

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ИНТРАНАЗАЛЬНО ВВОДИМОГО ИНСУЛИНА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И ГОРМОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ КРЫС, НАРУШЕННЫЕ ВСЛЕДСТВИЕ ТРЁХДНЕВНОГО ГОЛОДАНИЯ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

К.В. Деркач^{1}, В.М. Бондарева¹, А.О. Шпаков^{1,2}*

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Санкт-Петербург, пр. Топова, 44; *эл. почта: derkach_k@list.ru

²Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Временное прекращение или ограничение грудного вскармливания способно во взрослом возрасте приводить к метаболическим расстройствам. Однако данные о влиянии голодания в раннем постнатальном периоде на функции эндокринной системы во взрослом возрасте единичны и противоречивы. Не разработаны подходы для коррекции метаболических и гормональных нарушений, вызываемых преждевременным прекращением грудного вскармливания. Цель работы состояла в изучении метаболических и гормональных показателей и изменений гормонального статуса гонадной и тиреоидной систем у 10-месячных самцов крыс с прерыванием грудного вскармливания в дни P19-P21, а также в оценке восстанавливающего эффекта на них четырёхнедельного лечения интраназальным инсулином (ИИ), вводимым в постнатальном периоде (P28-P55) или в зрелом возрасте (P183-P210). Прерывание лактации было вызвано обработкой кормящих самок с помощью бромкриптина (10 мг/сутки/крысу, P19-P21). У самцов крыс с временным прекращением грудного вскармливания развивались характерные признаки метаболического синдрома (ожирение, дислипидемия, нарушенная толерантность к глюкозе, гиперлептинемия), снижались уровни тестостерона и тиреоидных гормонов (fT_4 , fT_3) и ослаблялся синтез тестостерона и тироксина, стимулированный соответственно гонадолиберинем и тиролиберинем. Это было обусловлено снижением чувствительности семенников к лютеинизирующему гормону (ЛГ) и щитовидной железы к тиреотропному гормону (ТТГ). Лечение ИИ в раннем онтогенезе снижало массу тела и жира, улучшало липидный профиль, чувствительность к инсулину, лептину, ЛГ и ТТГ, восстанавливало уровни тестостерона и тиреоидных гормонов и их стимуляцию релизинг-факторами. Лечение ИИ в зрелом возрасте нормализовывало уровни тестостерона, тиреоидных гормонов, их стимуляцию релизинг-факторами, но слабо влияло на метаболические и гормональные показатели. Полученные данные указывают на широкий спектр метаболических и гормональных нарушений у взрослых самцов крыс с “неонатальной” моделью метаболического синдрома и на эффективность различных стратегий их коррекции с помощью длительного лечения ИИ.

Ключевые слова: лактация; метаболический синдром; интраназально вводимый инсулин; тестостерон; тиреотропный гормон; тиреоидный гормон; гиперлептинемия

DOI: 10.18097/PBMC20226804263

ВВЕДЕНИЕ

Критическими периодами жизни, которые влияют на развитие в дальнейшем метаболического синдрома (МС), являются неонатальный и ранний постнатальный периоды [1-3]. Нарушение грудного вскармливания в эти периоды во взрослом состоянии способно привести к ожирению, нарушенной глюкозотолерантности, инсулиновой резистентности (ИР), нарушениям функций сердечно-сосудистой системы, типичным для патогенетической картины МС [2, 3]. Это может быть обусловлено как дефицитом поступления в организм гормонов, которые содержатся в материнском молоке и положительно воздействуют на нервную и эндокринную систему ребенка, так и недостаточностью поступления содержащихся в материнском молоке питательных веществ, прежде всего белкового происхождения, необходимых быстро растущему организму [4]. Важную роль играет как количество материнского молока, так и его состав, включая содержание в нём гормональных агентов [5, 6]. Имеются все основания считать, что по этиологии и патогенезу запрограммированный в раннем

онтогенезе МС отличается от других форм этого заболевания, вследствие чего одной из актуальных задач фармакологии и эндокринологии является разработка подходов для предотвращения и лечения “неонатального” МС. Для этого могут быть применены модели “неонатального” МС на животных [3], в том числе модель прерывания лактации у кормящих самок крыс, вызванная их обработкой бромкриптином в 19-21 дни после рождения крысят, что приводит к острому дефициту грудного вскармливания крысят в течение этих трёх дней [7, 8].

МС характеризуется значительными изменениями функционирования эндокринной системы, в том числе её гонадной и тиреоидной осей. Для мужчин с МС характерна более высокая встречаемость гипогонадотропных состояний, андрогенного дефицита, нарушений функций щитовидной железы, включая аутоиммунный гипотиреоз [9, 10]. Можно предположить, что встречаемость дисфункций гонадной и тиреоидной осей повышается и при “неонатальном” МС. Однако доказательств этому крайне мало, и они ограничиваются только несколькими исследованиями на крысах с различными моделями “неонатального” МС [11-14].

Важную роль в этиологии и патогенезе МС и сахарного диабета 2 типа (СД2) играет инсулиновая система мозга, функции которой при этих метаболических расстройствах претерпевают существенные изменения [15, 16]. Это обусловлено системной ИР и нарушением транспорта инсулина в ЦНС через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [17, 18]. Поскольку инсулиновая система мозга вовлечена в регуляцию пищевого поведения, энергетического обмена, функций нервной, эндокринной и других систем организма, то её восстановление при МС и СД2 способно предотвратить или ослабить нарушения такой регуляции [15]. Для этого может быть использован интраназально вводимый инсулин (ИИ), который, минуя ГЭБ, поступает к инсулин-компетентным структурам мозга, в том числе к гипоталамусу, контролирующему метаболизм и функции эндокринной системы [19]. При этом возможно использование двух стратегий — превентивной обработки ИИ в раннем возрасте, и лечения в зрелом возрасте, когда метаболические и гормональные нарушения уже развились. Важно отметить, что повышение уровня инсулина в кровотоке с помощью инъекционных способов его доставки в условиях уже развившейся ИР не способно в полной мере восстановить функциональную активность инсулиновой системы мозга, поскольку транспорт инсулина через ГЭБ в этом случае затруднён, но при этом имеется риск развития гипогликемических состояний. До настоящего времени эффективность ИИ в отношении восстановления метаболических и гормональных показателей у грызунов с “неонатальной” моделью МС не изучалась.

В соответствии с вышесказанным, целью работы было изучить метаболические и гормональные нарушения, в том числе изменение гормонального статуса гонадной и тиреоидной систем у десятимесячных самцов крыс с прекращением грудного вскармливания на 19-21 дни постнатального развития, а также провести сравнительное исследование эффектов на эти показатели длительного интраназального введения инсулина в постнатальном периоде или в зрелом возрасте.

МЕТОДИКА

Для экспериментов были использованы крысы линии Wistar, которых содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде. Для создания “неонатальной” модели МС 19-суточных самцов крысят лишали грудного вскармливания в течение трех дней, после чего с 22-го дня переводили их на стандартный корм. Для прерывания естественного вскармливания лактирующим самкам ежедневно вводили препарат бромокриптина (перорально, 10 мг/крысу/сутки) (“Gedeon Richter”, Венгрия). В результате у самок прекращалась лактация и вместо грудного молока выделялось только молозиво, следствием чего было прекращение поступления в организм самцов крысят содержащихся в полноценном грудном

молоке питательных веществ. Самцы-крысята от самок с нормальной лактацией служили контролем. В дальнейшем случайным образом формировали четыре группы, по 12 самцов крыс в каждой: (1) контроль (группа К), (2) крысы с МС без лечения (группа МС), (3) крысы с МС с четырёхнедельной обработкой инсулином (интраназально, 0,25 МЕ/крысу), которую начинали через неделю после перевода крысят на стандартный корм (28-55 дни после рождения) (группа МСИ1), (4) крысы с МС с четырёхнедельной обработкой инсулином (интраназально, 0,5 МЕ/крысу), которую начинали при достижении животными возраста 9 месяцев (группа МСИ2). В возрасте 9 месяцев группы К, МС и МСИ1 вместо ИИ получали его растворитель — 0,1 М натрий-цитратный буфер, pH 4,5.

За неделю до окончания эксперимента у всех животных была оценена толерантность к глюкозе, для чего использовали глюкозотолерантный тест (ГТТ). При проведении ГТТ крысам внутривенно вводили глюкозу в дозе 2 г/кг, после чего оценивали концентрацию глюкозы в крови до и через 15 мин, 30 мин, 60 мин, 90 мин и 120 мин после глюкозной нагрузки с помощью тест-полосок “One Touch Select” (США) и глюкометра Life Scan (“Johnson & Johnson”, Дания) [20]. До и через 120 мин после введения глюкозы в ГТТ из хвостовой вены под местным наркозом (2-4 мг лидокаина/кг массы тела) забирали образцы крови для определения уровней инсулина и лептина. Концентрацию этих гормонов оценивали с помощью коммерческих наборов Rat Insulin ELISA (“Mercodia”, Швеция) и ELISA for Leptin, Rat (“Cloud-Clone Corp.”, США). До введения глюкозы также оценивали уровень в крови свободных жирных кислот, для чего использовали набор NEFA FS kit (“DiaSys”, Германия).

За два дня до окончания эксперимента у животных были взяты образцы крови для определения тестостерона при помощи наборов фирмы “АлкорБио” (Россия), свободного (fT₄) и общего тироксина (tT₄) и свободного (fT₃) и общего трийодтиронина (tT₃), для чего использовали наборы фирмы “Иммунотех” (Россия), а также уровня гликированного гемоглобина, который оценивали с помощью наборов Multi Test HbA1c System kit (“Polymer Technology Systems, Inc.”, США). Концентрацию триглицеридов и общего холестерина оценивали с помощью тест-полосок Triglycerides multiCare-in и Cholesterol multiCare-in (“Biochemical Systems Int.”, Италия). В последний день эксперимента каждая группа животных была случайным образом разделена на 2 подгруппы (по 6 крыс в каждой). Подгруппы К-GnRH, МС-GnRH, МСИ1-GnRH и МСИ2-GnRH обрабатывали гонадолиберин (GnRH) (“Sigma”, США), который вводили интраназально в дозе 50 мкг/крысу, в то время как подгруппы К-TRH, МС-TRH, МСИ1-TRH и МСИ2-TRH обрабатывали тиролиберин (TRH) (“Sigma”), который вводили интраназально в дозе 100 мкг/крысу, как описано ранее [21]. Препараты вводили в 11-00. До введения (10-00) и через 3 ч после него (14-00)

у животных забирали кровь для определения в ней уровней тестостерона, fT_4 , лютеинизирующего (ЛГ) и тиреотропного гормонов (ТТГ). Для определения уровней ЛГ и ТТГ использовали ИФА-наборы ELISA for LH, Rat ("Cloud-Clone Corp.") и Rat Thyroid Stimulating Hormone ELISA ("Cusabio Biotech Co.", Китай). В конце эксперимента крыс наркотизировали хлоральгидратом (400 мг/кг, в/бр), декапитировали и оценивали содержание абдоминального и эпидидимального жира.

Статистический анализ полученных данных осуществляли с помощью программы "Microsoft Office Excel 2007", а результаты представляли как среднее \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок с нормальным распределением использовали t -критерий Стьюдента, для сравнения трёх и более групп — дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони. Достоверными считали различия при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У взрослых самцов крыс Wistar, которые были лишены грудного вскармливания с 19 по 21 дни постнатального периода, в результате ингибирования бромокриптином лактации у кормящих самок, были выявлены признаки ожирения, дислипидемии и нарушенной толерантности к глюкозе, что указывает на развитие у них МС. Так у крыс с МС масса тела, абдоминального и эпидидимального жира, а также уровни триглицеридов и общего холестерина в крови были значимо выше, чем у контрольных животных того же возраста (табл. 1). Уровень свободных жирных кислот имел тенденцию к повышению, но значимо от контроля не отличался ($p = 0,16$). В группе МС были повышены уровни глюкозы натощак и через 120 мин после глюкозной нагрузки и повышены значения интегрированной площади под концентрационной кривой глюкозы в ГТТ (AUC_{0-120}) (табл. 1, рис. 1). У крыс группы МС также отмечали гиперлептинемию (табл. 2), что указывает на снижение чувствительности

тканей к лептину. Указанные выше метаболические и гормональные изменения являются характерными признаками МС [22, 23]. Полученные нами результаты в целом согласуются с данными других авторов, использовавших различные модели для индукции голодания крысят в неонатальном и раннем постнатальном возрасте [7, 8, 24, 25]. При изучении сходной с нашей модели прерывания лактации, индуцированной обработкой кормящих самок крыс бромокриптином, у шестимесячных крыс было продемонстрировано развитие таких признаков МС, как гипергликемия, гипертриглицеридемия, нарушенная толерантность к глюкозе и гиперлептинемия [7]. У трёхмесячных крыс с ограничением грудного вскармливания, вызванного подавлением лактации у кормящих самок с помощью прооксиданта метилглиоксала, отмечали ожирение, дислипидемию и нарушенную толерантность к глюкозе [8].

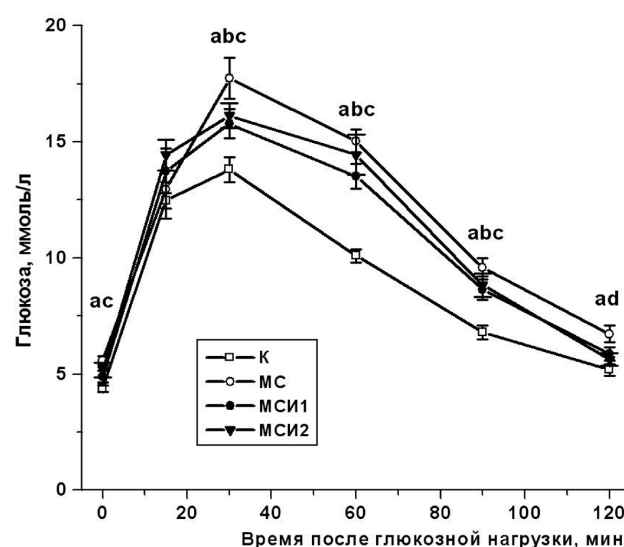


Рисунок 1. Изменение концентрации глюкозы в крови контрольных крыс и крыс с МС при проведении глюкозотолерантного теста, и влияние на неё лечения ИИ в постнатальном периоде и в зрелом возрасте. Различия между К и МС (а), К и МСИ1 (б), К и МСИ2 (с), МС и МСИ2 (д) статистически значимы ($p < 0,05$), $n = 12$.

Таблица 1. Масса тела и жировой ткани, содержание липидов и гликированного гемоглобина в крови и интегрированное значение уровня глюкозы в глюкозотолерантном тесте у контрольных крыс и крыс с МС и влияние на эти показатели лечения ИИ в постнатальном периоде и в зрелом возрасте

Показатель	К	МС	МСИ1	МСИ2
Масса тела, г	403,3 \pm 9,7	461,7 \pm 13,1 ^a	428,8 \pm 11,6	448,7 \pm 14,3 ^a
Масса АЖ, г	7,10 \pm 0,27	10,54 \pm 0,63 ^a	7,81 \pm 0,40 ^b	8,91 \pm 0,57 ^a
Масса ЭЖ, г	4,09 \pm 0,16	5,86 \pm 0,49 ^a	4,90 \pm 0,27	5,29 \pm 0,34 ^a
ТГ, мМ	2,18 \pm 0,18	3,21 \pm 0,23 ^a	2,58 \pm 0,18	2,84 \pm 0,17 ^a
ОХ, мМ	4,44 \pm 0,18	5,58 \pm 0,30 ^a	4,68 \pm 0,24	4,88 \pm 0,25
СЖК, мМ	3,96 \pm 0,13	4,88 \pm 0,44	4,27 \pm 0,29	4,43 \pm 0,26
HbA1c, %	4,48 \pm 0,20	5,47 \pm 0,35	4,79 \pm 0,24	5,25 \pm 0,28
AUC_{0-120} , глюк.	1115 \pm 27	1475 \pm 39 ^a	1351 \pm 49 ^a	1401 \pm 59 ^a

Примечание. АЖ и ЭЖ – абдоминальный и эпидидимальный жир, ТГ – триглицериды, ОХ – общий холестерин, СЖК – свободные жирные кислоты, AUC_{0-120} – площадь под кривой “концентрация глюкозы, мМ – время, мин” (в условных единицах) в глюкозотолерантном тесте. Различия с контролем (а) и группой МС (б), а также между группами МСИ1 и МСИ2 (с) статистически значимы ($p < 0,05$), $n = 12$.

ОТСТАВЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ГОЛОДАНИЯ В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Таблица 2. Уровни инсулина и лептина до и после глюкозной нагрузки и индекс инсулиновой резистентности у контрольных крыс и крыс с МС, и влияние на них лечения ИИ

Показатель	К	МС	МСИ1	МСИ2
Инсулин-0, нг/мл	0,54±0,07	0,56±0,06	0,55±0,06	0,41±0,06
Инсулин-120, нг/мл	0,74±0,08	1,38±0,18 ^a	0,97±0,11	0,83±0,09 ^b
Лептин-0, нг/мл	1,05±0,13	2,02±0,27 ^a	1,32±0,19	1,82±0,21 ^a
Лептин-120, нг/мл	1,33±0,12	2,79±0,38 ^a	1,82±0,26	2,46±0,37 ^a
ИР-0, усл. ед.	2,30±0,23	3,07±0,25	2,62±0,24	1,96±0,20 ^{b,c}
ИР-120, усл. ед.	3,82±0,41	9,32±1,27 ^a	5,78±0,79 ^b	4,48±0,35 ^b

Примечание. Различия с контролем (а) и группой МС (б), а также между группами МСИ1 и МСИ2 (с) статистически значимы ($p < 0,05$), $n=12$.

Как правило, при МС у человека и экспериментальных животных повышены как базовый, так и стимулированный глюкозой уровни инсулина, что обусловлено развитием ИР и гиперпродукцией инсулина в отставленные сроки после потребления пищи [26, 27]. Нами не было выявлено различий базового уровня инсулина у контрольных крыс и крыс с МС, хотя индуцированный глюкозой уровень инсулина в группе МС почти в 2 раза превосходил таковой в контроле (табл. 2). Не было обнаружено также значимого повышения индекса ИР, рассчитанного для базовых значений инсулина и глюкозы, в то время как через 120 мин после глюкозной нагрузки индекс ИР в группе МС был в 2,4 раза выше, чем в группе К (табл. 2). Мы полагаем, это может быть обусловлено функциональными изменениями в панкреатических β -клетках, не позволяющими компенсаторно усиливать синтез и секрецию инсулина в условиях снижения чувствительности к инсулину. В пользу такого предположения свидетельствуют данные других авторов об ослаблении инсулин-продуцирующей функции поджелудочной железы при голодании в раннем онтогенезе, которое вызывали либо с помощью фармакологических агентов, либо с использованием бандажа, препятствующего доступу крысят к соскам кормящей самки [8, 25]. Введение крысятам ИИ в постнатальном периоде (P28-P55) приводило к значимому улучшению оцениваемых метаболических и гормональных показателей во взрослом возрасте, в то время как лечение МС крыс с помощью ИИ в зрелом возрасте (P183-P210) в целом было менее эффективным. Так, в группе МСИ1, в отличие от группы МС, масса тела и жировой ткани, уровни триглицеридов, общего холестерина, лептина, глюкозы и стимулированного глюкозой инсулина значимо не отличались от контроля (табл. 1, 2, рис. 1), что может указывать на частичное восстановление этих показателей. Снижался в сравнении с группой МС индекс ИР, рассчитанный с учётом уровней глюкозы и инсулина через 120 мин после инъекции глюкозы в ГТТ (табл. 2). В группе МСИ1 отмечали тенденцию к улучшению оцениваемой по значению AUC_{0-120} толерантности к глюкозе, нарушенной у крыс с МС, но различия между группами МС и МСИ1 не были значимыми ($p=0,11$) (табл. 1). Лечение крыс с МС с помощью ИИ в зрелом возрасте частично восстанавливало уровень общего

холестерина и снижало в сравнении с группой МС уровни глюкозы, инсулина и индекс ИР через 120 мин после глюкозной нагрузки (табл. 1, 2; рис. 1). При этом заметного влияния ИИ в группе МСИ2 на другие показатели, включая толерантность к глюкозе, выявлено не было. Значительное снижение стимулированного глюкозой уровня инсулина и, как следствие, снижение ИР может быть обусловлено ИИ-индуцированным подавлением продукции панкреатического инсулина, что ранее было показано как нами на экспериментальных моделях [28], так и другими авторами в условиях применения ИИ в клинике [29, 30]. Возможной причиной этого может быть вызываемая ИИ нормализация чувствительности к инсулину в периферических тканях, опосредуемая ИИ-индуцированной активацией инсулиновых путей в мозге. Таким образом, использование ИИ в раннем постнатальном периоде в значительной степени предотвращает развитие явных признаков МС в зрелом возрасте, что может быть обусловлено способностью инсулина мозга нормализовать функции ЦНС и центральную регуляцию метаболизма в раннем онтогенезе. Механизмы такого действия ИИ требуют дальнейшего исследования. В то же время, восстанавливающее влияние ИИ в зрелом возрасте на метаболические изменения в организме крыс с МС, вызванным нарушением грудного вскармливания, выражено слабо.

Исследование гормональных показателей гонадной и тиреоидной осей у самцов крыс с МС показало, что уровни тестостерона, fT_4 и tT_3 у них были значимо ниже, чем у контрольных животных (рис. 2). Эти данные согласуются с результатами других авторов о снижении уровней андрогенов и тиреоидных гормонов в крови крыс с МС, вызванным нарушением грудного вскармливания. Так, показано, что дефицит грудного вскармливания, обусловленный большим числом новорожденных самцов-крысят в помёте (20 крысят) вызывал андрогенную недостаточность во взрослом возрасте, в то время как в случае среднего или маленького помётов, включающих 12 и 4 самцов-крысят соответственно, уровень тестостерона у взрослых животных не отличался от такового в контроле [11]. Ингибирование бромкриптином лактации у кормящих самок приводило к снижению уровней fT_4 и tT_3 их потомства в шестимесячном возрасте [13]. В свою очередь, значительное ограничение кормящих

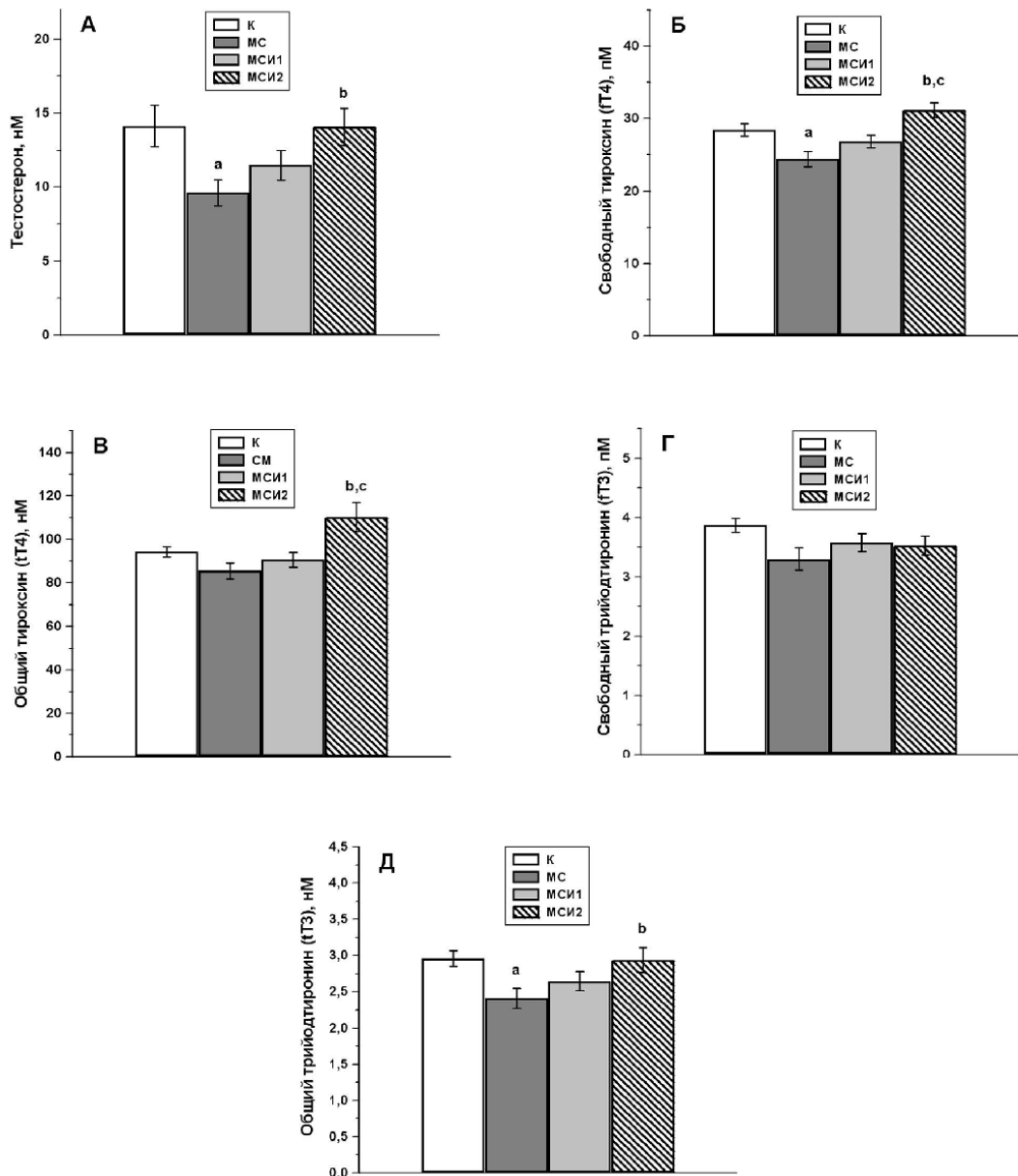


Рисунок 2. Изменение уровней тестостерона и тиреоидных гормонов в крови контрольных крыс и крыс с МС и влияние на них лечения ИИ. Различия с контролем (a) и группой МС (b), а также между группами МСИ1 и МСИ2 (c) статистически значимы ($p < 0,05$), $n=12$.

самок крыс в пищу вызывало снижение уровня fT₄ у их потомства в возрасте 90 и 140 дней [12]. При этом концентрация трийодтиронина в крови животных не отличалась от контроля, что может быть обусловлено повышенной активностью D₂-дейодиназы, превращающей тироксина в трийодтиронин [12].

Обе схемы лечения крыс с МС с помощью ИИ приводили к нормализации уровней этих гормонов, поскольку в группах МСИ1 и МСИ2 они не отличались от таковых в группе К. При этом в группе МСИ2 отмечали повышение уровней тестостерона, fT₄, tT₄ и tT₃ в сравнении с группой МС и повышение обеих форм тироксина в сравнении с группой МСИ1 (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что ИИ, используемый на стадии раннего онтогенеза, сразу после нарушения грудного

вскармливания, в дальнейшем смягчает дефицит тестостерона и тиреоидных гормонов, в то время как введение ИИ в зрелом возрасте существенно стимулирует продукцию андрогенов и тиреоидных гормонов. Ранее стимулирующий эффект ИИ на продукцию тестостерона и тиреоидных гормонов был продемонстрирован нами у крыс со стрептозотоциновым диабетом 1 типа [21, 31].

Причиной снижения уровня тестостерона и тиреоидных гормонов при “неонатальном” МС и их частичного восстановления при лечении ИИ может быть ослабление различных звеньев гипоталамо-гипофизарной оси. Для идентификации возможных нарушений у крыс с МС были проведены тесты с GnRH или TRH, релизинг-факторами гонадотропинов и ТТГ соответственно. Необходимо

отметить, что базовый уровень ЛГ у крыс с МС не отличался от такового в контроле, в то время как базовый уровень ТТГ был повышен (рис. 3, 4). Повышение уровня ТТГ на фоне снижения уровня тиреоидных гормонов может указывать на резистентность тироцитов щитовидной железы к ТТГ и на развитие гипотиреоидного состояния у самцов крыс с “неонатальным” МС. Другие авторы отмечали сходную картину с повышением ТТГ и развитием гипотиреоза у взрослых крыс, рождённых от самок, испытывающих дефицит пищевых ресурсов во время лактации [12].

Однократная обработка интраназально вводимым GnRH через 3 ч приводила к значительному повышению уровней тестостерона во всех группах и повышала уровень ЛГ в группах К и МС. При этом как базальные, так и GnRH-стимулированные уровни тестостерона в группах МСИ1 и МСИ2 не отличались от таковых в контроле, что указывает на частичное восстановление GnRH-стимулированного стероидогенеза в условиях различных схем лечения ИИ крыс с МС (рис. 3). Поскольку соотношение

GnRH-стимулированных уровней ЛГ и тестостерона в группах К и МСИ1 (но не в МСИ2) было на треть ниже, чем в группе МС, то имеются основания полагать, что лечение ИИ в раннем онтогенезе улучшает чувствительность семенников к ЛГ.

Однократная обработка TRH приводила к повышению уровня ТТГ и fT_4 во всех группах, причём в группах МСИ1 и МСИ2 TRH-стимулированный уровень тироксина был достоверно выше, чем в группе МС (рис. 4). В группах МС и МСИ2 в сравнении с группой К было повышено соотношение ТТГ/ fT_4 для базовых ($0,052 \pm 0,05$ и $0,044 \pm 0,06$ vs. $0,021 \pm 0,03$, $p < 0,05$) и TRH-стимулированных ($0,058 \pm 0,06$ и $0,054 \pm 0,07$ vs. $0,031 \pm 0,05$, $p < 0,05$) концентраций гормонов, что указывает на развитие резистентности тироцитов к ТТГ. При этом в группе МСИ1 это соотношение приближалось к таковому в контроле. Эти данные указывает на то, что, как и в случае гонадной оси, чувствительность клеток щитовидной железы к ТТГ, сниженная при МС, повышается у крыс, получавших лечение ИИ

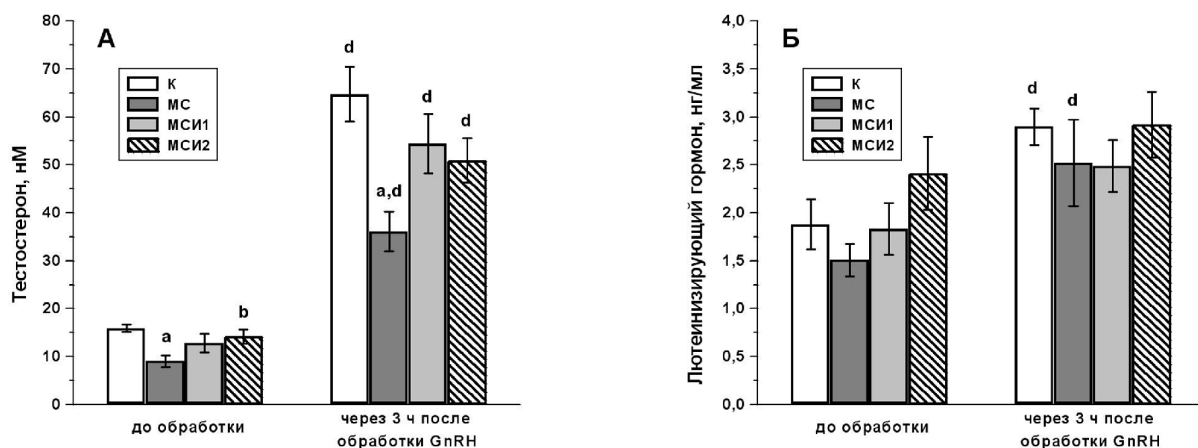


Рисунок 3. Влияние интраназально вводимого гонадолиберина на уровни тестостерона и лютеинизирующего гормона в крови контрольных крыс и крыс с МС и влияние на них лечения ИИ. Различия с контролем (а), с группой МС (b), между группами МСИ1 и МСИ2 (с) и между уровнями гормона до и через 3 ч после обработки крыс гонадолиберин (d) статистически значимы ($p < 0,05$), $n=6$.

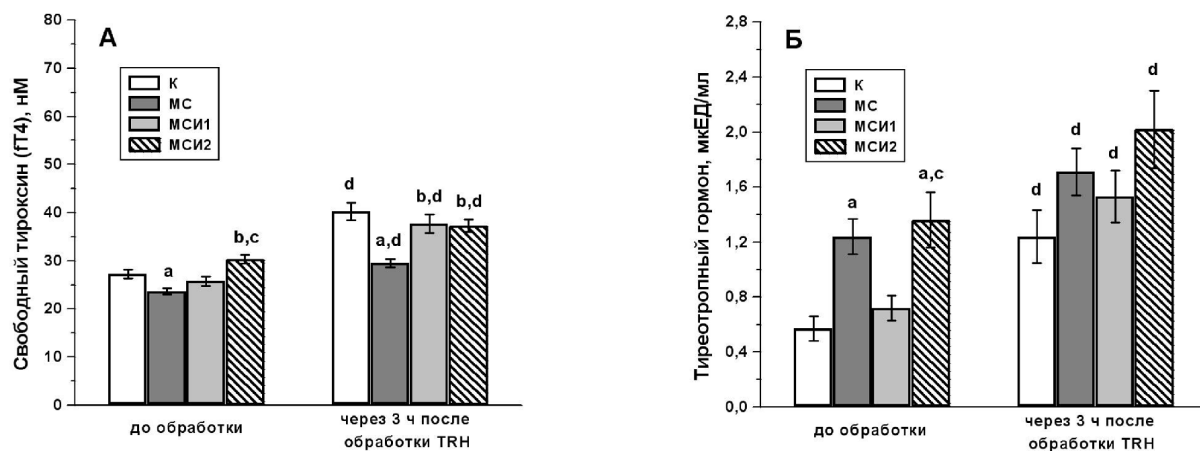


Рисунок 4. Влияние интраназально вводимого тиролиберина на уровни свободного тироксина и тиреотропного гормона в крови контрольных крыс и крыс с МС и влияние на них лечения ИИ. Различия с контролем (а), с группой МС (b), между группами МСИ1 и МСИ2 (с) и между уровнями гормона до и через 3 ч после обработки крыс тиролиберин (d) статистически значимы ($p < 0,05$), $n=6$.

в раннем онтогенезе. Таким образом, если раннее лечение ИИ приводит к нормализации чувствительности к ЛГ и ТТГ, то лечение ИИ в зрелом возрасте вызывает повышение уровня тестостерона и тироксина путём усиления продукции гипофизарных гормонов, но не посредством повышения чувствительности к ним тканей-мишеней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У самцов крыс Wistar, лишённых грудного вскармливания в раннем постнатальном возрасте (P19-P21), в десятимесячном возрасте развиваются такие признаки МС, как ожирение, дислипидемия, нарушенная толерантность к глюкозе, гиперлептинемия, нарушается гормональный статус гонадной и тиреоидной систем. Так, у крыс с МС снижаются уровни тестостерона и тиреоидных гормонов (fT_4 , fT_3) при сохранении уровня ЛГ и повышении уровня ТТГ в крови, а также ослабляется стимулированный GnRH и TRH синтез тестостерона и тироксина соответственно. В основе этого лежит снижение чувствительности семенников к ЛГ и щитовидной железы к ТТГ в условиях МС, запрограммированного ограничением грудного вскармливания. Лечение самцов-крыс в постнатальном периоде, сразу после ограничения грудного вскармливания, снижает массу тела и жировой ткани, улучшает липидный профиль, чувствительность тканей-мишеней к инсулину, лептину, ЛГ и ТТГ, частично восстанавливает уровни тестостерона и тиреоидных гормонов и их стимуляцию GnRH и TRH. Лечение ИИ в зрелом возрасте нормализует уровни тестостерона, тиреоидных гормонов, их стимуляцию релизинг-факторами, но при этом в существенно меньшей степени влияет на метаболические и гормональные показатели и не восстанавливает чувствительность к ЛГ и ТТГ. Полученные данные указывают на широкий спектр метаболических и гормональных нарушений у взрослых самцов крыс с “неонатальной” моделью МС, вызванной временным прекращением грудного вскармливания, и на эффективность различных стратегий их коррекции с помощью ИИ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Определение концентрации гормонов иммуноферментным методом анализа было выполнено с использованием оборудования ЦКП Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФБ РАН).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования России (соглашение № 075-15-2020-916 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития национального центра мирового уровня “Павловский центр”).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры по уходу за животными и их использованию для создания, характеристики и изучения модели МС осуществляли в строгом соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН и нормами гуманного отношения к животным.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith C.J., Ryckman K.K. (2015) Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.*, **8**, 295-302. DOI: 10.2147/DMSO.S61296
2. Picó C., Reis F., Egas C., Mathias P., Matafome P. (2021) Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.*, **51**(5), e13482. DOI: 10.1111/eci.13482
3. Lisboa P.C., Miranda R.A., Souza L.L., Moura E.G. (2021) Can breastfeeding affect the rest of our life? *Neuropharmacology*, **200**, 108821. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2021.108821
4. Badillo-Suárez P.A., Rodríguez-Cruz M., Nieves-Morales X. (2017) Impact of metabolic hormones secreted in human breast milk on nutritional programming in childhood obesity. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.*, **22**(3), 171-191. DOI: 10.1007/s10911-017-9382-y
5. Grote V., Verduci E., Scaglioni S., Vecchi F., Contarini G., Giovannini M., Koletzko B., Agostoni C. (2016) European childhood obesity project. Breast milk composition and infant nutrient intakes during the first 12 months of life. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **70**(2), 250-256. DOI: 10.1038/ejcn.2015.162
6. Leghi G.E., Netting M.J., Lai C.T., Narayanan A., Dymock M., Rea A., Wlodek M.E., Geddes D.T., Muhlhausler B.S. (2021) Reduction in maternal energy intake during lactation decreased maternal body weight and concentrations of leptin, insulin and adiponectin in human milk without affecting milk production, milk macronutrient composition or infant growth. *Nutrients*, **13**(6), 1892. DOI: 10.3390/nu13061892
7. Lima Nda S., de Moura E.G., Passos M.C., Nogueira Neto F.J., Reis A.M., de Oliveira E., Lisboa P.C. (2011) Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. *Br. J. Nutr.*, **105**(9), 1405-1413. DOI: 10.1017/S0007114510005064
8. Francisco F.A., Barella L.F., Silveira S.D.S., Saavedra L.P.J., Prates K.V., Alves V.S., Franco C.C.D.S., Miranda R.A., Ribeiro T.A., Tófolo L.P., Malta A., Vieira E., Palma-Rigo K., Pavanello A., Martins I.P., Moreira V.M., de Oliveira J.C., Mathias P.C.F., Gomes R.M. (2018) Methylglyoxal treatment in lactating mothers leads to type 2 diabetes phenotype in male rat offspring at adulthood. *Eur. J. Nutr.*, **57**(2), 477-486. DOI: 10.1007/s00394-016-1330-x
9. Ding X., Zhao Y., Zhu C.Y., Wu L.P., Wang Y., Peng Z.Y., Deji C., Zhao F.Y., Shi B.Y. (2021) The association between subclinical hypothyroidism and metabolic syndrome: An update meta-analysis of observational studies. *Endocr. J.*, **68**(9), 1043-1056. DOI: 10.1507/endocrj.EJ20-0796

10. Louters M., Pearlman M., Solsrud E., Pearlman A. (2021) Functional hypogonadism among patients with obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Int. J. Impot. Res.*, **2021**, DOI: 10.1038/s41443-021-00496-7
11. Smith J.T., Spencer S.J. (2012) Prewaning over- and underfeeding alters onset of puberty in the rat without affecting kisspeptin. *Biol. Reprod.*, **86**(5), 145, 1-8. DOI: 10.1095/biolreprod.111.097758
12. Ayala-Moreno R., Racotta R., Anguiano B., Aceves C., Quevedo L. (2013) Perinatal undernutrition programmes thyroid function in the adult rat offspring. *Br. J. Nutr.*, **110**(12), 2207-2215. DOI: 10.1017/S0007114513001736
13. Pietrobon C.B., Bertasso I.M., Silva B.S., Peixoto-Silva N., Oliveira E., Moura E.G., Lisboa P.C. (2020) Body adiposity and endocrine profile of female Wistar rats of distinct ages that were early weaned. *Horm. Metab. Res.*, **52**(1), 58-66. DOI: 10.1055/a-0966-8784
14. Souza L.L., de Moura E.G., Lisboa P.C. (2020) Does early weaning shape future endocrine and metabolic disorders? Lessons from animal models. *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **11**(5), 441-451. DOI: 10.1017/S2040174420000410
15. Shpakov A.O., Derkach K.V., Berstein L.M. (2015) Brain signaling systems in the Type 2 diabetes and metabolic syndrome: Promising target to treat and prevent these diseases. *Future Sci. OA*, **1**(3), FSO25. DOI: 10.4155/fso.15.23
16. Scherer T., Sakamoto K., Buettner C. (2021) Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*, **17**(8), 468-483. DOI: 10.1038/s41574-021-00498-x
17. Hu S.H., Jiang T., Yang S.S., Yang Y. (2013) Pioglitazone ameliorates intracerebral insulin resistance and tau-protein hyperphosphorylation in rats with type 2 diabetes. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **121**(4), 220-224. DOI: 10.1055/s-0032-1333277
18. Derkach K., Zakharova I., Zorina I., Bakhtuykov A., Romanova I., Bayunova L., Shpakov A. (2019) The evidence of metabolic-improving effect of metformin in Ay/a mice with genetically-induced melanocortin obesity and the contribution of hypothalamic mechanisms to this effect. *PLoS One*, **14**(3), e0213779. DOI: 10.1371/journal.pone.0213779
19. Hallschmid M. (2021) Intranasal insulin. *J. Neuroendocrinol.*, **33**(4), e12934. DOI: 10.1111/jne.12934
20. Derkach K.V., Bakhtuykov A.A., Romanova I.V., Zorina I.I., Bayunova L.V., Bondareva V.M., Morina I.Yu., Kumar Roy V., Shpakov A.O. (2020) The effect of metformin treatment on the basal and gonadotropin-stimulated steroidogenesis in male rats with type 2 diabetes mellitus. *Andrologia*, **52**(11), e13816. DOI: 10.1111/and.13816
21. Derkach K.V., Bogush I.V., Berstein L.M., Shpakov A.O. (2015) The influence of intranasal insulin on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in normal and diabetic rats. *Horm. Metab. Res.*, **47**(12), 916-924. DOI: 10.1055/s-0035-1547236
22. Strazzullo P., Barbato A., Siani A., Cappuccio F.P., Versiero M., Schiattarella P., Russo O., Avallone S., della Valle E., Farinaro E. (2008) Diagnostic criteria for metabolic syndrome: A comparative analysis in an unselected sample of adult male population. *Metabolism*, **57**(3), 355-361. DOI: 10.1016/j.metabol.2007.10.010
23. Henderson G.C. (2021) Plasma free fatty acid concentration as a modifiable risk factor for metabolic disease. *Nutrients*, **13**(8), 2590. DOI: 10.3390/nu13082590
24. Lima Nda S., Franco J.G., Peixoto-Silva N., Maia L.A., Kaezer A., Felzenszwalb I., de Oliveira E., de Moura E.G., Lisboa P.C. (2014) *Ilex paraguariensis* (yerba mate) improves endocrine and metabolic disorders in obese rats primed by early weaning. *Eur. J. Nutr.*, **53**(1), 73-82. DOI: 10.1007/s00394-013-0500-3
25. Pietrobon C.B., Miranda R.A., Bertasso I.M., Mathias P.C.F., Bonfleur M.L., Balbo S.L., Reis M.A.B., Latorraca M.Q., Arantes V.C., de Oliveira E., Lisboa P.C., de Moura E.G. (2020) Early weaning induces short- and long-term effects on pancreatic islets in Wistar rats of both sexes. *J. Physiol.*, **598**(3), 489-502. DOI: 10.1113/JP278833
26. Huang P.L. (2009) A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis. Model. Mech.*, **2**(5-6), 231-237. DOI: 10.1242/dmm.001180
27. Virgen-Carrillo C.A., de Los Ríos D.L.H., Torres K.R., Moreno A.G.M. (2021) Diagnostic criteria for metabolic syndrome in diet-induced rodent models: A systematic review. *Curr. Diabetes Rev.*, **17**(8), e140421192834. DOI: 10.2174/1573399817666210414103730
28. Derkach K.V., Ivantsov A.O., Chistyakova O.V., Sukhov I.B., Buzanakov D.M., Kulikova A.A., Shpakov A.O. (2017) Intranasal insulin restores metabolic parameters and insulin sensitivity in rats with metabolic syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **163**(2), 184-189. DOI: 10.1007/s10517-017-3762-6
29. Benedict C., Brede S., Schiöth H.B., Lehnert H., Schultes B., Born J., Hallschmid M. (2011) Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes*, **60**(1), 114-118. DOI: 10.2337/db10-0329
30. Ott V., Lehnert H., Staub J., Wönne K., Born J., Hallschmid M. (2015) Central nervous insulin administration does not potentiate the acute glucoregulatory impact of concurrent mild hyperinsulinemia. *Diabetes*, **64**(3), 760-765. DOI: 10.2337/db14-0931
31. Derkach K.V., Bondareva V.M., Shpakov A.O. (2019) Regulatory effects of intranasal C-peptide and insulin on thyroid and androgenic status of male rats with moderate type 1 diabetes mellitus. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **55**(6), 493-496. DOI: 10.1134/S0022093019060073

Поступила в редакцию: 15. 04. 2022.
После доработки: 28. 06. 2022.
Принята к печати: 01. 07. 2022.

INFLUENCE OF INTRANASALLY ADMINISTERED INSULIN ON METABOLIC AND HORMONAL PARAMETERS IN ADULT MALE RATS, IMPAIRED DUE TO THREE-DAY FASTING IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD

K.V. Derkach^{1,}, V.M. Bondareva¹, A.O. Shpakov^{1,2}*

¹Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, 44 Thorez ave., Saint-Petersburg, 194223, Russia; *e-mail: derkach_k@list.ru

²Faculty of Medicine, Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya emb., Saint-Petersburg, 199034 Russia

Temporary cessation or restriction of breastfeeding can lead to metabolic disorders in adulthood. However, data on the effect of fasting in the early postnatal period on the functions of the endocrine system in adulthood are rare and contradictory. Approaches for the correction of metabolic and hormonal disorders caused by premature cessation of breastfeeding have not been developed yet. The aim of the work was to study the metabolic and hormonal parameters and changes in the hormonal status of the gonadal and thyroid systems in 10-month-old male rats with interruption of breastfeeding on days P19-P21, as well as to evaluate the restorative effect on them of four weeks of treatment with intranasal insulin (II) administered in the postnatal period (P28-P55) or in adulthood (P183-P210). Lactation interruption has been induced by treatment of lactating females with bromocriptine (10 mg/day/rat, P19-P21). Male rats with temporary cessation of breastfeeding developed characteristic signs of the metabolic syndrome (obesity, dyslipidemia, impaired glucose tolerance, hyperleptinemia), decreased levels of testosterone and thyroid hormones (fT₄, tT₃) and weakened the synthesis of testosterone and thyroxine, stimulated respectively by GnRH and thyroliberin. This was due to a decrease in the sensitivity of the testes to luteinizing hormone (LH) and the thyroid gland to thyroid-stimulating hormone (TSH). Treatment with II in early ontogenesis reduced body weight and fat, improved lipid profile, sensitivity to insulin, leptin, LH and TSH, restored the levels of testosterone and thyroid hormones and their stimulation by releasing factors. Treatment with II in adulthood normalized the levels of testosterone, thyroid hormones, their stimulation by releasing factors, but had a little effect on metabolic and hormonal parameters. The obtained data point to a wide range of metabolic and hormonal disorders in adult male rats with the “neonatal” model of metabolic syndrome and to the effectiveness of various strategies for their correction using long-term II treatment.

Key words: lactation; metabolic syndrome; intranasally administered insulin; testosterone; thyroid-stimulating hormone; thyroid hormone; hyperleptinemia

Funding. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement with the world-class research center “Pavlov Center” no. 075-15-2020-916).

Received: 15.04.2022; revised: 28.06.2022; accepted: 01.07.2022.