нормалізації метаболічних процесів, що асоційовані з інсуліновою недостатністю, за умов цукрового діабету.

**Ключові слова:** цукровий діабет, нейропептиди, холецистокініну-тетрапептид, бомбезин, нейропептид Y, вазопресин, окситоцин, панкреатичні островці, метаболічні процеси.

## АНОТАЦІЯ

**Тржецинский С.Д.** Влияние экзогенных нейропептидов на эндокринную функцию поджелудочной железы и ассоциированные метаболические процессы в норме и при сахарном диабете (экспериментальное исследование) - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.01.14 – эндокринология. Государственное учреждение «Институт проблем эндокринной патологии им. В.Я. Данилевского АМН Украины», Харьков, 2011.

Диссертация посвящена изучению эффективности применения синтетических нейропептидов для сохранения и/или восстановления эндокринной функции поджелудочной железы в условиях экспериментального диабета. В работе обоснована перспективность включения регуляторных нейропептидов в состав мультифакторной антидиабетической терапии с целью предупреждения и торможения прогрессирующего ухудшения функциональной активности панкреатических бета-клеток при СД 2 типа, а также для достижения более стойкой метаболической компенсации при меньшей дозе инсулина в случае СД 1 типа.

Выявлено, что эффекты изучаемых нейропептидов на эндокринную функцию поджелудочной железы и ассоциированные метаболические процессы зависят как от исходного уровня инсулиновой обеспеченности организма (нормогликемия или гипергликемия), так и от пути введения нейрогормонов (центральный или периферический).

В результате сравнительного анализа влияния исследуемых регуляторных пептидов в условиях нормогликемии было установлено, что по степени выраженности стимулирующего эффекта на морфо-функциональное состояние бета-клеток панкреатических островков (масса клеток и содержание в них ИИРМ) они располагаются в следующем порядке: окситоцин, бомбезин, нейропептид Y, вазопресин, холецистокинина-тетрапептид, причём, действие повышалось при центральном введении нейропептидов. Максимальное увеличение панкреатических  $\alpha$ -клеток и содержания в них ГИРМ наблюдалось при обоих путях введения ХЦК-4.

Установлено, что исследуемые регуляторные пептидов – холецистокинина-тетрапептид (ХЦК-4), бомбезин (ББ), нейропептид Y (нпY), вазопресин (Ваз), окситоцин (Окс) оказывают разнонаправленное влияние на морфо-функциональное состояние панкреатических островков после их субтотальной деструкции стрептозотоцином: ХЦК-4

способствует снижению количества  $\beta$ -клеток, ББ и Ваз – тормозят процессы деструкции, тогда как при введении НПУ и Окс отмечается стимуляция процессов пролиферации и торможение апоптотической гибели  $\beta$ -клеток в панкреатических островках. Центральное и периферическое введение диабетическим животным ББ, НПУ и Ваз, а также только периферическое применение Окс препятствует прогрессирующему росту количества  $\alpha$ -клеток, площади и содержанию в них ГИРМ. При введении диабетическим животным НПУ и Окс регистрируется выраженное увеличение относительного содержания инсулина в островках, в результате чего нормализуется в них соотношение глюкагон/инсулин.

Доказано, что введение всех изучаемых нейропептидов, кроме ХЦК, приводит к улучшению гликемического контроля у животных с экспериментальным СД, однако, только при введении НПУ и Окс наблюдается достоверное повышение уровня инсулина в крови. Следует отметить, что при периферическом введении Окс также регистрируется значительное уменьшение концентрации глюкокортикоидов в крови. Введение Ваз и Окс приводит к нормализации уровня тиреоидных гормонов в крови, что сопровождается восстановлением индекса Т3/Т4 и свидетельствует об активации процессов дейодирования в периферических тканях.

Выявлено, что введение всех изучаемых нейропептидов, кроме ХЦК, диабетическим животным, способствует снижению липотоксичности. Это подтверждается уменьшением концентрации НЭЖК в сыворотке крови. При центральном введении НПУ и обоих путях введения Ваз и Окс в условиях гипергликемии регистрируется снижение активности процесса СРО, которое реализуется за счет повышения активности ферментативного звена АОЗ.

Сравнительный анализ фармакологических эффектов антидиабетической направленности показал, что среди изучаемых нейропептидов наиболее выраженными противодиабетическими свойствами обладает Окс при периферическом введении.

Установлено, что Окс стимулирует пролиферацию альфа- и бета-клеток в условиях нормогликемии. В условиях гипергликемии, после субтотальной деструкции островков стрептозотоцином, Окс преимущественно стимулирует регенерацию бета-клеток в панкреатических островках.

Доказано, что совместное введение Окс с инсулином тормозит морфологические и метаболические проявления абсолютной инсулиновой недостаточности, что характеризуется увеличением количества функционирующих  $\beta$ -клеток и нормализацией соотношения инсулин/глюкагон в панкреатических островках, снижением глюкотоксичности, повышением толерантности к глюкозе и чувствительности тканей к действию инсулина, улучшением липидного обмена и оксидативного статуса у диабетических животных.

Выявленные фармакологические эффекты окситоцина являются экспериментальным обоснованием для клинических исследований последнего в качестве потенциального препарата для использования в комплексной терапии сахарного диабета с целью сохранения эндокринной функции поджелудочной железы, а так же нормализации метаболических процессов, ассоциированных с инсулиновой недостаточностью.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, нейропептиды, холецистокинина-тетрапептид, бомбезин, нейропептид Y, вазопрессин, окситоцин, панкреатические островки, ассоциированные метаболические процессы.

#### ANNOTATION

**Trzhetsynskiy S.D.** The Influence of exogenous neuropeptides on pancreas' endocrine function and associated metabolic processes in the standard and in diabetes mellitus (experimental research) - Manuscript.

The thesis for obtaining the scientific degree of doctor of biological sciences on the speciality 14.01.14. – Endocrinology. – The Publish establishment “The Institute for endocrine pathology problems named after V.Ya. Danilevskiy AMS Ukraine”, Kharkiv, 2011.

The thesis is dedicated to studying the effectiveness of using synthetic neuropeptides (cholecystokinin-tetrapeptide (CCK-4), bombesin (BB), neuropeptide Y (npY), vasopressin (Vas), oxytocin (Ox) to preserve and restore pancreas endocrine function in experimental diabetes. In this work it has been substantiated the perspectiveness of including regulatory neuropeptides into the multifactor antidiabetic therapy to prevent and to hamper the progressing worsening of the functional activity of pancreatic beta-cells in diabetes mellitus type 2 and to achieve more stable metabolic compensation with smaller insulin dose in the case of diabetes mellitus type 1.

The comparative analysis of pharmacologic effects antidiabetic orientation showed that among the neuropeptides studied Ox has the most apparent antidiabetic properties in peripheral introduction. Ox predominantly stimulates the regeneration of beta-cells in pancreatic islets in hyperglycemia after subtotal destruction of the islets with streptosotocine. It was proved that joint introduction of Ox with insulin inhibits morphologic and metabolic manifestations of the absolute insulin insufficiency which is characterized by the increase of functioning betta-cels amount and normalization of insulin/glucagon ratio in the pancreatic islets glucotoxicity decrease, increase of tolerance to glucose and tissues sensitivity to insulin action, improvement of lipids metabolism and oxidative status in diabetic animals. Pharmacologic effects of oxytocin which were discovered are the experimental substantiation for clinical investigation as a potential medicine for using in the complex therapy of diabetes mellitus with the aim of preserving pancreas endocrine functions al well as normalizing of metabolic processes which are associated with insulin insufficiency.

**Key-words:** diabetes mellitus, neuropeptides, cholecystokinin-tetrapeptide, bombesin, neuropeptide Y, vasopressin, oxytocin, pancreatic islets, associated metabolic processes.

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АОЗ – антиоксидантний захист;  
ББ – бомбезин;  
БрДУ – бромдезоксиуридин;  
Ваз – вазопресин;  
ГІРМ - глюкогони́мунореактивний матеріал;  
ІРМ - інсуліні́мунореактивний матеріал;  
Інс – інсулін;  
іп – інтраперитоніальне введення;  
іцв – інтрацеребровентрикулярне введення;  
НЕЖК - неестерифіковані жирні кислоти;  
НПҮ – нейропептид Y;  
Окс – окситоцин;  
11-ОКС – 11-оксикетостероїди;  
ХЦК-4 - холецистокініну-тетрапептид;  
ЦД – цукровий діабет;  
b-ЛП - b-ліпопротеїди;  
fT3 - вільний трийодтиронін;  
fT4 - вільний тироксин;