

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ДИАБЕТА, ВЫЗВАННОГО ОБРАБОТКОЙ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ 1.5-МЕСЯЧНЫХ КРЫС, НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНОЙ СИСТЕМЫ

© А. О. Шпаков, К. В. Деркач, О. В. Чистякова, И. В. Мойсеюк, В. М. Бондарева

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург; электронный адрес: alex_shpakov@list.ru*

Изменения, возникающие в условиях сахарного диабета (СД) 1-го типа в аденилатцикласной сигнальной системе (АЦСС), являются одними из ключевых причин осложнений этого заболевания. Поскольку СД 1-го типа наиболее часто диагностируется в детском и подростковом возрасте, актуальной задачей является изучение изменений в АЦСС при раннем развитии заболевания. Для этого нами разработана пролонгированная модель СД 1-го типа, которую вызывали обработкой 1.5-месячных крысят (1.5М) средними дозами стрептозотоцина (модель 1.5М-СД), и исследовано функциональное состояние АЦСС в мозге, миокарде и семенниках животных с этой моделью заболевания через 7 мес после ее инициации. Модель 1.5М-СД сравнивали с моделью СД 1-го типа продолжительностью 7 мес, которую вызывали обработкой стрептозотоцином взрослых, 5-месячных (5М), животных (модель 5М-СД). Показано, что в условиях 1.5М-СД в тканях диабетических крыс в значительной степени меняется функциональная активность АЦСС, чувствительной к биогенным аминам и полипептидным гормонам. В наибольшей степени у крыс с 1.5М-СД ослаблялось ингибирующее аденилатциклазу (АЦ) действие соматостатина (во всех изученных тканях), норадреналина (в миокарде и мозге), агонистов серотониновых рецепторов 1-го типа (в мозге). В мозге также снижалось стимулирующее АЦ действие релаксина, изопротеренола и агонистов серотониновых рецепторов, сопряженных с G_s -белками, в миокарде — соответствующие эффекты ГИДФ, релаксина и β -адренергических агонистов, в семенниках — эффекты ГИДФ и хорионического гонадотропина. При сравнении моделей 1.5М-СД и 5М-СД наиболее выраженные различия выявлены во влиянии СД на регуляцию гормонами АЦСС в мозге, причем это относится как к стимулирующему действию дофамина и PACAP-38, так и к ингибирующим эффектам бромокриптина и соматостатина. Полученные данные указывают на значительные нарушения в гормональной регуляции нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной системах у крыс с ранней индукцией СД 1-го типа, которые в ряде случаев более выражены в сравнении с поздней моделью 5М-СД. Эти нарушения могут лежать в основе развития диабетической кардиомиопатии, когнитивного дефицита, гипогонадотропных состояний, которые часто выявляются у детей и подростков с СД 1-го типа.

Ключевые слова: аденилатциклаза, адренергический рецептор, гонадотропин, мозг, миокард, сахарный диабет, семенники, серотонин, соматостатин.

Принятые сокращения: AP — адренергический рецептор, АЦ — аденилатциклаза, АЦСС — аденилатцикласная сигнальная система, G_s и G_i — G-белки стимулирующего и ингибирующего типов соответственно, 8-OH-DPAT — 8-гидрокси-2-дипропиламинотетралин, ГИДФ — гуанилилимидофосфат, ДАР — дофаминовый рецептор, ЛГ — лютеинизирующий гормон, 5-МДМТ — 5-метокси-*N,N*-диметилтриптамин, СД — сахарный диабет, SomP — соматостатиновые рецепторы, ХГЧ — хорионический гонадотропин человека, EMD-386088 — 5-хлор-2-метил-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1*H*-индол, PACAP-38 — pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide-38.

Возникающие на ранних стадиях сахарного диабета (СД) 1-го типа метаболические нарушения и окислительный стресс являются важнейшими факторами, которые приводят к осложнениям этого заболевания со стороны нервной, сердечно-сосудистой, выделительной, репродуктивной и других систем организма (Stiles, Seaquist, 2010; Tabit et al., 2010). В основе развития осложнений СД 1-го типа лежат нарушения в гормональных сигнальных системах, регулирующих фундаментальные клеточные процессы (Shpakov, 2012). Наибольший интерес в этом отношении представляет аденилатцикласная сигнальная система (АЦСС), которая включает в себя три

основных компонента — гормональный рецептор, гетеротримерный G-белок стимулирующего (G_s) или ингибирующего (G_i) типа и фермент аденилатциклазу (АЦ) — и является мишенью для широкого спектра гормонов и гормоноподобных веществ. С помощью АЦСС контролируются практически все физиологические и биохимические процессы, что указывает на центральную роль этой системы во внутриклеточной сигнализации.

Ранее нами было показано, что в условиях экспериментального СД 1-го типа в нервной и периферических тканях крыс меняются функциональная активность АЦСС и ее чувствительность к гормонам (Шпаков и др.,

2005а, 2005б, 2009, 2010, 2012; Shpakov et al., 2006, 2013а). В условиях острого СД 1-го типа, вызванного высокими дозами стрептозотоцина (60—70 мг/кг), эти изменения выявляются на ранних стадиях заболевания (в конце первой недели) и в дальнейшем быстро нарастают. Причинами такого развития событий являются сильно выраженная гипергликемия, кетоацидоз и нарушение окислительно-восстановительного баланса в органах и тканях диабетического организма (Szkudelski, 2012). Вследствие быстрого нарастания дисфункций в АЦСС у животных с острой моделью СД 1-го типа, а также вследствие их высокой смертности при отсутствии адекватной инсулиновой терапии (большая часть животных погибает через 2 мес после обработки стрептозотоцином) эту модель не представляется возможным использовать для изучения осложнений СД 1-го типа, которые обычно развиваются через 2—3 мес после индукции заболевания. Для решения этой проблемы нами предложена пролонгированная, 7-месячная, модель СД 1-го типа, вызываемая последовательной обработкой крыс средними дозами стрептозотоцина (30—40 мг/кг) (Shpakov et al., 2013а). В этом случае патогенетическая картина экспериментального СД 1-го типа в большей степени приближена к СД 1-го типа человека в сравнении с острой моделью заболевания. Причина этого состоит в частичной регенерации β -клеток поджелудочной железы, что приводит не к абсолютной, а к относительной инсулиновой недостаточности, а также в том, что уровень глюкозы меняется в пределах от 12 до 25 мМ, в то время как у крыс с острой моделью СД 1-го типа он, как правило, превышает 25 мМ — критический порог, при превышении которого глюкоза начинает оказывать на клетки и ткани сильное токсическое воздействие (Hashim et al., 2002, 2004; Шпак и др., 2007а).

Ранее нами изучена АЦСС у крыс с пролонгированной моделью СД 1-го типа, которую инициировали обработкой стрептозотоцином взрослых, 5-месячных крыс (Shpakov et al., 2013а). Однако значительная часть пациентов с СД 1-го типа — это дети и подростки, у которых заболевание манифестируется в препубертатном и раннем пубертатном периодах. Имеются многочисленные данные о том, что патогенез СД 1-го типа, его последствия и прогноз у них существенно отличаются от таковых у взрослых пациентов (Levy-Shraga et al., 2012; Tavares et al., 2012). Вследствие этого необходимо изучение функционального состояния гормональных сигнальных систем при ранней индукции пролонгированных моделей СД 1-го типа. Можно предположить, что в этом случае изменения в гормональных сигнальных системах у молодых крыс будут одним из адаптационных механизмов, снижающих негативное влияние метаболических нарушений, вызываемых СД 1-го типа, на функциональное состояние растущего организма.

Цель исследования состояла в изучении влияния разработанной нами пролонгированной, 7-месячной, модели СД 1-го типа, вызываемой инъекциями средних доз стрептозотоцина 1.5-месячным (1.5М) крысам (модель 1.5М-СД), на функциональное состояние АЦСС в мозге, миокарде и семенниках животных в сравнении с крысами, которых обрабатывали стрептозотоцином аналогичным образом, но в возрасте 5 мес (модель 5М-СД). Выбор тканей был обусловлен тем, что при СД 1-го типа у детей и подростков наблюдаются значительные нарушения функций нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем. Изучали гормоны различной природы, явля-

ющиеся регуляторами АЦСС в этих тканях и действующие на АЦ как стимулирующим (через G_s -белки), так и ингибирующим (через G_i -белки) способом.

Материал и методика

Пролонгированный СД 1-го типа вызывали тремя инъекциями стрептозотоцина в дозе 30 мг на 1 кг массы на 1-е, 10-е и 75-е сут эксперимента самцам крыс линии Wistar. При проведении первой инъекции возраст животных составил 1.5 мес (1.5М-СД). Для сравнения изучали пролонгированную модель СД 1-го типа, которую вызывали сходным образом, но при инъекции первой дозы стрептозотоцина 5-месячным крысам (5М-СД). Стрептозотоцин (Sigma, США) растворяли в подкисленном 0.9%-ном растворе NaCl (рН 4.5). Контрольные животные получали подкисленный физиологический раствор. Измерение уровня глюкозы проводили в цельной крови, полученной из хвостовой вены, с помощью тест-полосок One Touch Ultra (США) и глюкометра фирмы Life Scan Johnson & Johnson (Дания). Концентрацию инсулина в сыворотке крови измеряли с помощью набора Rat Insulin ELISA (Mercodia AB, Швеция).

Изучали следующие 4 группы животных: 1) диабетические крысы, которых начали обрабатывать стрептозотоцином в возрасте 1.5 мес (группа 1.5М-Д, $n = 7$, масса тела 304 ± 17 г, концентрация глюкозы 14.9 ± 2.6 мМ, концентрация инсулина 0.95 ± 0.30 нг/мл); 2) соответствующий им по возрасту контроль, которому в 1.5-месячном возрасте начали вводить физиологический раствор (группа 1.5М-К, $n = 5$, масса тела 373 ± 7 г, концентрация глюкозы 5.2 ± 0.1 мМ, концентрация инсулина 2.15 ± 0.42 нг/мл); 3) диабетические крысы, которых начали обрабатывать стрептозотоцином в возрасте 5 мес (группа 5М-Д с теми же показателями, равными $9, 349 \pm 14$ г, 21.2 ± 1.0 мМ, 1.17 ± 0.25 нг/мл); 4) соответствующий им по возрасту контроль (группа 5М-К с показателями $12, 400 \pm 8$ г, 4.1 ± 0.3 мМ, 1.89 ± 0.38 нг/мл). Таким образом, у диабетических животных через 7 мес после индукции СД 1-го типа отмечали отчетливо выраженную гипергликемию и относительную инсулиновую недостаточность.

Для проведения биохимических исследований использовали серотонин, 5-метокси-*N,N*-диметилтриптамин (5-МДМТ), 8-гидрокси-2-дипропиламинотетралин (8-ОН-ДРАТ), дофамин, бромокриптин, изопротеренол, норадреналин, хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), соматостатин, питуитарный АЦ-активирующий полипептид-38 (РАСАР-38), форсколин и гуанилилимидодифосфат (ГИДФ), полученные из фирмы Sigma-Aldrich (США), 5-нонилокситриптамин и 5-хлор-2-метил-3-(1,2,3,6-тетрагидро-4-пиридинил)-1 H -индол (EMD-386088), полученные из фирмы Tocris Cookson Ltd. (Великобритания). Релаксин-2 был любезно предоставлен проф. John Wade (Университет Мельбурна, Австралия). Меченный [α - 32 P] АТФ (150 ГБк/ммоль) был получен из ОАО «Реакторные материалы» (Изотоп, Россия).

Выделение фракций синаптосомальных мембран проводили, как описано ранее (Shpakov et al., 2010). Кору больших полушарий, стриатум и гиппокамп гомогенизировали при помощи Политрона в охлажденном до 4 °С 50 мМ Tris-HCl-буфере (рН 7.4), содержащем 5 мМ MgCl₂, 320 мМ сахарозы и коктейль ингибиторов протеаз (500 мкМ *O*-фенантролина, 2 мкМ пепстатина и 1 мМ фе-

нилметилсульфонилфторида) (буфер А). Полученный гомогенат центрифугировали (1000 g, 10 мин), осадок отбрасывали, супернатант снова центрифугировали (9000 g, 20 мин). Осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали при 35 000 g в течение 10 мин. Фракцию плазматических мембран из сердечной мышцы выделяли, как описано ранее (Shprakov et al., 2013b). Желудочки отделяли от предсердий, жира и сердечных клапанов, промывали охлажденным физиологическим раствором, измельчали и гомогенизировали с помощью Политрона в 20 объемах охлажденного до 4 °С буфера А. Гомогенат подвергали центрифугированию при 480 g в течение 10 мин, осадок отбрасывали, супернатант центрифугировали при 27 500 g в течение 20 мин, полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и повторно центрифугировали при 27 500 g в течение 20 мин. Для выделения тестикулярных мембран измельчали ткани семенников крыс, гомогенизировали их на холоде в буфере А, гомогенат центрифугировали (1500 g, 10 мин), осадок отбрасывали и супернатант повторно центрифугировали (20 000 g, 30 мин). Полученный осадок ресуспендировали в буфере А без сахарозы и центрифугировали в том же режиме.

Активность АЦ (ЕС 4.6.1.1) определяли, как описано ранее (Shprakov et al., 2012a). Реакционная смесь (общий объем 50 мкл) содержала 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 5 мМ MgCl₂, 0.1 мМ цАМФ, 1 мМ АТФ, 1 мкКи [α -³²P]-АТФ, 20 мМ креатинфосфата, 0.2 мг/мл креатинфосфокиназы и 25–70 мкг мембранного белка. Реакцию проводили в течение 12 мин при 37 °С, начинали добавлением фракции мембран и останавливали добавлением 100 мкл 0.5 М HCl. Пробы кипятили в течение 6 мин для разрушения комплексов между меченым цАМФ и белками, затем нейтрализовали кислоту с помощью 100 мкл 1.5 М имидазола. Образовавшийся [³²P]-цАМФ отделяли на колонках с оксидом алюминия, используя в качестве элюента 12 мл 10 мМ имидазол-HCl-буфера (pH 7.4). Элюат собирали в сцинтилляционные флаконы и считали радиоактивность на сцинтилляционном счетчике LS 6500 (Beckman Instruments Inc., США). Каждое измерение сделано в 3 независимых экспериментах в 3 параллельных пробах. Результаты представлены в пмоль цАМФ за 1 мин на 1 мг мембранного белка. Базальная активность АЦ была измерена в отсутствие гормональных и негормональных агентов, ингибирующий эффект гормонов изучали по их влиянию на активность АЦ, стимулированную форсколином (10⁻⁵ М).

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием компьютерной программы ANOVA. Данные представлены в виде $M \pm SEM$ нескольких независимых экспериментов. Различия между значениями активности АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из тканей различных групп животных, оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента как достоверные при $P < 0.05$.

Результаты

Базальная активность АЦ в мозге крыс с 1.5М-СД и 5М-СД существенно не отличалась от таковой у контрольных животных того же возраста, в то время как в миокарде и семенниках она была ниже (см. таблицу). Снижение базальной активности фермента в миокарде и семенниках крыс с 1.5М-СД было выражено в меньшей степени, чем у крыс с 5М-СД. Далее исследовали влияние

Базальная активность АЦ во фракциях плазматических мембран, выделенных из мозга, миокарда и семенников крыс с пролонгированными моделями СД 1-го типа и контрольных животных (К) того же возраста

Группа крыс	Мозг	Миокард	Семенники
1.5М-К	29.3 ± 1.2	32.4 ± 0.8	22.5 ± 0.7
1.5М-СД	28.6 ± 1.1	27.5 ± 1.1 ^a	15.6 ± 1.0 ^a
5М-К	26.8 ± 0.5	30.4 ± 0.3	20.0 ± 0.2
5М-СД	25.1 ± 0.2 ^a	23.9 ± 0.5 ^a	11.1 ± 0.3 ^a

^a Различия между группами 1.5М-К и 1.5М-Д и между группами 5М-К и 5М-Д статистически достоверны при $P < 0.05$. 1.5М и 5М — 1.5- и 5-месячные крысы соответственно.

на АЦ негормональных агентов — ГИДФ, негидролизуемого аналога ГТФ, мишенью которого являются G_s-белки, и дитерпена форсколина, который взаимодействует с каталитическим сайтом фермента. В мозге крыс с 1.5М-СД заметных различий в стимулирующих АЦ эффектах ГИДФ и форсколина отмечено не было. В миокарде крыс с 1.5М-СД наблюдали снижение действия ГИДФ на АЦ, в то время как эффект форсколина менялся слабо (рис. 1). В миокарде крыс с 5М-СД в отличие от 1.5М-СД наблюдали значительное снижение действия форсколина на АЦ. Стимуляция АЦ при действии ГИДФ в этом случае снижалась в меньшей степени. В семенниках крыс с 1.5М-СД было отчетливо снижено действие на АЦ ГИДФ и форсколина, причем снижение было сходным по величине с таковым в случае 5М-СД. Полученные данные указывают на то, что ранняя индукция СД 1-го типа существенно не влияет на базальную и стимулированную негормональными агентами активность АЦ в мозге, вызывает значительное снижение активности фермента, стимулированного ГИДФ, в миокарде и семенниках и приводит к ослаблению действия форсколина на АЦ в семенниках диабетических крыс. Необходимо отметить, что в мозге и семенниках существенных различий в базальной активности фермента и ее стимуляции ГИДФ и форсколином у крыс с 1.5М-СД и 5М-СД выявлено не было, в то время как в миокарде характер изменений активности АЦ при действии ГИДФ и форсколина различался.

Изучение регуляторного влияния гормонов на активность АЦ показало, что в мозге крыс с 1.5М-СД оно сильно изменено по сравнению с контролем. Снижались стимулирующие эффекты серотонина и агонистов серотониновых рецепторов 6-го (5-НТ₆-Р) и 7-го (5-НТ₇-Р) типов. Так, стимуляция АЦ серотонином в сравнении с контролем снижалась на 32 %, соответствующие эффекты 5-НТ₆-Р-агониста EMD-386088 и 5-НТ_{1/7}-Р-агониста 8-ОН-ДРАТ — на 33 и 28 % соответственно (рис. 2). Стимуляция АЦ изопротеренолом и релаксином снижались на 29 и 42 %. АЦ активность при действии РАСАР-38 практически не менялась. В незначительной степени повышался стимулирующий эффект дофамина, реализуемый через дофаминовые рецепторы (ДАР) 1-го типа. В мозге крыс с 5М-СД АЦ эффекты серотонина и EMD-386088 снижались в меньшей степени, чем при 1.5М-СД, — на 17 и 24 %, в то время как эффект 8-ОН-ДРАТ сохранялся (рис. 2). Стимулирующие эффекты изопротеренола и релаксина были снижены в той же степени, что и при 1.5М-СД, — на 34 и 39 %. В мозге крыс с поздней индукцией СД 1-го типа стимулирующее

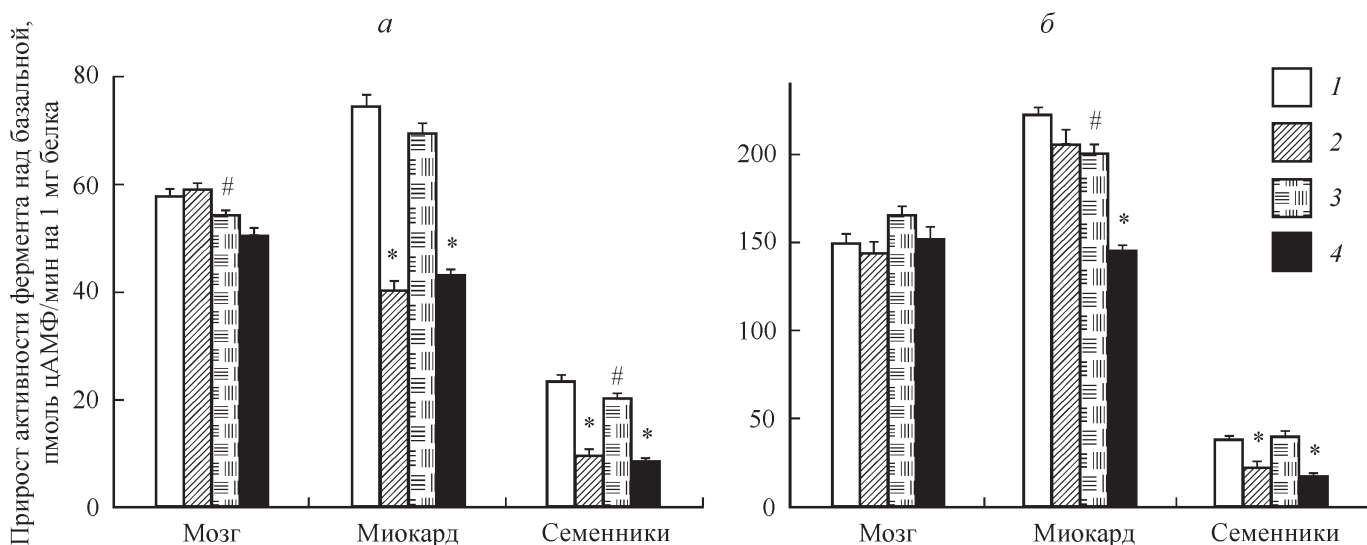


Рис. 1. Влияние ГИДФ (а) и форсколина (б) на аденилатциклазу (АЦ) в мозге, миокарде и семенниках контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

Здесь и на всех рисунках столбцы: 1 и 3 — соответственно 1.5-месячные (1.5М-К) и 5-месячные (5М-К) контрольные крысы; столбцы 2 и 4 — соответственно 1.5-месячные (1.5М-Д) и 5-месячные (5М-Д) диабетические крысы. ГИДФ и форсколин добавляли в концентрации 10^{-5} М; достоверность различия (при $P < 0.05$) показана звездочкой между группами 1.5М-К и 1.5М-Д и между группами 5М-К и 5М-Д, знаком # — между группами 1.5М-К и 5М-К и между группами 1.5М-Д и 5М-Д.

действие дофамина имело тенденцию к снижению (но данные недостоверны), в то время как при 1.5М-СД оно, напротив, повышалось. Влияние PACAP-38 на активность АЦ при поздней индукции заболевания снижалось и составляло всего 65 % от такового в контрольной группе (рис. 2).

Ингибирующее действие на АЦ гормонов в мозге крыс с 1.5М-СД менялось в большей степени по сравнению со стимулирующим. Так, ингибирующее действие

серотонина, 5-HT_{1B/1D}-Р-агониста 5-нонилокситриптамина и 5-HT_{1/2}-Р-агониста 5-МДМТ на стимулированную форсколином активность АЦ составило 33, 26 и 24 % соответственно от таковых в контроле (рис. 3). В значительной степени снижались ингибирующие эффекты соматостатина и норадреналина, которые составили 41 и 57 % соответственно от таковых у контрольных животных. При этом сохранялось ингибирующее АЦ действие бромкриптина, опосредованное сопряженным с G_i-белками

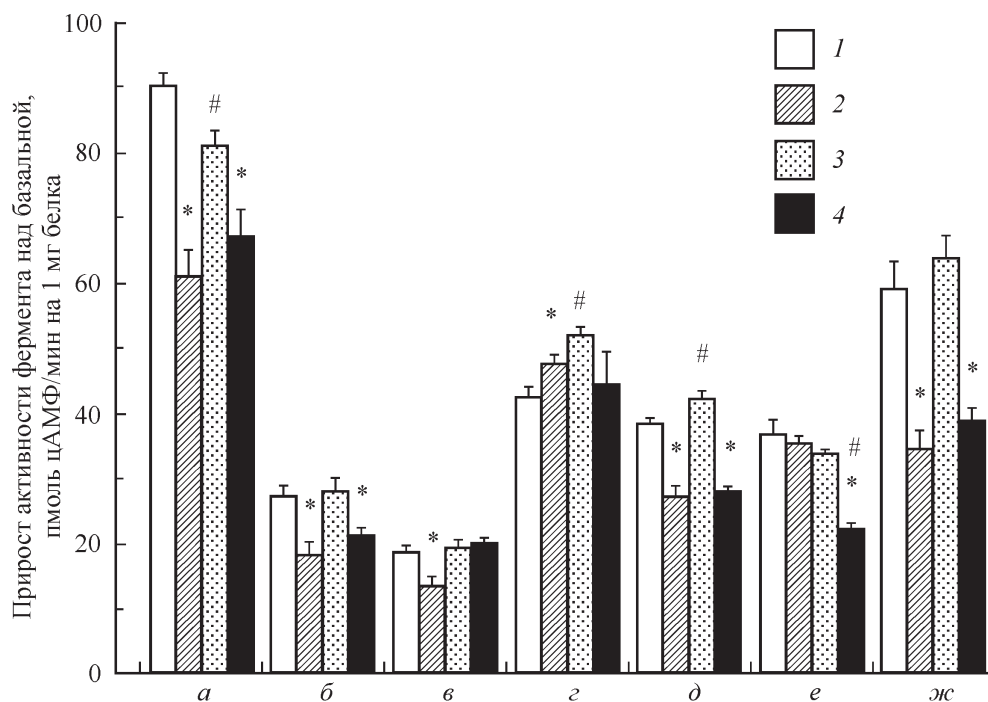


Рис. 2. Стимулирующее действие гормонов на АЦ в мозге контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

а — серотонин, 10^{-5} М; б — EMD-386088, 10^{-5} М; в — 8-ОН-DPAT, 10^{-5} М; г — дофамин, 10^{-5} М; д — изопроterenол, 10^{-5} М; е — PACAP-38, 10^{-6} М; ж — релаксин, 10^{-8} М.

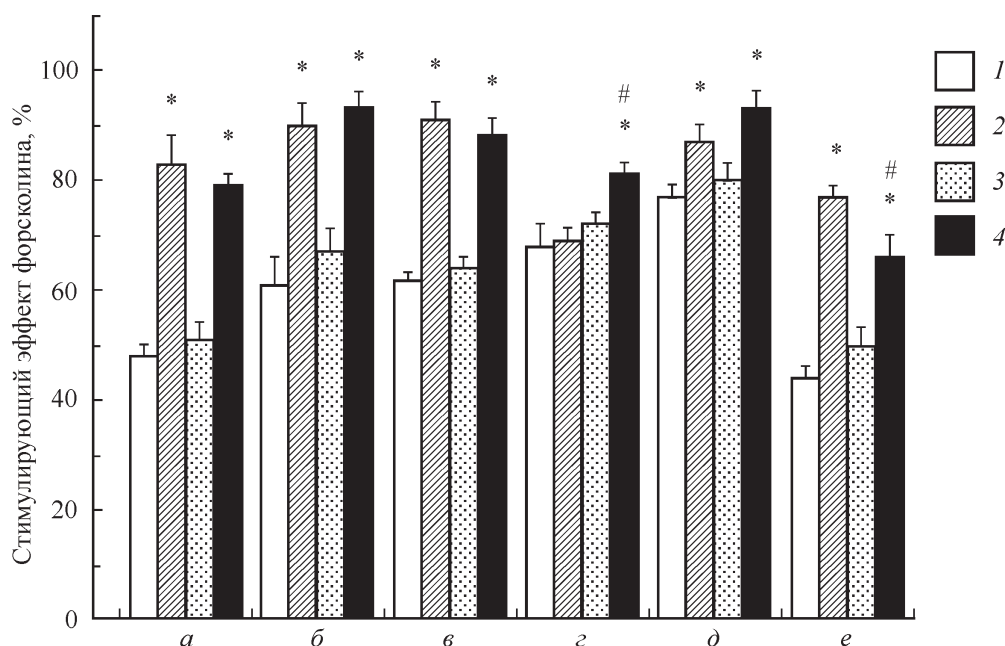


Рис. 3. Влияние гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в мозге контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

а — серотонин, б — 5-нонилкситриптамин, в — 5-МДМТ, г — бромокриптин, д — норадреналин (все — 10^{-5} М), е — соматостатин, 10^{-6} М. Стимулирующий эффект форсколина (10^{-5} М) в отсутствие гормонов принят за 100 %.

ДАР 2-го типа. В мозге крыс с 5М-СД ингибирующий эффект соматостатина был снижен в меньшей степени и составил 68 % от такового в контроле. Значения ингибирования АЦ агонистами 5-НТ-рецептора у крыс с обеими моделями СД были близкими. Ингибирующий эффект бромокриптина при 5М-СД снижался, в то время как в условиях 1.5М-СД он не менялся (рис. 3). Эти данные указывают на то, что спектр изменений стимулирующих и ингибирующих влияний гормонов на АЦ в мозге крыс с 1.5М-СД отличается от такового при 5М-СД.

При исследовании действия гормонов на АЦ в миокарде крыс с 1.5М-СД было обнаружено значительное снижение в сравнении с контролем стимулирующего эффекта релаксина (на 44 %). При 5М-СД ослабление эффекта релаксина было выражено в меньшей степени (снижение на 23 %). Стимулирующие эффекты лигандов адренергических рецепторов (АР) — β -агониста изопротеренола и α/β -агониста норадреналина — в миокарде крыс с обеими моделями СД ослаблялись в одинаковой степени. Стимуляция АЦ действием РАСАР-38 либо несколько повышалась (1.5М-СД), либо сохранялась (5М-СД) (рис. 4). Ингибирование АЦ норадреналином и соматостатином в миокарде крыс с 1.5М-СД значительно снижалось и составляло 44 и 30 % от таковых в контроле, и эти значения были близки к таковым у крыс с 5М-СД — 48 и 25 % соответственно (рис. 5). Таким образом, изменения функциональной активности АЦСС в миокарде крыс с 1.5М-СД и 5М-СД были сходными, за исключением более выраженного снижения активности АЦ релаксином при ранней индукции заболевания.

При изучении АЦСС в семенниках крыс с 1.5М-СД было показано, что стимулирующие эффекты ХГЧ, который действует на тестикулярные клетки через рецепторы лютеинизирующего гормона (ЛГ), и РАСАР-38 снижались на 69 и 18 % соответственно (рис. 6). У крыс с 5М-СД стимулирующие эффекты этих гормонов снижались на 62 и 45 % соответственно. Стимулирующий эффект

изопротеренола в семенниках крыс с обеими моделями СД 1-го типа практически не отличался от такового в контроле. Наибольшие изменения были характерны для ингибирующего действия соматостатина, которое в семенниках крыс как с ранней так и с поздней индукцией СД в значительной степени подавлялся (рис. 5). Таким образом, в семенниках крыс с 1.5М-СД и 5М-СД наблюдали сходные изменения чувствительности АЦСС к гормонам, за исключением более выраженного снижения активности АЦ при действии РАСАР-38 у крыс с 5М-СД в сравнении с 1.5М-СД.

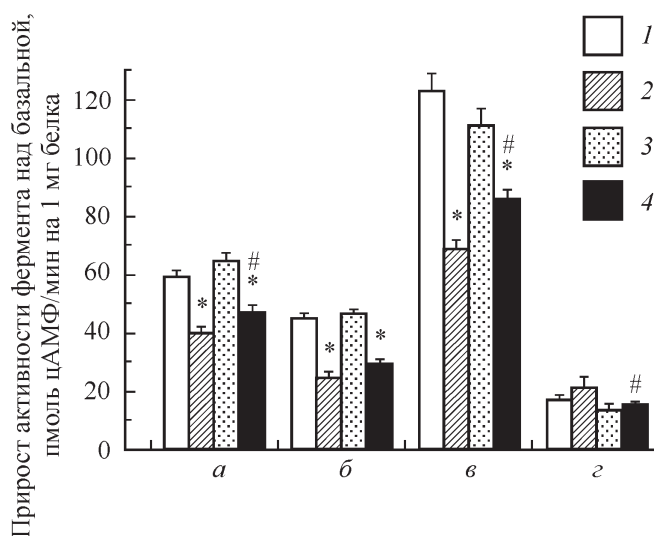


Рис. 4. Влияние гормонов на активность АЦ в миокарде контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

а — изопротеренол, 10^{-5} М; б — норадреналин, 10^{-5} М; в — релаксин, 10^{-8} М; г — РАСАР-38, 10^{-6} М.

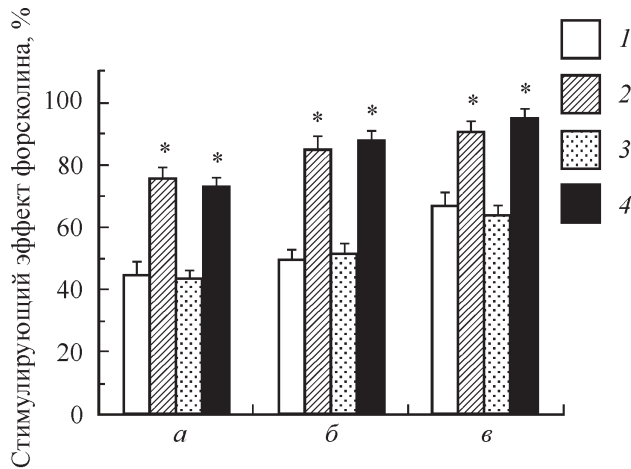


Рис. 5. Влияние гормонов на стимулированную форсколином активность АЦ в миокарде и семенниках контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

а — норадреналин, 10⁻⁵ М, миокард; б — соматостатин, 10⁻⁶ М, миокард; в — соматостатин, 10⁻⁶ М, семенники.

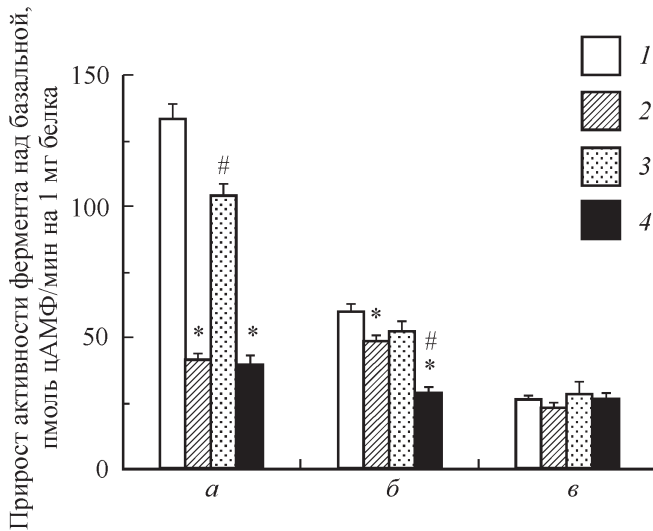


Рис. 6. Стимуляция гормонами активности АЦ в тестикулярных мембранах, выделенных из семенников контрольных (столбцы 1 и 3) и диабетических (столбцы 2 и 4) крыс.

а — ХГЧ, 10⁻⁸ М; б — PACAP-38, 10⁻⁶ М; в — изопроterenол, 10⁻⁵ М.

Обсуждение

Ранее нами и другими авторами было показано, что в условиях экспериментального СД 1-го типа меняется активность гормональных сигнальных систем, в том числе АЦСС, причем характер и выраженность изменений определяются продолжительностью и тяжестью заболевания (Mooradian, Scarpace, 1992; Carmena et al., 1997; Dincer et al., 2001; Altan et al., 2007; Kumar et al., 2010; Shpakov et al., 2013a). Предполагается, что изменения в гормональных сигнальных системах, в том числе в АЦСС, являются ключевыми причинами осложнений СД 1-го типа со стороны нервной, сердечно-сосудистой, репродуктивной и других систем организма (Шпаков и др.,

2009; Shpakov, 2012a, 2012b). Поскольку у человека СД 1-го типа обычно развивается в детском или подростковом возрасте, одними из актуальных задач экспериментальной эндокринологии являются разработка ранних моделей СД 1-го типа и изучение их влияния на функционирование гормональных сигнальных систем. Мы использовали раннюю пролонгированную модель 1.5М-СД и изучили ее влияние на чувствительность АЦСС к гормонам в мозге, миокарде и семенниках диабетических животных в сравнении с поздней моделью 5М-СД.

Выбор мозга в качестве объекта исследования был обусловлен тем, что изменение активности гормональных систем мозга, в том числе АЦСС, и их взаимодействия в условиях СД 1-го типа приводят к развитию нейродегенеративных заболеваний (Biessels et al., 2001; Scheen, 2010; Shpakov et al., 2011; Шпаков, 2012b; Шпаков, Деркач, 2012). Изменения в гормональных системах мозга могут быть следствием вызываемых СД метаболических нарушений и окислительного стресса, а также носить компенсаторный характер. Ранее нами было показано, что в условиях острой модели СД 1-го типа, а также пролонгированной модели заболевания, инициированной обработкой взрослых крыс стрептозотоцином, меняется активность АЦСС, чувствительной к биогенным аминам и пептидным гормонам (Шпаков и др., 2005b, 2007b; Shpakov et al., 2013a). Данные, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о значительных изменениях в сигнальных каскадах АЦ мозга крыс с ранней индукцией СД 1-го типа, регулируемых серотином, релаксином, соматостатином и агонистами АР, причем в ряде случаев они более выражены, чем у животных с 5М-СД.

В мозге крыс с 1.5М-СД ослаблена передача серотонинового сигнала к АЦ как через сопряженные с G_s-белками 5-НТ-рецепторы 4-го, 6-го и 7-го типов, так и через сопряженные с G_i-белками 5-НТ-рецепторы 1-го типа, причем ингибирующие эффекты 5-НТ_{1B/1D}-агониста 5-нонилокситриптамина и 5-НТ_{1/2}-агониста 5-МДМТ составляют всего 24—26 % от таковых в контроле. Нарушения в чувствительной к серотонину АЦСС в мозге крыс с ранней моделью СД выражены больше, чем в случае поздней модели 5М-СД. Так, стимулирующий эффект 5-НТ_{1/7}-агониста 8-ОН-DPAT в мозге крыс с 5М-СД не менялся, в то время как у животных с 1.5М-СД он снижался. Полученные данные указывают на то, что повреждающее воздействие СД 1-го типа на серотонинергическую систему мозга в большей степени выражено на стадии ее формирования у молодых животных. В пользу нарушения функций серотонинергической системы мозга в условиях СД 1-го типа свидетельствуют работы других авторов, которые связывают их с изменением числа 5-НТ-рецепторов, снижением концентрации серотонина в мозге и ослаблением регулируемых серотином сигнальных каскадов (Sandrini et al., 1997; Jackson, Paulose, 1999; Manjarrez et al., 2006; Li, France, 2008).

Чувствительная к серотонину АЦСС непосредственно вовлечена в процессы обучения и формирования памяти, в контроль за эмоциональной сферой и пищевого поведения, вследствие чего нарушения в ней при СД 1-го типа являются ключевыми патогенетическими факторами, приводящими к диабетической энцефалопатии и когнитивному дефициту (Van Tilburg et al., 2001; Yamato et al., 2004; Shpakov et al., 2011). Несмотря на существенные различия в этиологии и патогенезе СД 1-го и 2-го типов, дисфункции в серотонинергической системе мозга,

вносящие существенный вклад в развитие когнитивного дефицита, отмечены и в случае экспериментального СД 2-го типа (Shpakov et al., 2012b, 2013b). Повышение концентрации центрального серотонина при интраназальном его введении частично восстанавливает активность АЦСС в мозге крыс с СД 2-го типа и улучшает ослабленные у них когнитивные функции (Shpakov et al., 2012b).

Наряду со снижением функциональной активности серотонинергической АЦСС в мозге крыс с 1.5М-СД наблюдали ослабление стимулирующих эффектов β -АР-агониста изопротеренола и релаксина — гормонов, влияющих на тонус гладкой мускулатуры сосудов и контролирующих макро- и микроциркуляцию крови и артериальное давление (Norrby et al., 1996; Teichman et al., 2009; Rath et al., 2012). Снижение чувствительности АЦ к изопротеренолу и релаксину было обнаружено и в миокарде крыс с 1.5М-СД, где также снижался стимулирующий эффект агониста α/β -АР норадреналина. Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, которые обнаружили ослабление стимулирующего влияния изопротеренола на активность АЦ и цАМФ-зависимые сигнальные пути в микрососудах мозга, сердечной мышце и изолированных кардиомиоцитах крыс с СД 1-го типа (Mooradian, Scarpese, 1992; Wichelhaus et al., 1994; Kamata et al., 1997). Все это свидетельствует о системных нарушениях функций регулируемой β -агонистами и релаксином АЦСС в тканях нервной и сердечно-сосудистой систем при СД 1-го типа. Имеются основания полагать, что ослабление регуляции АЦ агонистами β -АР и релаксином в миокарде и мозге диабетических крыс вносит существенный вклад в нарушение циркуляции крови, развитие диабетической кардиомиопатии и сосудистой мозговой недостаточности, следствием которых являются гипоксия и ишемические поражения сердечной мышцы и головного мозга.

Нами показано, что наряду с ослаблением сопряженных с G_s -белками сигнальных путей, реализуемых через β -АР, в мозге и миокарде диабетических крыс снижается ингибирующее действие норадреналина на АЦ, реализуемое через α_2 -АР, сопряженные с G_i -белками. На снижение активности α_2 -АР, их числа и аффинности к селективным агонистам в тканях мозга крыс с СД 1-го типа указывают результаты и других авторов (Padayatti, Paulose, 1999). Принимая во внимание важную роль норадреналина как нейротрансмиттера в центральной и периферической нервной системе, можно сделать вывод о том, что изменение функциональной активности АЦСС, чувствительной к норадреналину, в условиях диабетической патологии является одним из факторов, вызывающих диабетическую энцефалопатию и дисфункцию сердечно-сосудистой системы, в том числе и часто диагностируемые у пациентов с СД 1-го типа аритмии, связанные с нарушением функций симпатических нервов (Gyires et al., 2009; Cinnamon Bidwell et al., 2010; Gilsbach et al., 2011). Характер изменений регуляторных влияний агонистов АР на активность АЦ при обеих моделях СД 1-го типа оказался сходным, с тем лишь различием, что в миокарде крыс с ранней моделью СД 1-го типа снижение эффекта релаксина выражено больше, чем при 5М-СД. Это свидетельствует в пользу того, что в сердечной мышце крыс на ранних стадиях онтогенеза АЦСС, чувствительная к релаксину, в большей степени подвержена влиянию характерных для СД 1-го типа метаболических нарушений.

В мозге и миокарде крыс с 1.5М-СД стимулирующий эффект РАСАР-38, который отвечает за регуляцию про-

цессов регенерации и дифференцировки клеток, существенно не отличался от такового в контроле, что может свидетельствовать в пользу сохранения РАСАР-зависимых нейропротекторных и кардиопротекторных механизмов при ранней индукции СД 1-го типа. В миокарде крыс с 5М-СД эффект РАСАР-38 также менялся мало. В то же время в мозге животных с поздней моделью СД наблюдали его снижение, что может указывать на ослабление нейропротекторного влияния РАСАР-38 на нейрональные и глиальные клетки мозга у крыс с поздней индукцией СД 1-го типа при сохранении кардиопротекторного влияния гормона. Значительное снижение активности АЦ при действии РАСАР-38 наблюдали в семенниках диабетических крыс, причем у животных с 5М-СД оно было выражено сильнее. Поскольку РАСАР-38 вовлечен в контроль за сперматогенезом, ростом и дифференцировкой клеток Лейдига (Li, Arimura, 2003; Lacombe et al., 2006; Brubel et al., 2012), ослабление его влияния в семенниках при СД 1-го типа может вносить существенный вклад в развитие гипогонадотропных состояний и других дисфункций мужской репродуктивной системы (La Vignera et al., 2009; Navarro-Casado et al., 2010; Schoeller et al., 2012). Другим фактором, ведущим к нарушению функций клеток Лейдига, является снижение их чувствительности к ХГЧ, структурному и функциональному гомологу ЛГ. Нами показано, что стимулирующее действие гонадотропина на АЦ в тестикулярных мембранах диабетических крыс значительно снижено, в наибольшей степени при ранней индукции СД 1-го типа. Ослабление регуляции АЦ гонадотропином в семенниках диабетических крыс является одним из ключевых механизмов развития резистентности тестикулярной ткани к ЛГ, что ведет к нарушениям функционирования гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и развитию андрогенной недостаточности, характерной для СД 1-го типа (Шпаков и др., 2009; La Vignera et al., 2009; Шпаков, 2010; Navarro-Casado et al., 2010; Schoeller et al., 2012; Деркач и др., 2013).

Во всех изученных тканях в условиях пролонгированного СД 1-го типа снижалось ингибирующее действие на АЦ соматостатина — пептидного гормона, который через сопряженные с G_i -белками рецепторы регулирует функциональную активность АЦСС и других сигнальных систем в мозге и периферических тканях, контролирует секрецию множества гормонов и ростовых факторов, играет определяющую роль в контроле за пролиферацией нормальных и опухолевых клеток (Kumar, Grant, 2010; Шпаков, 2012a; Tuboly, Vécsei, 2013). Обнаруженное нами снижение ингибирующего эффекта соматостатина в миокарде и семенниках практически не зависело от возраста крыс, у которых вызывали СД 1-го типа. В то же время в мозге крыс с 1.5М-СД снижение ингибирующего эффекта соматостатина было выражено сильнее, чем при 5М-СД, что свидетельствует о большей чувствительности регулируемой соматостатином АЦСС в мозге молодых крыс в сравнении с взрослыми животными. Снижение регуляторного влияния соматостатина в изученных нами тканях диабетических крыс указывает на системные нарушения передачи соматостатинового сигнала при СД 1-го типа, что должно учитываться при мониторинге и лечении этого заболевания и его осложнений. Ослабление соматостатинергической системы в тканях диабетических крыс может приводить к дисбалансу сигнальных каскадов, вовлеченных в регуляцию роста, дифференцировки и апоптоза, и к нарушению взаимодействия между ними.

Основными причинами ослабления ингибирующего влияния на АЦ соматостатина в условиях СД 1-го типа могут быть уменьшение числа соматостатиновых рецепторов (СомР) и снижение экспрессии и функциональной активности G_i -белков, с помощью которых СомР сопряжены с АЦ. Показано, что в гипоталамусе и гипофизе крыс со стрептозотоциновым СД 1-го типа экспрессия СомР 1-го, 2-го, 3-го и 5-го типов снижается на 50—80 % (Bruno et al., 1994). Значительное снижение экспрессии и содержания СомР 2-го типа отмечено в предсердиях диабетических крыс (Gao et al., 2011). В миокарде крыс со стрептозотоциновым СД 1-го типа в значительной степени снижена экспрессия G_i -белков (Wichelhaus et al., 1994; Gando et al., 1997), что является следствием гипергликемии, которая вызывает изменение активности транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию генов, кодирующих различные типы $G_i\alpha$ -субъединиц (Hashim et al., 2002, 2004). В семенниках диабетических крыс, несмотря на отсутствие выраженных изменений в содержании G_i -белков, наблюдается значительное снижение их функциональной активности, о чем свидетельствует отсутствие ингибирующего влияния ГИДФ в низких концентрациях на стимулированную форсколином активность АЦ (Rodriguez-Pena et al., 1994; Carmena et al., 1997). Выявленное нами ранее при изучении острой модели СД 1-го типа, а также в настоящем исследовании снижение ингибирующего влияния агонистов 5-НТ-рецепторов 1-го типа на активность АЦ указывает на ослабление широкого спектра сопряженных с G_i -белками сигнальных путей в мозге диабетических животных.

Изменение экспрессии определенных типов G -белков при СД 1-го типа может компенсироваться вследствие изменения числа сопряженных с ними рецепторов, как это, вероятно, происходит в случае ДАР. Нами показано, что в мозге крыс с ранней индукцией СД 1-го типа стимулирующее влияние на АЦ дофамина повышено, а ингибирующее бромокriptина, который действует через G_i -сопряженный D_2 -ДАР, не меняется, хотя у крыс с поздней индукцией СД 1-го типа оба эффекта снижены. Возможная причина этого состоит в высокой пластичности дофаминергической системы мозга на ранних стадиях онтогенеза. Это приводит к изменению экспрессии ДАР 1-го и 2-го типов, которые опосредуют стимулирующее и ингибирующее действие агонистов ДАР на АЦ. В пользу такого предположения свидетельствуют данные об усилении экспрессии D_1 - и D_2 -ДАР и повышении общего связывания агонистов с ДАР в коре больших полушарий молодых крыс со стрептозотоциновым СД 1-го типа (Kumar et al., 2010).

Таким образом, нами впервые показано, что в условиях мягкой модели пролонгированного СД 1-го типа, вызванной инъекциями средних доз стрептозотина 1.5-месячным самцам крыс, в мозге, миокарде и семенниках диабетических животных в значительной степени меняется функциональная активность АЦСС, чувствительной к биогенным аминам и полипептидным гормонам. В наибольшей степени у крыс с 1.5М-СД ослабляются ингибирующие АЦ сигнальные пути, которые регулируются соматостатином (во всех изученных тканях), норадреналином (в миокарде и мозге), серотонином и агонистами 5-НТ-рецепторов 1-го типа (в мозге). В условиях 1.5М-СД в мозге также снижаются стимулирующие АЦ эффекты релаксина, изопротеренола и агонистов сопряженных с G_s -белками 5-НТ-рецепторов, в миокарде — соотвествующие эффекты ГИДФ, релаксина и агонистов

β -АР, в семенниках — эффекты ГИДФ, ХГЧ и РА-САР-38. Изменения в гормональной чувствительности АЦСС в мозге крыс с 1.5М-СД отличаются от таковых при 5М-СД. Это относится как к стимулирующим эффектам дофамина и РА-САР-38, которые действуют на АЦ через G_s -белки, так и к ингибирующим эффектам бромокriptина, серотонина, 5-МДМТ и соматостатина, которые действуют через G_i -белки.

Совокупность полученных данных указывает на значительные нарушения в гормональной регуляции нервной, сердечно-сосудистой и репродуктивной систем у крыс с ранней индукцией СД 1-го типа, что может быть одной из причин развития осложнений этого заболевания — диабетической кардиомиопатии, когнитивного дефицита, гипогонадотропных состояний, которые часто выявляются у детей и подростков, страдающих СД 1-го типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-00434 и 12-04-32034) и Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 8486).

Список литературы

- Деркач К. В., Мойсеюк И. В., Чистякова О. В., Шпаков А. О. 2013. Андрогенная недостаточность у самцов крыс с долгосрочным неонатальным стрептозотоциновым диабетом. Бюл. эксперим. биол. мед. 155 (3) : 315—318.
- Шпаков А. О. 2010. Функциональное состояние гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы при сахарном диабете. Пробл. эндокринологии. 56 (5) : 23—29.
- Шпаков А. О. 2012а. Соматостатиновые рецепторы и сопряженные с ними сигнальные каскады. Журн. эволюц. биохим. физиол. 48 (4) : 329—341.
- Шпаков А. О. 2012б. Функциональное состояние регулируемых биогенными аминами и ацетилхолином сигнальных систем мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (6) : 459—468.
- Шпаков А. О., Бондарева В. М., Деркач К. В., Перцева М. Н. 2009. Исследование регулируемой гормонами аденилатциклазной системы в репродуктивных тканях крыс при экспериментальном сахарном диабете. Техн. живых систем. 7 (8) : 10—21.
- Шпаков А. О., Бондарева В. М., Чистякова О. В. 2010. Функциональное состояние аденилатциклазной сигнальной системы в репродуктивных тканях крыс с экспериментальным диабетом 1-го типа. Цитология. 52 (2) : 177—183.
- Шпаков А. О., Деркач К. В. 2012. Пептидергические сигнальные системы мозга при сахарном диабете. Цитология. 54 (10) : 733—741.
- Шпаков А. О., Деркач К. В., Чистякова И. В., Мойсеюк И. В., Бондарева В. М. 2012. Изменение гормональной чувствительности аденилатциклазы в мозге крыс с длительным стрептозотоциновым диабетом. Докл. РАН. 446 (1) : 103—105.
- Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Бондарева В. М., Перцева М. Н. 2007а. Функциональное сопряжение гормональных рецепторов с G -белками в аденилатциклазной системе мышечных тканей и мозга крыс в условиях краткосрочной гипергликемии. Бюл. эксперим. биол. мед. 144 (11) : 526—530.
- Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Гурьянов И. А., Власов Г. П., Перцева М. Н. 2007б. Идентификация нарушений в гормоночувствительной АЦ-системе в тканях крыс с диабетом 1-го и 2-го типов с использованием функциональных зондов и синтетических наноразмерных пептидов. Техн. живых систем. 4 (5—6) : 96—108.

- Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Гурьянов И. А., Перцева М. Н. 2005а. Молекулярные причины изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы сердечной мышцы к биогенным аминам при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Цитология. 47 (6) : 540—548.
- Шпаков А. О., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2005б. Молекулярные механизмы изменения чувствительности аденилатциклазной сигнальной системы к биогенным аминам при стрептозотоциновом диабете. Бюл. эксперим. биол. мед. 140 (9) : 286—290.
- Altan V. M., Arioglu E., Guner S., Ozcelikay A. T. 2007. The influence of diabetes on cardiac β -adrenoceptor subtypes. Heart Fail. Rev. 12 : 58—65.
- Biessels G. J., Smale S., Duis S. E., Kamal A., Gispen W. H. 2001. The effect of γ -linolenic acid- α -lipoic acid on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. J. Neurol. Sci. 182 : 99—106.
- Brubel R., Kiss P., Vincze A., Varga A., Varnagy A., Bodis J., Mark L., Jambor E., Maasz G., Hashimoto H., Helyes Z., Toth G., Tamas A., Koppan M., Reglodi D. 2012. Effects of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide on human sperm motility. J. Mol. Neurosci. 48 : 623—630.
- Bruno J., Xu Y., Song J., Berelowitz M. 1994. Pituitary and hypothalamic somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid expression in the food-deprived and diabetic rat. Endocrinology. 135 : 1787—1792.
- Carmena M. J., Clemente C., Carrero I., Solano R. M., Prieto J. C. 1997. G-proteins and β -adrenergic stimulation of adenylyl cyclase activity in the diabetic rat prostate. Prostate. 33 : 46—54.
- Cinnamon Bidwell L., Dew R. E., Kollins S. H. 2010. α_2 -Adrenergic receptors and attention-deficit/hyperactivity disorder. Curr. Psychiatry Rep. 12 : 366—373.
- Dincer U. D., Bidasee K. R., Guner S., Tay A., Ozcelikay A. T., Altan V. M. 2001. The effect of diabetes on expression of β_1 , β_2 - and β_3 -adrenoreceptors in rat hearts. Diabetes. 50 : 455—461.
- Gando S., Hattori Y., Akaishi Y., Nishihira J., Kanno M. 1997. Impaired contractile response to β adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in β adrenoreceptors-G protein-adenylyl cyclase system and phospholamban phosphorylation. J. Pharmacol. Exp. Ther. 282 : 475—484.
- Gao S., Oh Y. B., Shah A., Park W. H., Kim S. H. 2011. Suppression of ANP secretion by somatostatin through somatostatin receptor type 2. Peptides. 32 : 1179—1186.
- Giltsbach R., Albarrán-Juárez J., Hein L. 2011. Pre-versus postsynaptic signaling by α_2 -adrenoreceptors. Curr. Top. Membr. 67 : 139—160.
- Gyires K., Zádori Z. S., Török T., Mátyus P. 2009. α_2 -Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions. Neurochem. Int. 55 : 447—453.
- Hashim S., Li Y., Nagakura A., Takeo S., Anand-Srivastava M. B. 2004. Modulation of G-protein expression and adenylyl cyclase signaling by high glucose in vascular smooth muscle. Cardiovasc. Res. 63 : 709—718.
- Hashim S., Liu Y. Y., Wang R., Anand-Srivastava M. B. 2002. Streptozotocin-induced diabetes impairs G-protein linked signal transduction in vascular smooth muscle. Mol. Cell. Biochem. 240 : 57—65.
- Jackson J., Paulose C. S. 1999. Enhancement of [*m*-methoxy 3 H]MDL100907 binding to 5HT $_{2A}$ receptors in cerebral cortex and brain stem of streptozotocin induced diabetic rats. Mol. Cell. Biochem. 199 : 81—85.
- Kamata K., Satoh T., Tanaka H., Shigenobu K. 1997. Changes in electrophysiological and mechanical responses of the rat papillary muscle to α - and β -agonist in streptozotocin-induced diabetes. Can. J. Physiol. Pharmacol. 75 : 781—788.
- Kumar T. P., Antony S., Gireesh G., George N., Paulose C. S. 2010. Curcumin modulates dopaminergic receptor, CREB and phospholipase C gene expression in the cerebral cortex and cerebellum of streptozotocin induced diabetic rats. J. Biomed. Sci. 17 : 43.
- Kumar U., Grant M. 2010. Somatostatin and somatostatin receptors. Results Probl. Cell. Differ. 50 : 137—184.
- Lacombe A., Lelievre V., Roselli C. E., Salameh W., Lue Y. H., Lawson G., Muller J. M., Waschek J. A., Vilain E. 2006. Delayed testicular aging in pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP) null mice. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 3793—3798.
- La Vignera S., Calogero A. E., Condorelli R., Lanzafame F., Giammusso B., Vicari E. 2009. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. Minerva Endocrinol. 34 : 1—9.
- Levy-Shraga Y., Lerner-Geva L., Boyko V., Graph-Barel C., Mazor-Aronovitch K., Modan-Moses D., Pinhas-Hamiel O. 2012. Type 1 diabetes in pre-school children—long-term metabolic control, associated autoimmunity and complications. Diabet. Med. 29 : 1291—1296.
- Li J. X., France C. P. 2008. Food restriction and streptozotocin treatment decrease 5-HT $_{1A}$ and 5-HT $_{2A}$ receptor-mediated behavioral effects in rats. Behav. Pharmacol. 19 : 292—297.
- Li M., Arimura A. 2003. Neuropeptides of the pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide/growth hormone-releasing hormone/secretin family in testis. Endocrine. 20 : 201—214.
- Manjarrez G., Herrera R., Leon M., Hernandez R. J. 2006. A low brain serotonergic neurotransmission in children with type 1 diabetes detected through the intensity dependence of auditory-evoked potentials. Diabetes Care. 29 : 73—77.
- Mooradian A. D., Scarpace P. J. 1992. β -Adrenergic receptor activity of cerebral microvessels in experimental diabetes mellitus. Brain Res. 583 : 155—160.
- Navarro-Casado L., Juncos-Tobarra M. A., Cháfer-Rudilla M., de Onzoño L. Í., Blázquez-Cabrera J. A., Miralles-García J. M. 2010. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity. Study in rats. J. Androl. 31 : 584—592.
- Norrby K., Bani D., Bigazzi M., Banni Sacchi T. 1996. Relaxin, a potent microcirculatory effector, is not angiogenic. Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 16 : 227—231.
- Padayatti P. S., Paulose C. S. 1999. α_2 -Adrenergic and high affinity serotonergic receptor changes in the brain stem of streptozotocin-induced diabetic rats. Life Sci. 65 : 403—414.
- Rath G., Balligand J. L., Dessy C. 2012. Vasodilatory mechanisms of β receptor blockade. Curr. Hypertens. Rep. 14 : 310—317.
- Rodriguez-Pena M. S., Gujarran L. G., Juarranz M. G., Rodriguez-Henche N., Bajo A. M., Aguado F., Prieto J. C. 1994. Analysis of vasoactive intestinal peptide receptors and the G protein regulation of adenylyl cyclase in seminal vesicle membranes from streptozotocin-diabetic rats. Cell. Signal. 6 : 147—156.
- Sandrini M., Vitale G., Vergoni A. V., Ottani A., Bertolini A. 1997. Streptozotocin-induced diabetes provokes changes in serotonin concentration and on 5-HT $_{1A}$ and 5-HT $_{2A}$ receptor in rat brain. Life Sci. 60 : 1393—1397.
- Scheen A. 2010. Central nervous system: a conductor orchestrating metabolic regulations harmed by both hyperglycaemia and hypoglycaemia. Diabetes Metab. 36 : 31—38.
- Schoeller E. L., Schon S., Moley K. H. 2012. The effects of type 1 diabetes on the hypothalamic, pituitary and testes axis. Cell Tissue Res. 349 : 839—847.
- Shpakov A. O. 2012. Alterations in hormonal signaling systems in diabetes mellitus: origin, causality and specificity. Endocrinol. Metab. Syndrome. 1 (2). <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1017.1000e106>.
- Shpakov A., Chistyakova O., Derkach K., Bondareva V. 2011. Hormonal signaling systems of the brain in diabetes mellitus. In: Neurodegenerative Diseases (Ed. by R. C.-C. Chang). Rijeka, Croatia: Intech Open Access Publisher. 349—386.
- Shpakov A. O., Chistyakova O. V., Derkach K. V., Moiseyuk I. V., Bondareva V. M. 2012a. Intranasal insulin affects adenylyl cyclase system in rat tissues in neonatal diabetes. Central Eur. J. Biol. 7 : 33—47.
- Shpakov A. O., Derkach K. V., Chistyakova O. V., Sukhov I. B., Shipilov V. N., Bondareva V. M. 2012b. The brain adenylyl cyclase signaling system and cognitive functions in rat with neonatal diabetes under the influence of intranasal serotonin. J. Metabolic Syndrome. 1 (2) <http://dx.doi.org/10.4172/jms.1000104>.
- Shpakov A., Derkach K., Moiseyuk I., Chistyakova O. 2013a. Alterations of hormone-sensitive adenylyl cyclase system in the tis-

sues of rats with long-term streptozotocin diabetes and the influence of intranasal insulin. *Dataset Papers Pharmacol.* 2013 : 698435. <http://dx.doi.org/10.7167/2013/698435>.

Shpakov A. O., Derkach K. V., Moyseyuk I. V., Chistyakova O. V., Bondareva V. M. 2013b. Hormonal sensitivity of adenylyl cyclase in the myocardium, brain and testes of 18-month-old non-diabetic and diabetic rats. *Int. J. Biochem. Res. Review.* 3 : 1—20.

Shpakov A. O., Kuznetsova L. A., Plesneva S. A., Kolychev A. P., Bondareva V. M., Chistyakova O. V., Pertseva M. N. 2006. Functional defects in adenylyl cyclase signaling mechanisms of insulin and relaxin action in skeletal muscles of rat with streptozotocin type 1 diabetes. *Central Eur. J. Biol.* 1 : 530—544.

Shpakov A. O., Shpakova E. A., Tarasenko I. I., Derkach K. V., Vlasov G. P. 2010. The peptides mimicking the third intracellular loop of 5-hydroxytryptamine receptors of the types 1B and 6 selectively activate G proteins and receptor-specifically inhibit serotonin signaling via the adenylyl cyclase system. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16 : 95—105.

Stiles M. C., Seaquist E. R. 2010. Cerebral structural and functional changes in type 1 diabetes. *Minerva Med.* 101 : 105—114.

Szkudelski T. 2012. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp. Biol. Med.* 237 : 481—490.

Tabit C. E., Chung W. B., Hamburg N. M., Vita J. A. 2010. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms

and clinical implications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11 : 61—74.

Tavares A. C., Bocchi E. A., Guimarães G. V. 2012. Endothelial function in pre-pubertal children at risk of developing cardiomyopathy: a new frontier. *Clinics (San Paulo).* 67 : 273—278.

Teichman S. L., Unemori E., Dschietzig T., Conrad K., Volors A. A., Teerlink J. R., Felker G. M., Metra M., Cotter G. 2009. Relaxin, a pleiotropic vasodilator for the treatment of heart failure. *Heart Fail. Rev.* 14 : 321—329.

Tuboly G., Vécsei L. 2013. Somatostatin and cognitive function in neurodegenerative disorders. *Mini Rev. Med. Chem.* 13 : 34—46.

Van Tilburg M. A., McCaskill C. C., Lane J. D., Edwards C. L., Bethel A., Feinglos M. N., Surwit R. S. 2001. Depressed mood is a factor in glycemic control in type 1 diabetes. *Psychosomatic Medicine.* 63 : 551—555.

Wichelhaus A., Russ M., Petersen S., Eckel J. 1994. G protein expression and adenylyl cyclase regulation in ventricular cardiomyocytes from STZ-diabetic rats. *Amer. J. Physiol.* 267 : H548—H555.

Yamato T., Misumi Y., Yamasaki S., Kino M., Aomine M. 2004. Diabetes mellitus decreases hippocampal release of neurotransmitters: an *in vivo* microdialysis study of awake, freely moving rats. *Diabet. Nutr. Metab.* 17 : 128—136.

Поступила 20 V 2013

THE INFLUENCE OF LONG-TERM DIABETES MELLITUS INDUCED
BY STREPTOZOTOCIN TREATMENT OF SIX-WEEK RATS ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY
OF ADENYLYL CYCLASE SYSTEM

A. O. Shpakov, K. V. Derkach, O. V. Chistyakova, I. V. Moyseyuk, V. M. Bondareva

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg;
e-mail: alex_shpakov@list.ru

The alterations occurring in diabetes mellitus (DM) of the type 1 in the adenylyl cyclase signaling system (ACSS) are one of the key causes of complications of the disease. As type 1 DM most often diagnosed in childhood and adolescence, the actual problem is the study of alterations in ACSS in the early development of the disease. For this we developed a prolonged model of type 1 DM, which was induced by treatment of six-week-old rats with moderate doses of streptozotocin (1½M-DM), and studied the functional state of ACSS in the brain, myocardium, and testes of rats with this model of the disease, seven months after its initiation. Model 1½-DM was compared with the seven-month model of type 1 DM, which was induced by streptozotocin treatment of adults, five-month-old, animals (5M-DM). It is shown that in 1½M-DM in the tissues of diabetic rats the functional activity of ACSS sensitive to biogenic amines and polypeptide hormones was significantly changed. In rats with 1½M-DM the adenylyl cyclase (AC) inhibiting effects of somatostatin (in all studied tissues), norepinephrine (in the myocardium and brain), and agonists of type 1 serotonin receptor (in the brain) were weakened the most. In the brain also decreased AC stimulating effects of relaxin, isoproterenol and agonists of G_s-protein-coupled serotonin receptors, in the myocardium — corresponding effects of GppNHp, relaxin and β-adrenergic agonists, and in the testes — AC effects of GppNHp and chorionic gonadotropin. When comparing the models 1½M-DM and 5M-DM, the most pronounced differences between them were found in the influence of DM on hormonal regulation of ACSS in the brain, and this refers both to AC stimulating effects of dopamine and PACAP-38, and to AC inhibiting effects of bromocriptine and somatostatin. These results indicate significant alterations in the hormonal regulation of the nervous, cardiovascular and reproductive systems in rats with early induction of type 1 DM, in some cases more severe compared with late model of 5M-DM. These alterations can be the basis for the development of diabetic cardiomyopathy, cognitive deficits and hypogonadotropic states, which are often detected in children and adolescents with type 1 DM.

Key words: adenylyl cyclase, adrenergic receptor, gonadotropin, brain, myocardium, diabetes mellitus, testes, serotonin, somatostatin.