

УДК 616.379-008.64:577.17154.

©Коллектив авторов

ГОРМОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СДВИГИ ПРИ ВОЗНИКНОВЕНИИ ДИАБЕТИЧЕСКИХ АНГИОПАТИЙ

Л.В.ТАТЬЯНЕНКО, Г.И.ШАПОШНИКОВА, Т.С.ГУЛЕВСКАЯ, Л.Д.СМИРНОВ

Институт химической физики РАН, п.Черноголовка, Московская область.

Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ, п.Купавна,
Московская область.

Научно-исследовательский институт неврологии РАМН, г.Москва.

Изучены биохимические, морфологические, электронномикроскопические показатели в сыворотке крови, печени, аорте, сосудах головного мозга, хрусталиках глаз интактных и экспериментальных животных в процессе формирования экспериментального сахарного диабета, вызванного введением L-адреналина на фоне атерогенной нагрузки.

По всем без исключения данным, полученным в наших экспериментах (липидному обмену, ПОЛ, сорбитоловому пути расщепления глюкозы, уровню глюкозы и инсулина), показана полная аналогия биохимических сдвигов тем изменениям, которые характерны для сахарного диабета.

Морфологические и электронномикроскопические данные свидетельствуют о том, что наряду с нарушениями липидного обмена, характерного для сахарного диабета, наблюдаются изменения микроциркуляторного русла, являющиеся причиной возникновения осложнений сахарного диабета.

Результаты работы подтверждают правильность гормонально-метаболической гипотезы возникновения осложнений сахарного диабета, а также - известные причины патогенеза сахарного диабета и его осложнений, связанные как с нарушениями норм питания (атерогенная нагрузка), так и со стрессовым фактором (повышение содержания адреналина).

Ключевые слова: диабетические ангиопатии, сорбитоловый путь обмена глюкозы, экспериментальный сахарный диабет.

ВВЕДЕНИЕ. Согласно существующим представлениям, в основе патогенеза диабетических ангиопатий, которыми сопровождаются осложнения сахарного диабета (нефропатии, нейропатии, катаракты и др.), лежат процессы атеросклероза, гипергликемия, а также различные гормонально-метаболические нарушения [1,2].

Известно, что у больных с инсулинзависимым сахарным диабетом (СД) уже на ранних стадиях болезни наблюдается гиперлиппротеидемия (ГЛП), чаще на фоне декомпенсации углеводного обмена [3]. При этом в сыворотке крови повышается уровень холестерина, общих липидов, липопротеидов низкой и очень низкой плотности, снижается уровень липопротеидов высокой плотности [4]. Эти нарушения липидного обмена характерны, в частности как для клинического, так и для экспериментального СД, и рассматриваются как факторы риска при атеросклеротических осложнениях [5].

Многочисленными работами показано, что нарушения кислородно-транспортной функции крови, вызывающие гипоксию, тесно связаны с ГЛП при СД [6,7]. Однако, причины и механизм развития функциональных и последующих морфологических

нарушений в системе стенка сосудов - кровь остаются предметами будущих исследований. Накапливается все больше данных в пользу того, что пусковым и, по-видимому, ведущим патобиологическим фактором служит гипергликемия, с которой связана активация полиольного шунта расщепления глюкозы в эндотелии и базальной мембране. При этом наблюдается резкое увеличение активности альдозоредуктазы (АР) и ингибирование функции сорбитолдегидрогеназы (СДГ) [8].

Повышение активности АР приводит к интенсивному превращению глюкозы в сорбитол, его накоплению в сосудистых стенках с последующим развитием дегенеративно-склеротических изменений микрососудов [9].

Известно также, что диабетический эффект катехоламинов при различных методах их введения сопровождается подавлением секреции инсулина β -клетками через стимуляцию α -рецепторов [10,11]. Кроме того, в жировой ткани под действием адреналина повышается скорость липолиза с образованием свободных жирных кислот, которые становятся главным источником энергии для жировой ткани и мышц, где утилизация глюкозы снижена из-за уменьшения активности инсулина или его недостаточности [12].

В целом, пусковые биохимические факторы возникновения и развития осложнений сахарного диабета включают комплекс специфических гормонально-метаболических нарушений, ведущих к морфологическим изменениям в структуре базальной мембраны капилляров.

Целью настоящего исследования является изучение биохимических и морфологических показателей у животных в процессе формирования экспериментального сахарного диабета, вызванного введением L-адреналина на фоне атерогенной нагрузки.

МЕТОДИКА. Гиперлипидемию индуцировали у беспородных крыс самцов массой 220-250 г. атерогенным рационом, содержащим в масляной суспензии 10% холестерина и 1% холевой кислоты (из расчета 0,5 г. холестерина на кг массы веса) в течение четырех месяцев. После этого в течение семи суток проводили внутривенные инъекции L-адреналина в дозе 0,25 мг/кг.

Анализ крови и органов экспериментальных животных проводили после декапитации с предварительным 16-18 часовым голоданием.

Индуцированную гиперлипидемию и влияние L-адреналина анализировали, изучая различные биохимические показатели липидного обмена в сыворотке крови, печени и стенке аорты.

Содержание холестерина (ХС) в сыворотке крови определяли методом Илька [13]. Холестерины липопротеидов высокой плотности (ЛПЛВ) определяли в супернатанте после гепарин-марганцевой преципитации липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) [14].

Холестериновый индекс атерогенности (К) рассчитывали, как описано в работе А.Н. Климова [15].

Уровень триглицеридов (ТГ) в сыворотке оценивали общепринятым методом [16].

Содержание ХС в печени и аорте определяли модифицированным методом [17].

Анализ липидного состава печени и аорты осуществляли методом тонкослойной хроматографии, проводя предварительную экстракцию липидов методом Фолча [17]. Содержание малонового диальдегида (МДА) в печени оценивали по методу [18].

Концентрацию инсулина в крови определяли радиоиммунологическим методом при помощи стандартных наборов для определения инсулина (РИО-ИНС-1-М).

Активность альдозоредуктазы (АР), сорбитолдегидрогеназы (СДГ) и концентрацию сорбитола определяли в хрусталиках глаз и стенке аорты экспериментальных животных по методам [19, 20, 21].

Для исследования рельефа поверхности аорты крыс использовали метод сканирующей электронной микроскопии. С целью объективизации обнаруженных тенденций перестройки отдельных эндотелиоцитов и подэндотелиального слоя были выбраны следующие морфологические показатели: удельный объем микропиноцитозных везикул, митохондрий и гранулярной эндоплазматической сети, толщина подэндотелиального слоя, степень адгезии моноцитов к эндотелию.

Определение средней толщины подэндотелиального слоя проводили путем прямого измерения на электронограммах. Для исследования использовали ультратонкие срезы, перпендикулярные оси сосуда. Степень адгезии моноцитов определяли (с негативов сканирующей электронной микроскопии) как отношение числа прикрепленных к эндотелию лейкоцитов к площади внутренней поверхности аорты. Оценку достоверности различий проводили общепринятым методом с использованием пакета статистических программ BMSP.

Для выявления механизмов развития и прогрессирования изменений в сосудах мозга - церебрального атеросклероза - и для формирования концепции атеросклеротической ангиопатии головного мозга было проведено изучение ранних морфологических проявлений церебрального атеросклероза на уровне клеточных элементов артериальной стенки и клеток крови электронномикроскопическим методом.

Сосудистая система головного мозга была изучена на наиболее важных в функциональном отношении уровнях: магистральных артериях головы, сосудах основания мозга, сосудах поверхности мозга, интрацеребральных сосудах, микроциркуляторном русле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Воздействие атерогенной жировой смеси в течение четырех месяцев вызвало увеличение содержания общего холестерина в сыворотке крови крыс, причем наблюдаемая гиперхолестеринемия развилась за счет повышения уровня холестерина в составе атерогенной фракции ЛПОНП на фоне снижения содержания антиатерогенной фракции липипротейдов - ЛПВП (табл.1). Атерогенная нагрузка сопровождалась выраженной гипертриглицеридемией. При исследовании липидного состава печени проявился наиболее существенный признак гиперхолестеринемии - увеличение содержания сложных эфиров холестерина (табл.2). Аналогичные результаты получены при введении крысам L-адреналина на фоне гиперлипидемии (табл.1,2). При этом наблюдалось увеличение концентрации глюкозы и снижение уровня инсулина в сыворотке крови крыс (табл.1).

Наряду с указанными нарушениями липидного гомеостаза наблюдалась интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ). Так, содержание конечного продукта ПОЛ - малонового диальдегида - в печени в 2 раза превышало аналогичный показатель контрольной группы (табл.2). В стенке аорты при атерогенной нагрузке снижалось относительное содержание фосфолипидной фракции и свободных жирных кислот и наблюдалось повышение содержания эстерифицированной формы холестерина (табл.3). При внутривенном введении L-адреналина (в дозе 0,2 мг/мл) животным с экспериментальной гиперлипидемией сохранялась выраженность нарушений липидного обмена в сыворотке крови, печени и стенках аорты (табл.1-3).

Кроме того, наблюдалась активация функции АР и ингибирование - СДГ, выделенных из хрусталиков и аорт крыс, после введения L-адреналина на фоне экспериментальной гиперлипидемии. При этом обнаружено увеличение количества сорбитола в стенках аорт и хрусталиках глаз у опытных животных (табл.4). Введение антиоксиданта пробукола вызывает снижение активности АР, увеличение функции СДГ и уменьшение количества сорбитола в сосудах и тканях глаз экспериментальных животных (табл.4).

Таблица 1. Содержание холестерина, глюкозы и инсулина в сыворотке крови крыс, после введения L-адреналина на фоне атерогенной диеты (АД).

Показатели	Единицы измерения	Интактные животные	Атерогенная диета (АД)	АД + L-адреналин
ХС общий	мг/100 м	92,1±3	101,3±2,7* p<0,05	98,3±4,2
ХС-ЛПВП	" - "	57,1±2,3	49,4±2,0* p<0,05	47,2±3,0* p<0,05
ХС-ЛПНП	" - "	24,9±6,5	23,6±8,3	27,3±1,4
ХС-ЛПОНП	" - "	16,8±0,8	30,4±4,0* p<0,04	27,7±1,9*
ТГ	" - "	84,0±3,2	152,0±12,9* p<0,01	138,5±17,9* p<0,001
К хс	Условные единицы	0,65±0,10	1,08±0,12* p<0,01	1,12±0,13* p<0,01
Глюкоза	ммоль/л	5,7±0,6	6,3±0,8	14,5±1,3* p<0,001
Инсулин	мк ЕД в мл	34,1±2,9	30,2±3,1	25,4±2,5* p<0,05

* - достоверность различий от данных контрольной группы (интактных) животных, (n=7), (m±m).

Таблица 2. Показатели липидного состава и содержания продуктов перекисного окисления липидов печени крыс после введения L-адреналина на фоне экспериментальной гиперлипидемии

Показатели	Единицы измерения	Интактные животные	Атерогенная диета	АД+L-адреналин
Общий холестерин	мг/г ткани	3,14±0,19	16,41±3,3* p<0,01	21,58±3,35* p<0,001
Свободный холестерин	%	27,3±1,2	19,1±1,2* p<0,001	28,2±2,2
Эфиры холестерина	%	8,0±0,9	21,7±3,7* p<0,001	15,5±1,7* p<0,01
МДА	нмоль/мг ткани	3,27±0,27	6,67±0,33* p<0,001	7,33±0,49* p<0,001

* - достоверность различий от данных контрольной группы (интактных) животных; (m+m), (n=7).

Таблица 3. Показатели липидного состава аорты крыс, после введения L-адреналина на фоне экспериментальной гиперлипидемии.

Показатели	Единицы измерения	Интактные животные	Атерогенная диета	АД+L-адреналин
Фосфолипиды	%	13,2±1,5	8,6±3* p<0,05	6,3±0,7* p<0,05
НЭЖК	%	6,6±0,9	3,4±0,3* p<0,01	3,2±0,4* p<0,01
Эфиры холестерина	%	4,8±0,6	9,7±0,7* p<0,01	9,6±0,6* p<0,01

* - достоверность различий от данных контрольной (интактной) группы животных; (m+m), (n=8).

НЭЖК - незэтерифицированные жирные кислоты.

Таблица 4. Активность АР, СДГ и концентрация сорбитола в хрусталиках глаз и аортах контрольных (интактных) и экспериментальных животных (после введения L-адреналина) на фоне экспериментальной гиперлипидемии.

Показатели	Единицы измерения	Органы	Интактные животные	Атерогенная диета	АД+L-адреналин	АД+L-адреналин+пробукол
Активность	нмоли	X	1,77±0,2	1,81±0,18	2,39±0,23*	1,86±0,19
АР	НАДФН на мг белка в мин инкуб.	A	29,3±3	36,3±4,1	48,9±5,1*	31,9±3,2
Активность	нмоли	X	1,83±0,2	1,72±0,17	1,02±1,12*	1,65±0,17
СДГ	НАДН на мг белка в мин инкуб.	A	9,79±0,97	8,42±0,85	3,23±0,33*	8,12±0,82
Концентрация сорби тола	Мкмоль	X	7,33±1,1	8,12±0,81	28,3±2,3*	10,32±1,1
	на грамм ткани	A	12,7±1,3	12,1±1,2	88,9±8,7*	12,9±1,1

X - хрусталики глаз; A - аорты.

* - достоверность различий от данных контрольной группы (интактных) животных ($p < 0,01$); (m+m), (n=9).

Таким образом, по всем без исключения данным, полученным в наших экспериментах, - липидному обмену, ПОЛ, сорбитоловому пути расщепления глюкозы, уровню глюкозы и инсулина в сыворотке крови и аналогичным показателям в печени, стенке аорты, хрусталиках глаз можно сделать вывод о полной аналогии биохимических сдвигов, полученных после атерогенной нагрузки и введения животным L-адреналина, тем изменениям, которые характерны для сахарного диабета.

Морфологические исследования показали, что одновременно с биохимическими сдвигами наблюдались выраженные сосудистые изменения во всех элементах микроциркуляторного русла: констрикция артериол, извитость венул, появление обширных внутрисосудистых агрегатов.

При оценке морфологических изменений стенки аорты (табл.5) отмечались изменения рельефа внутренней поверхности: ядродержащие зоны значительно выбухали в просвет сосуда, возрастало количество микроворсинок на поверхности эндотелиоцитов, наблюдалась адгезия моноцитов в области межклеточных контактов и их миграция под эндотелий. На ультратонких срезах количество микровезикул было меньше, чем в контроле, встречались короткие профили гранулярного эндоплазматического ретикулума. Отмечалось повышенное содержание вторичных лизосом, базальная мембрана отличалась резкой утолщенностью и слоистостью. В подэндотелиальном пространстве встречались моноциты, наблюдалось проникновение отростков и иногда тел гладкомышечных клеток средней оболочки во внутреннюю. Субэндотелиальные клетки были окружены коллагеновыми волокнами.

Электронномикроскопические исследования сосудов головного мозга показали, что к четвертому месяцу атерогенной нагрузки с последующим введением L-адреналина появляются начальные изменения в церебральных артериях разного уровня и калибра: магистральных артериях головы, сосудах основания и поверхности мозга, внутримозговой сосудисто-капиллярной сети.

Таблица 5. Изменение морфологических показателей эндотелия и подэндотелиального слоя аорты крыс, после введения L-адреналина на фоне экспериментальной гиперлипидемии.

Показатели	Интактные животные	Атерогенная диета	АД+L-адреналин
Толщина п/э слоя мкм	0,870±0,022	2,514±0,253*	2,27±0,020*
Уд. объем микровезикул	2,696±0,115	2,701±0,599	2,436±0,469
Уд. объем митохондрий	0,320±0,001	0,442±0,005*	0,581±0,001*

* - $p < 0,005$ - достоверность различий от данных контрольной группы интактных животных; (m+m), (n=8).

При электронной микроскопии участка внутренней сонной артерии в области мышечно-эластического утолщения интимы выявлено скопление тромбоцитов и их агрегация в месте перехода утолщения интимы в обычный участок сосуда, отсутствие эндотелия на небольшом протяжении и отслоение утолщения от интимы. Появление в условиях гиперхолестеринемии начальных изменений в магистральных артериях головы в месте расположения интимальных утолщений вызывает скопление тромбоцитов, выделяющих фактор, ведущий к пролиферации гладкомышечных клеток, что может служить предпосылкой для формирования атеросклеротических бляшек. В средней мозговой артерии крыс обнаружено скопление липидных капель в просвете сосудов в области подушек ветвления с проникновением их под эндотелий и между гладкомышечными клетками. В артериях поверхности мозга и внутримозговых артериях обнаружено увеличение количества везикул и липидных капель в эндотелии, субэндотелиальном слое и гладкомышечных клетках. Электронномикроскопическое исследование показало, что на уровне сосудов микроциркуляторного русла выявлялись сложные внутриклеточные изменения в эндотелиоцитах и ножках астроцитов. В просвете мозговых капилляров отмечалась гиперплазия эндоплазматической сети и пластинчатого комплекса, скопление рибосом.

Изменения эндотелиоцитов сопровождалась деформацией клеток, прилипанием к ним эритроцитов. В ножках астроцитов, прилежащих к капиллярам, наблюдалось скопление липидных вакуолей, фагосом. Скопление большого числа липидных капель отмечено в перicyтах. Эти данные свидетельствуют о проницаемости эндотелия капилляров для липидов и указывают на то, что липиды могут путем диффузии проходить через гематоэнцефалический барьер. Из этого следует, что начальные изменения при гиперхолестеринемии развиваются во внутримозговом микроциркуляторном русле.

Полученные результаты полностью согласуются с литературными данными, из которых известно, что поражение крупных сосудов и капиллярной сети - одно из ведущих проявлений ОСД [22,23].

Таким образом, полученные нами биохимические, морфологические и электронномикроскопические данные свидетельствуют о том, что при экспериментальной гиперлипидемии с последующим введением адреналина, наряду с нарушениями липидного обмена, характерного для СД, наблюдаются изменения микроциркуляторного русла, являющиеся причиной возникновения ОСД.

Результаты настоящей работы подтверждают известные причины патогенеза СД и его осложнений, связанные как с нарушениями норм питания (атерогенная нагрузка), так и со стрессовым фактором (повышенное содержание адреналина).

ВЫВОДЫ. 1. Наблюдается полная аналогия биохимических сдвигов (липидный обмен, ПОЛ, сорбитоловый путь расщепления глюкозы, изменения уровня инсулина и глюкозы) в сыворотке крови крыс, печени, стенке аорты и хрусталиках глаз после атерогенной нагрузки и введения животным L-адреналина, с теми изменениями, которые характерны для сахарного диабета.

2. Морфологические исследования выявили выраженные сосудистые изменения во всех элементах микроциркуляторного русла после введения L-адреналина на фоне экспериментальной гиперлипидемии.

3. Электронномикроскопические исследования показали, что при гиперхолестеринемии, вызванной атерогенной нагрузкой с последующим введением L-адреналина, развиваются сложные внутриклеточные изменения в эндотелиоцитах и ножках астроцитов микроциркуляторного русла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Экспериментальный сахарный диабет. -(1981).- (Под ред. В.Г.Баранова.- Л.- Медицина.311-342.
2. *Лейтес С.М.* (1972)-Терапевт. архив.- **44**, 6-23.
3. *Славина Л.С., Романовская Т.А., Касторджан И.Г.* (1983).Проблемы эндокринологии.-**29**, 17-21.
4. *Галенок В.А., Диккер В.Е., Храмов Ю.Н.* (1978).- Терапевт. архив.- **50** (11). 52-56.
5. *Гацко Г.Г., Гулько В.В.* (1992)-Проблемы эндокринологии.- **32**, 50-53.
6. *Taylor K.* (1978).-Diabetes and the Heart.-London, pp.153-158.
7. *Ефимов А.С.* Диабетические ангиопатии.-М.,1987.
8. *Gabbay K.H.* (1973).-New.Engl.J.Med.- **288**.-831-836.
9. *Gabbay K.H.* (1975).-Ann.Rev.Med.- **21**.-521-526.
10. *Зефирова Г.С.* (1977) Терапевт. архив.- **49** (5). 11-16.
11. *Колесниченко Л.С., Кулинский В.И., Ясько М.В.* (1994) Проблемы эндокринол.- № 3.- 42-44.
12. *Леонтьева Г.В.* (1978) Проблемы эндокринологии.- № 3. 95-99.
13. Биохимические методы исследования в клинике./Под ред.А.А.Покровского.М.- Медицина.-(1969).-с.300-302.
14. *Титов В.Н., Бренер Е.Д., Халтаев Н.Г.* (1979) Лаб.дело.- -№1- 36-41
15. *Климов А.Н.* (1977).-Превентивная кардиология./ Под ред.Г.И.Косицкого.- М., 260-231.
16. *Родионова Л.П.* (1980).-Лаб.дело.- № 5.- 297-299.
17. *Кейтс М.* (1975).-Техника липидологии.-М.-Мир.- 74-76.
18. *Стальная И.Д.* (1977) Современные методы в биохимии.-М. 63-68.
19. *Hyman S., Lou M.F., Merola L.O., Kinoshita J.* (1966). Biochem.Biophys. Acta.- **128**.- 474-478.
20. *Hest H.* (1976). Diabetologia.- **12**.-43-46.
21. *Bergmeyer H.U., Gruber W., Gutmann J.* (1974).- Method of Enzymatic Analysis.-N.Y.- Academic. Press.- 1323-1326.
22. *Серов В.В.* (1972).-Архив патологий.- № 2.-15-25.
23. *Буглак Н.И., Ефимов А.С., Славнов В.Н.* Терапевт.ч.архив.-(1972).- № 7.-32-34.

THE HORMONE - METABOLIC CHANGES IN THE DIABETIC ANGIOPATHY

L.V. TATYANENKO, G.Y. SHAPOSHNIKOVA, T.S. GULEVSKAYA, L.D. SMIRNOV.

Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences.
Chernogolovka, Moscow Region.

Russian Research Center for Security of Biologically Active Compounds
Moscow Region, Kupavna

Research Institute for Neurology, Russian Academy of Medical Sciences

Biochemical, morphological and electron-microscopic readings of blood serum, liver, aorta and brain vessels, and in crystalline lens were investigated in intact and experimental animals during the process of experimental diabetes mellitus formation. The experimental diabetes mellitus was induced by L-adrenaline implementation and atherogenous load. Characteristics of lipid metabolism, peroxide lipid oxidation, sorbitol way of glucose metabolism, glucose and insulin levels conform to diabetes mellitus. Diabetic lipid metabolism impairments were accompanied with changes in microcirculation - a cause of diabetes mellitus complications. These data were supported by morphological and electron-microscopic readings. The results of the study confirm the hormone hypothesis of diabetic complications and stress (high adrenaline level) factors of Diabetes Mellitus pathogenesis.

Key words: diabetic angiopathy, sorbitol pathway of glucose metabolism, experimental model of Diabetes Mellitus.