

ЦЕРАМИДЫ ПЕЧЕНИ И СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ ПРИ АЛЛОКСАНОВОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Марат Расимович Багаутдинов*

Ижевская государственная медицинская академия,
Республиканская клиническая психиатрическая больница, г. Ижевск

Реферат

Цель. Изучение содержания церамидов в печени и мышечной ткани при аллоксановом сахарном диабете на различных сроках после введения аллоксана.

Методы. Хронические опыты проведены на белых крысах-самцах. Сахарный диабет моделировали путём внутрибрюшинного введения раствора аллоксана гидрохлорида. Контролировали развитие заболевания по клиническим и лабораторным показателям. Церамиды в исследуемых тканях определяли у интактных животных (контроль), на 10-й, 20-й, 30-й, 45-й и 60-й дни после введения аллоксана. Количество церамидов в пластинах определяли методом тонкослойной хроматографии с использованием внешнего стандарта.

Результаты. В группе интактных животных уровень церамидов печени был в 2 раза выше, чем в мышце. На всех сроках после введения аллоксана содержание церамидов было достоверно больше по сравнению с контролем, уровень исследуемого вещества в мышечной ткани был достоверно меньше, чем в ткани печени, в обеих тканях зарегистрирована сходная динамика. До 20-го дня происходил значительный прирост содержания церамидов в сравнении с контролем (8-кратный в печени и 7-кратный в мышце), к 30-му дню зафиксировано частичное восстановление, впоследствии вновь отмечено значительное увеличение уровня церамидов. Это свидетельствует о подолжении механизмов компенсации на ранних сроках эксперимента с декомпенсацией на поздних сроках.

Вывод. При аллоксановой модели сахарного диабета 1-го типа содержание церамидов в инсулинзависимых тканях зависит от срока, прошедшего после введения аллоксана; полученные данные имеют значение для исследования механизмов вторичной инсулинорезистентности, а также иных диабет-ассоциированных патологических состояний.

Ключевые слова: диабет 1-го типа, церамид, инсулинорезистентность.

LIVER AND SKELETAL MUSCLE CERAMIDES IN ALLOXAN-INDUCED DIABETES M.R. Bagautdinov. *Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, Russia. Republican Clinical Hospital for Mental Diseases, Izhevsk, Russia.* **Aim.** To study of liver and skeletal muscle ceramides in alloxan-induced diabetes at different periods after alloxan exposure. **Methods.** Repeated experiments were performed on white male rats. Diabetes was modeled by alloxan hydrochloride solution intraperitoneal injection. The disease development was monitored using clinical and laboratory parameters. Ceramides in tissues were determined in intact animals (control), at the 10, 20, 30, 45 and 60 day after the alloxan injection. Ceramides level in the plates was determined by thin layer chromatography using the external standard. **Results.** In intact animals, ceramides level in liver was twice as high as in muscle. At all terms after alloxan injection, ceramide level was significantly higher compared to controls, and was in muscle compared to liver, with similar change pattern. Up to the 20th day, a significant increase of ceramide level was observed compared to control (eightfold in liver and sevenfold in muscle). By 30th day, a partial recovery was registered, followed by subsequent increase of ceramide level. This indicates the influence of compensation mechanisms in the early stages of the experiment with further decompensation on late stages. **Conclusion.** In alloxan-induced type 1 diabetes, ceramide level in insulin-dependent tissues depends on the term after the alloxan injection; the findings are of great importance for the research of secondary insulin resistance, as well as other diabetes-associated pathological conditions, exact mechanisms.

Keywords: type 1 diabetes mellitus, ceramides, insulin resistance.

В последние годы в литературе широко обсуждают вопрос о роли определённых классов липидов в механизмах развития инсулинорезистентности. Церамиды — метаболиты сфингомиелина, являющиеся вторичными мессенджерами многих патологических процессов. Известно, что ряд патологических состояний, в частности стеатогепатит, метаболический синдром, хроническое воспаление, сахарный диабет 2-го типа, алиментарное ожирение, сопровождаются повышением содержания церамидов в тканях. Согласно данным ряда авторов [4, 8–10], накопление церамидов в клетках сопровождается развитием пострецепторной инсулинорезистентности — одного из ключевых звеньев патогенеза сахарного диабета 2-го типа. Инсулинорезистентность пре-

имущественно развивается в мышечной ткани и печени, при этом выделяют два основных её механизма — за счёт вытеснения избытка жиров из жировой ткани с последующим их метаболизмом и образованием специфических липидных метаболитов, а также за счёт выделения при ожирении адипоцитокинов. Церамиды являются промежуточными посредниками обоих этих процессов [10]. Кроме того, сами церамиды играют ключевую роль в развитии инсулинорезистентности, доказана их роль в ингибировании фосфорилирования при инсулиновом сигналинге за счёт блокирования протеинкиназы Б [8]. Показано, что при стрептозотоциновом сахарном диабете (модель сахарного диабета 1-го типа) также происходит повышение активности сфингомиелинового сигнального пути, эффекторами которого служат церамиды [7]. В работе проведено исследование содержания церамидов

Таблица 1

Содержание церамидов в печени и мышце при аллоксановом сахарном диабете (мг/г)

Срок диабета	Печень	Мышца
Контроль (M±m)	1,66±0,09 (n=10)	0,88±0,08 (n=10)
10 дней (M±m)	13,4±1,3 (n=9)***	4,3±0,4 (n=9)***
20 дней (M±m)	13,1±1,6 (n=10)***	6,0±0,9 (n=10)***
30 дней (M±m)	7,2±1,5 (n=9)**	4,1±0,3 (n=9)**
45 дней (M±m)	13,1±3 (n=10)**	4,5±0,7 (n=10)***
60 дней (M±m)	9,2±0,7 (n=9)**	4,4±0,2 (n=9)**

Примечание. Контроль — интактные животные; 10, 20, 30, 45, 60 дней — соответствующие сроки после введения аллоксана; M — среднее арифметическое; m — средняя ошибка среднего арифметического; n — число животных в группе. Статистически значимые различия: с контролем — *p < 0,05, **p < 0,01; между печенью и мышцей — #p < 0,05, ##p < 0,01.

в инсулинзависимых тканях (печени, мышце) при аллоксановом сахарном диабете на разных сроках после введения аллоксана.

Хронические опыты проведены на 114 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах с массой тела 180–220 г. Сахарный диабет моделировали путём однократного внутрибрюшинного введения 5% раствора аллоксана гидрохлорида в дозе 100 мг/кг [2]. Контролировали развитие заболевания по клиническим (полиурия, жажда, потеря массы тела) и лабораторным (содержание глюкозы, гликозилированного гемоглобина в крови¹) показателям.

Церамиды в исследуемых тканях определяли у животных на 10-й, 20-й, 30-й, 45-й и 60-й дни после введения аллоксана, забой животных осуществляли путём кровопускания из сонной артерии под общей анестезией. Брали навески тканей печени (правой доли), мышцы (из передней группы мышц голени). Экстракцию суммарных липидов проводили по методу Фолча [6]. Из общей фракции липидов церамиды выделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках (Sorbfil, Краснодар), окрашивали 5% раствором фосфорномолибденовой кислоты в 95% этаноле [3]. Количество церамидов в пластинках определяли с использованием внешнего стандарта (Ceramide from bovine brain, Sigma) посредством компьютерной обработки (Sorbfil TLC Videodensitometer). Статистическая обработка результатов проведена методом вариационной статистики при помощи стандартных программ (Microsoft Office Excel 2003). Достоверность различий между средними величинами оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при p < 0,05.

В контрольной группе содержание церамидов было в 2 раза больше в ткани печени. На всех

сроках после введения аллоксана содержание исследуемого вещества было достоверно больше по сравнению с контролем (табл. 1). Кроме того, на всех сроках исследования содержание церамидов в мышечной ткани было достоверно меньше, чем в ткани печени.

В ткани печени к 10-му и 20-му дням эксперимента зарегистрировано значительное увеличение содержания церамидов (в 8 раз), на 30-й день отмечено частичное восстановление уровня исследуемого вещества, к 45-му дню содержание церамидов печени вновь увеличивалось до уровня 20-го дня, к окончанию эксперимента (60-й день) повышение концентрации церамидов печени было менее выражено. В мышце наблюдалась подобная динамика. До 20-го дня выявлялось повышение содержания церамидов (к 20-му дню — в 7 раз по сравнению с контролем), к 30-му дню эксперимента отмечено частичное восстановление содержания церамидов, их уровень значительно увеличивался к 40-му дню и к окончанию исследования оставался относительно стабильным. Частичное восстановление уровня церамидов в инсулинзависимых тканях к 30-му дню после введения аллоксана, вероятно, связано с подключением механизмов компенсации. Дальнейшее повышение количества церамидов к 40-му дню эксперимента свидетельствует о возможной декомпенсации патологических процессов.

По данным других исследований [7], стрептозотоциновый сахарный диабет приводит к повышению уровня церамидов в мышечной ткани на 75%. Наши исследования показали, что повышение содержания церамидов происходит не только при стрептозотоциновом диабете, но и в других экспериментальных моделях сахарного диабета I-го типа, в частности при аллоксановом сахарном диабете, при этом введение аллоксана вызывает более значительное изменение уровня церамидов, нежели введение стрептозотоцина. Согласно нашим данным, повышение концентрации церамидов при аллоксановом сахарном диабете наблюдается не только в мышечной ткани, но и в печени, при этом обнаружена сходная динамика изменений содержания церамидов в обеих инсулинзависимых тканях. Существует зависимость содержания церамидов в исследуемых тканях от срока экспериментального сахарного диабета.

После введения аллоксана, как и при введении стрептозотоцина, развивается сахарный диабет I-го типа за счёт гибели β-клеток островков Лангерганса поджелудочной железы [1]. Известно, что данный тип сахарного диабета приводит к развитию вторичной инсулинорезистентности [12], которая в свою очередь сопровождается увеличением содержания церамидов в тканях [9]. Результаты нашего исследования свидетельству-

¹Исследование содержания глюкозы и гликозилированного гемоглобина проведено С.В. Протасовой на кафедре биохимии Ижевской государственной медицинской академии.

ют о повышении уровня церамидов в печени и мышце при аллоксановом сахарном диабете, что позволяет предположить участие церамидов в развитии вторичной инсулинорезистентности при сахарном диабете 1-го типа.

К настоящему времени проведено экспериментальное обоснование применения веществ, ингибирующих синтез церамидов, в качестве фармакологического средства для лечения сахарного диабета 2-го типа [5]. Их введение приводит к снижению массы тела и улучшению усвоения глюкозы периферическими тканями [13]. Учитывая зависимость уровня церамидов от длительности сахарного диабета в эксперименте, можно предположить различную эффективность данных препаратов при лечении диабета на разных сроках заболевания.

Церамиды, синтезируемые в печени, способны проникать в мозг, проходя гематоэнцефалический барьер, где проявляется их нейротоксичность за счёт влияния на энергетический обмен, что приводит к нейродегенерации [11].

ВЫВОДЫ

1. Повышение содержания церамидов в инсулинзависимых тканях (печени, скелетной мышце) происходит не только при стрептозотоциновой модели сахарного диабета 1-го типа, но и при аллоксановом сахарном диабете. При этом после введения аллоксана возникают большие изменения уровня церамидов, чем при стрептозотоциновом диабете.

2. Динамика изменения содержания церамидов одностипна в печени и скелетной мышце, при этом уровень исследуемого вещества достоверно выше в печени.

3. Содержание церамидов зависит от срока, прошедшего после введения аллоксана, максимальный прирост в печени и мышце возникает на 20-й день, к 30-му дню наблюдается состояние относительной компенсации с дальнейшей декомпенсацией к 40-му дню.

4. Полученные данные имеют значение для исследования механизмов вторичной инсулинорезистентности при сахарном диабете 1-го типа, механизмов иных диабет-ассоциированных патологических состояний (в частности, ней-

родегенерации), а также для прогнозирования эффективности ингибиторов синтеза церамидов, изучаемых в качестве средств для лечения сахарного диабета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алеева Г.Н., Киясов А.П., Миннебаев М.М. Динамика β - и α -клеточных популяций поджелудочной железы и содержания глюкозы в крови крыс при аллоксановом диабете // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2002. — №2. — С. 151–153.
2. Бочаров Е.Ф., Шестенко О.П. Экспериментальные модели сахарного диабета // Вопр. вирусол. — 1986. — Т. 31, №4. — С. 393–400.
3. Хиггинс Д.А. Разделение и анализ липидных компонентов мембран. Биологические мембраны: методы / Под ред. Дж.Б. Финдлей. — М.: Медицина, 1990. — С. 151–195.
4. Adams J.M., Pratipanawatr T., Berria R. et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans // Diabetes. — 2004. — Vol. 53. — P. 25–31.
5. Aerts J.M., Ottenhoff R., Powlson A.S. et al. Pharmacological inhibition of glucosylceramide synthase enhances insulin sensitivity // Diabetes. — 2007. — Vol. 56, N 5. — P. 1341–1349.
6. Folch J., Less M., Sloan-Stanley G.N. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissues // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, N 2. — P. 497–499.
7. Gorska M., Dobrzyn A., Zendzian-Piotrowska M., Gorski J. Effect of streptozotocin-diabetes on the functioning of the sphingomyelin signaling pathway in skeletal muscle of the rat // Horm. Metab. Res. — 2004. — Vol. 36. — P. 14–21.
8. Langeveld M., Aerts J.M. Glycosphingolipids and insulin resistance // Prog. Lipid. Res. — 2009. — Vol. 48, N 3–4. — P. 196–205.
9. Straczkowski M., Kowalska I., Nikolajik A. et al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle // Diabetes. — 2004. — Vol. 53. — P. 1215–1221.
10. Summers S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity // Prog. Lipid. Res. — 2006. — Vol. 45, N 1. — P. 42–72.
11. Tong M., de la Monte S.M. Mechanisms of ceramide-mediated neurodegeneration // J. Alzheimers. Dis. — 2009. — Vol. 16, N 4. — P. 705–714.
12. Uruska A., Araszkievicz A. Insulin resistance in patients with type 1 diabetes // Pediatr. Endocrinol. Diabetes Metab. — 2009. — Vol. 15, N 2. — P. 19–23.
13. Yang G., Badeanlou L., Bielawski J. et al. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism and the metabolic syndrome // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. — 2009. — Vol. 12. — P. 211–224.