

КОРРЕКЦИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ НЕЙРОПАТИЙ С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ АЛЬДОЗОРЕДУКТАЗЫ И ПИКАМИЛОНА

Т.М. КУЧМЕРОВСКАЯ, П.К. ПАРХОМЕЦ, Г.В. ДОНЧЕНКО,
И.Г. ОБРОСОВА, А.П. КЛИМЕНКО, Н.А. КУЧМЕРОВСКИЙ,
Л.В. ПАКИРБАЕВА, А.С. ЕФИМОВ.

Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев

Стрептозотоциновый диабет у крыс сопровождается развитием различных диабетических осложнений, в том числе диабетических нейропатий. Показано, что ингибиторы альдозоредуктазы (AL-1576 и сорбинил) приводят к частичному уменьшению высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ серотонина и $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ ГАМК из предварительно нагруженных медиаторами синапсом, которое при диабете заметно увеличено. Пикамилон оказывает нормализующее действие на высвобождение ГАМК. Введение ингибиторов альдозоредуктазы и пикамилона оказывает нормализующее действие на Na^+, K^+ -АТФазу и уровень сорбитола в мозге и периферических нервах, причем ингибиторы более эффективны. Полученные результаты подтверждают важную роль пикамилона и ингибиторов альдозоредуктазы в предупреждении и лечении диабетических нейропатий.

Ключевые слова: Диабетические нейропатии, ингибиторы альдозоредуктазы, синапсосомы.

ВВЕДЕНИЕ. Предупреждение и лечение сахарного диабета и его осложнений является одной из актуальных проблем современной медицины. Согласно современным представлениям [1,2], одним из механизмов патогенеза хронических диабетических осложнений является переключение потока глюкозы с метаболических процессов, чувствительных к инсулину, на такие, интенсивность которых не зависит от концентрации данного гормона в крови [3]. Среди них ключевая роль принадлежит полиоловому пути обмена глюкозы, включающему две дегидрогеназные реакции: на первом этапе альдозоредуктаза (КФ 1.1.1.21) катализирует стереоспецифический перенос водорода от NADPH на альдоформу глюкозы с образованием сорбитола, на втором - сорбитолдегидрогеназа (КФ 1.1.1.14) использует NAD для окисления сорбитола во фруктозу [1]. При усилении полиолового пути обмена глюкозы происходит внутриклеточная аккумуляция сорбитола - вещества с резко выраженными гидрофильными свойствами. Так, накопление сорбитола в волокнах и эпителии хрусталика при экспериментальном диабете сопровождается их гидратацией и изменением проницаемости мембран, усилением поступления в хрусталик ионов Na^+ и снижением внутриклеточного соотношения Na^+/K^+ , уменьшением уровней восстановленного глутатиона, миоинозитола, АТФ и свободных аминокислот [4]. Важная роль в аккумуляции сорбитола в свободно проницаемых для глюкозы тканях при диабете принадлежит изменению редокс-состояния свободных никотинамидных коферментов [8]. В патогенезе диабетических полинейропатий существенная роль принадлежит накоплению сорбитола в клетках Шванна периферических нервов с последующим осмотическим набуханием нервных волокон, уменьшением уровня миоинозитола и скорости проведения возбуждения [5-7].

Однако, биохимические механизмы, лежащие в основе дисфункций нервной системы при сахарном диабете в настоящее время изучены недостаточно. В ряде работ показано изменение содержания моноаминов и их метаболитов [9, 10], а также гипофункция серотонинэргической системы в разных отделах головного мозга животных с экспериментальным диабетом [11]. Известно, что частота возникновения ряда невропсихиатрических отклонений особенно увеличена у больных сахарным диабетом [12].

Ранее нами показано, что физиологическое значение специфического связывания NAD синаптическими мембранами заключается в модуляции процессов высвобождения ряда медиаторов из синапсом коры головного мозга крыс [13]. Нами установлено, что на фоне сниженного уровня NAD в мозге при диабете связывание его синаптическими мембранами значительно увеличено [14].

На основании вышесказанного можно предположить, что действие NAD на поверхность нейрональной мембраны, возможно, взаимосвязано с функционированием ключевого фермента клеток - Na^+, K^+ -АТФазы.

Целью данной работы явилось изучение роли Na^+, K^+ -АТФазы в процессах нейротрансмиссии в головном мозге и в функционировании полиолового пути обмена глюкозы стрептозотоциновым диабетом у крыс, а также выяснение возможного корректирующего действия ингибиторов альдозоредуктазы и пикамилон на эти процессы.

МЕТОДИКА. В опытах использовали крыс-самцов линии Вистар массой 120-160 г. Диабет вызывали однократной внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (Sigma, 70 мг/кг массы тела). Животные были разделены на пять групп: контрольную, и четыре группы со стрептозотоциновым диабетом, три из которых получали либо пикамилон (никотиноил-ГАМК, 200 мг/кг массы тела в сутки, внутримышечно, в течение 14 дней), либо ингибиторы альдозоредуктазы: (спиро-2,7 -дифлуорофлюорен-9,4'-имидазолидин)-2',5'-дион, AL-1576, 4 мг/кг массы тела в сутки *per os* на протяжении 14 дней или сорбинил (Pfizer, США) в дозе 20 мг/кг при таких же условиях. Крыс с уровнем глюкозы крови выше 250 мг% брали в эксперимент через месяц после индукции диабета. Корм и воду животные получали *ad libitum*. Субклеточные фракции мозга получали по методу Abita et al. [15]. Чистоту и морфологическую целостность синапсом коры головного мозга крыс контролировали посредством электронной микроскопии [16], а определение активности маркерных ферментов: лактатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, АТФазы, глюкозо-6-фосфатазы и кислой фосфатазы проводили как описано в работе [17].

Высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ серотонина (57 мКи/ммоль) и 4-амино- $n[^{14}\text{C}]$ ГАМК (228 мКи/ммоль) в динамике из предварительно нагруженных ими синапсом изучали согласно ранее описанной методике [14]. Активность Na^+, K^+ -АТФазы определяли в синапсом, синаптических мембранах и гомогенатах седалищного нерва [18]. Мозг и седалищный нерв извлекали немедленно после диссекции и замораживали в жидком азоте. В депротеинизированных экстрактах определяли содержание сорбитола [19]. Седалищный нерв использовали как тестовую ткань для оценки эффективности ингибирования полиолового пути обмена глюкозы ингибиторами альдозоредуктазы, поскольку его метаболиты при диабете накапливаются в больших количествах. Содержание белка определяли по Lowry et al. [20]. Статистический анализ полученных данных проводили, используя стандартный критерий *t* Стьюдента для некоррелированных выборок [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При изучении процессов нейротрансмиссии при диабете нами обнаружены существенные изменения в функционировании серотонин- и ГАМК-эргической систем [14]. Изучение динамики высвобождения $[2-^{14}\text{C}]$ серотонина и $[^{14}\text{C}]$ ГАМК из предварительно нагруженных медиаторами синапсом (рис.1, рис.2 соответственно) показало заметное увеличение высвобождения исследуемых медиаторов при диабете по сравнению с

контролем. При введении диабетическим животным пикамилона обнаружено незначительное снижение высвобождения серотонина из предварительно нагруженных медиатором синапсом, в то время как высвобождение ГАМК практически полностью нормализуется под действием этого препарата.

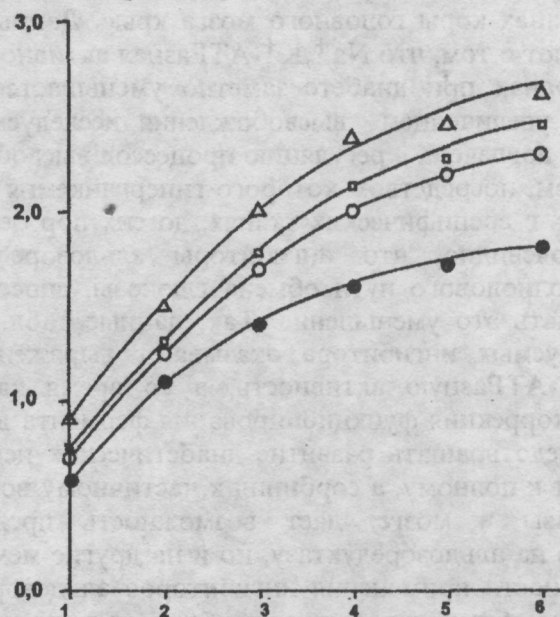


Рисунок 1.

Влияние ингибиторов альдозоредуктазы и пикамилона на высвобождение $[2-^{14}\text{C}]$ серотонина синапсами головного мозга диабетических крыс. По оси абсцисс: Время, мин.

По оси ординат: Высвобождение, имп. в 1 мин ($\times 10^3$) на 0,5 мг белка.

Обозначения: - контроль, - диабет, - диабет+AL 1576, - диабет+сорбинил.

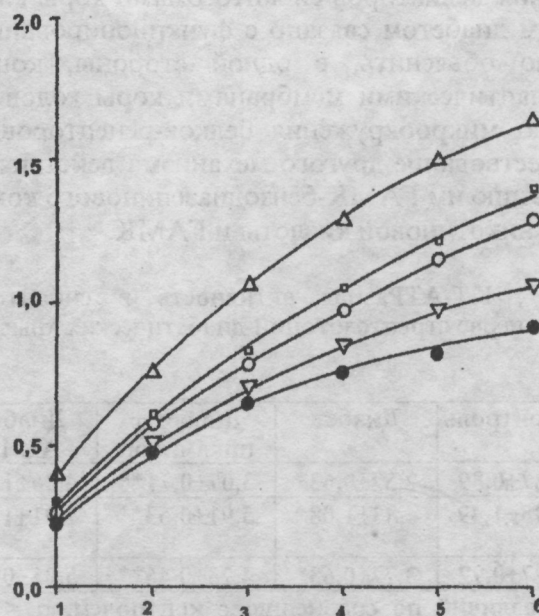


Рисунок 2.

Влияние ингибиторов альдозоредуктазы и пикамилона на высвобождение $[U-^{14}\text{C}]$ ГАМК синапсами головного мозга диабетических крыс. По оси абсцисс: Время, мин. По оси ординат: Высвобождение, имп. в 1 мин 10^3 на 0,5 мг белка. Обозначения: - контроль, - диабет, - диабет+AL 1576, - диабет+сорбинил, - диабет + пикамилон.

Оба исследуемых ингибитора альдозоредуктазы оказывают незначительное восстанавливающее действие на высвобождение исследуемых медиаторов, причем сорбинил более эффективен, чем AL-1576. Для оценки роли Na^+, K^+ -АТФазы в процессах высвобождения медиаторов измеряли ее активность в синапсосамах и синаптических мембранах коры головного мозга крыс. Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что Na^+, K^+ -АТФазная активность в синапсосамах и синаптических мембранах при диабете заметно уменьшается, что согласуется с обнаруженным нами увеличением высвобождения исследуемых медиаторов. То есть, Na^+, K^+ -АТФаза вовлечена в регуляцию процессов высвобождения медиаторов при диабете. Механизм, посредством которого гипергликемия уменьшает Na^+, K^+ -АТФазную активность в специфических тканях, до сих пор остается полностью не выясненным, хотя очевидно, что ингибиторы альдозоредуктазы, корректируя функционирование полиолового пути обмена глюкозы, способны полностью или частично предотвращать это уменьшение. Так, данные табл.1 свидетельствуют о том, что оба исследуемых ингибитора оказывают выраженное нормализующее действие на Na^+, K^+ -АТФазную активность, в то время как пикамилон менее эффективен. То есть коррекция функционирования фермента в сторону увеличения активности может предотвращать развитие диабетических нейропатий. Тот факт, что AL-1576 приводит к полному, а сорбинил к частичному восстановлению активности Na^+, K^+ -АТФазы в мозге, дает возможность предположить действие ингибитора не только на альдозоредуктазу, но и на другие мембранные структуры. Подтверждением важности применения ингибиторов альдозоредуктазы являются данные других авторов, об использовании ингибиторов при лечении диабета в связи с их способностью предотвращать увеличение сосудистой проницаемости [22]. Ингибиторы альдозоредуктазы нормализуют метаболические нарушения в мозге и периферических нервах, улучшая нервную проводимость, однако недостаточно способствуют регенерации в нервах диабетических животных [23]. Проведенные исследования позволяют считать, что модулирующее действие пикамилона на процессы высвобождения медиаторов синапсосамами коры головного мозга у крыс со стрептозотоциновым диабетом связано с функционированием Na^+, K^+ -АТФазы. Такое влияние можно объяснить, с одной стороны, конкуренцией за места связывания NAD синаптическими мембранами коры головного мозга крыс, что приводит к изменению микроокружения белков-рецепторов. С другой стороны, нельзя исключить существование другого механизма действия пикамилона, опосредованного через активацию им ГАМК-бензодиазепинового комплекса, поскольку он является производным никотиновой кислоты и ГАМК.

Таблица 1. Na^+, K^+ -АТФазная активность в синапсосамах, синаптических мембранах и седалишном нерве стрептозотоцин-диабетических крыс (мкмоль P_i на мг белка в час, $M \pm m$, $n=7-9$)

Группа	Контроль	Диабет	Диабет + пикамилон	Диабет + AL-1576	Диабет + сорбинил
Синапсосомы	$3,87 \pm 0,89$	$2,52 \pm 0,63^*$	$3,07 \pm 0,71^{**}$	$4,36 \pm 1,03^{**}$	$3,43 \pm 0,86^{**}$
Синаптические мембраны	$6,95 \pm 1,49$	$4,83 \pm 1,08^*$	$5,91 \pm 0,53^{**}$	$7,91 \pm 1,62^{**}$	$6,67 \pm 0,71^{**}$
Седалищный нерв	$5,27 \pm 0,92$	$3,77 \pm 0,63^*$	$4,23 \pm 0,46^{**}$	$5,01 \pm 0,74^{**}$	$4,89 \pm 0,50^{**}$

* достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$ ** достоверность различий по сравнению с показателями диабетических крыс, $p < 0,05$

В мозге и седалишном нерве диабетических животных установлено значительное повышение содержания сорбитола. Как видно из табл.2 его содержание в мозге стрептозотоцин-диабетических крыс повышено в 3,1, а в седалишном нерве в 10,7 раза по сравнению с контролем. Введение пикамилона диабетическими животным приводило к снижению уровня сорбитола в мозге на 36,

в седалишном нерве на 32% по сравнению с диабетическими животными не получавшими препарата. Нарушения функционирования полиолового пути обмена глюкозы вызваны увеличением клеточного поглощения глюкозы через инсулиннезависимую транспортную систему, а также связано с сосудистыми дисфункциями, что в свою очередь, может изменять регуляцию Na^+, K^+ -АТФазы, подтверждением чего являются данные табл.1. Известно, что в большинстве клеток животных активность Na^+, K^+ -АТФазы первоначально регулируется внутриклеточной концентрацией ионов Na^+ , так как их увеличение в нормально функционирующих клетках автоматически увеличивает ее активность [24]. При введении AL-1576 диабетическим животным уровень сорбитола в мозге и седалишном нерве снижается на 51 и 71%, а при введении сорбинула на 47 и 52% соответственно. Механизм действия ингибиторов альдозоредуктазы, в первую очередь, состоит в коррекции полиолового пути обмена глюкозы, связанного с сосудистыми дисфункциями [25, 26]. То обстоятельство, что оба ингибитора альдозоредуктазы не полностью снижают уровень сорбитола свидетельствует о том, что накопление сорбитола в тканях зависит не только от функционирования полиолового пути обмена глюкозы, но и от других факторов. Так, ранее проведенные нами исследования показали, что отношения NAD/NADH и NADP/NADPH -пар заметно возрастали при введении NAm на фоне диабета, что приводит к снижению уровня сорбитола в мозге [8].

Таблица 2. Содержание сорбитола (мкмоль/г) в головном мозге и седалишном нерве стрептозототин-диабетических крыс ($M \pm m$, $n=6-9$)

Группа Объект исследования	Контроль	Диабет	Диабет + пикамилон	Диабет+ AL-1576	Диабет + сорбинул
Мозг	$0,025 \pm 0,003$	$0,077 \pm 0,006^*$	$0,049 \pm 0,004^{**}$	$0,036 \pm 0,003^{**}$	$0,044 \pm 0,004^{**}$
Седалишный нерв	$0,13 \pm 0,009$	$1,39 \pm 0,180^*$	$0,94 \pm 0,087^{**}$	$0,41 \pm 0,038^{**}$	$0,68 \pm 0,055^{**}$

* достоверность различий по сравнению с контролем, $p < 0,05$, ** достоверность различий по сравнению с показателями диабетических крыс, $p < 0,05$

В результате проведенных исследований обнаружено, что при стрептозототиновом диабете происходят глубокие структурно-функциональные изменения со стороны центральной и периферической нервной системы, связанных с функционированием Na^+, K^+ -АТФазы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что развитие диабетических осложнений зависит не только от гликемического контроля, но и от нарушений процессов функционирования серотонин- и ГАМК-ергической систем в мозге, связанных как с нарушением регуляции их Na^+, K^+ -АТФазой, так и с усилением полиолового пути обмена глюкозы. Однако, не исключено участие и других факторов, таких как длительность заболевания, инозитоловый путь обмена и т.д.

Все вышеизложенное позволяет полагать, что ингибиторы альдозоредуктазы и пикамилон, нормализуя процессы нейротрансмиссии, активность Na^+, K^+ -АТФазы, а также функционирование полиолового пути обмена глюкозы, являются антидиабетическими препаратами, применение которых в клинике диабетических осложнений даст возможность как ослаблять так и предотвращать развитие диабетических нейропатий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dvornic D. (1987) In: Aldose reductase inhibition. An approach to the prevention of diabetic complications. (Ed. Porte D), Biomed. Inform. Corp., New York. pp. 69-157.

2. Ефимов А.С. (1982) Пробл. Эндокринолог., 4, 85-88.
3. Anderson J.W. (1975) Am. J. Clin. Nutr., 28, 273-280.
4. Varta S.D. (1980) Curr. Topics Eya Res., 3, 91-155.
5. Judzewitsch R.G., Jaspan J.B., Polonsky K.S. (1983) N. Engl.J.Med., 308, 119-125.
6. Greene D.A., Lattiner S.A. (1984) Diabetes., 33, 712-716.
7. Young R.J., Ewing D.J., Clarke B.F. (1983) Diabetes., 32, 938-942.
8. Обросова И.Г., Кучмеровская Т.М., Ефимов А.С. и др. (1994) Доклады АН Украины. № 7, 143-146.
9. Mooradian A.D. (1988) Endocrine Reviews., 9, 346-355.
10. Trulson M.E., Himmel C.D. (1983) J. Neurochem. 40, 1456-1464.
11. Grandall E.A., Gills M.A., Fernstrom J.D. cats (1981) Endocrinology. 109, 310-316.
12. Lilliker S. (1980) Compr. Psychiatry. 21, 270-275.
13. Халмурадов А.Г., Кучмеровская Т.М., Пархомец П.К. (1987) Нейрохимия. 6, N 4, 495-502.
14. Кучмеровская Т.М., Обросова И.Г., Ефимов А.С. и др (1993) Доклады АН Украины., № 2, 154-157.
15. Abita J.P., Chicheportiche R., Schweits H., Lasdunski M. (1977) Biochemistry. 16, 1838-1864.
16. Koteles G. (1986) Acta Biochim. Biophys. Hung, 21, N 1-2, 81-97.
17. Халмурадов А.Г., Пархомец П.К., Кучмеровская Т.М. и др (1983) Биохимия. 48, 1287-1292.
18. Leong S.F., Leung T.K.C. (1991) Neurochem Res., 16, 1161-1165.
19. Bergmeyer H.U. Methods of Enzymatic Analysis.-New York and London: Verlag Chemie. 167-170.
20. Lowry O.W., Rosebrough N.J., Farr R.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.
21. Плохинский И.А. (1970) Биометрия.-М.: Изд-во МГУ.
22. Williamson J.R., Chang K., Tilton R.G. et al. (1987) Diabetes, 36, 813-821.
23. Ekstrom P.A.R., Tomlinson D.R. (1989) J. Neurol. Sci, 93, 231-237.
24. Skou J.C. (1992) News in Physiological Sciences. 7, 95-100.
25. Cameron N.E., Cotter M.A., Low P. A. (1991) Am. J. Physiol. 261, E1 - E8
26. Bucala R., Tracey K.J., Cerami A. (1991) J. Clin. Invest. 87, 432-438.

IMPROVEMENT OF THE DIABETIC NEUROPATHY BY PICAMILON AND ALDOSE REDUCTASE INHIBITORS.

T.M. KUCHMEROVSKAYA, P.K. PARCHOMETC, G.V. DONCHENKO, Y.G. OBROSOVA,
A.P. KLIMENKO, N.A. KUCHMEROVSKY, L.V. PAKYRBAYEVA, A.S. EFIMOV.

Institute of Biochemistry, Kiev, National Academy of Sciences Ukraine Palladin

Streptosotocin-induced diabetes in rats is accompanied by the development of diabetic complications such as neuropathies. [2-¹⁴C]serotonin and [U-¹⁴C]GABA release from the neurotransmitter pre-loaded synaptosomes showed significant elevation. Aldose reductase inhibitors (AL-1576, sorbinil) administration leads to partial restoration of serotonin and GABA release, while picamilon restored only GABA release. It was shown that Na⁺·K⁺-ATPase activities decreased in synaptosomes, synaptic membranes and sciatic nerve of diabetic rats compared to control. Administration of AL-1576 normalized Na⁺·K⁺-ATPase activity, while sorbinil and picamilon less effectively. Sorbitol level are increased in streptozotocin-diabetic rats as compared to control. The picamilon and aldose reductase inhibitors administration to diabetic rats is accompanied by the partial reduction of brain sorbitol level. The findings confirm the important role of picamilon and aldose reductase inhibitors in the prevention and treatment of diabetic neuropathy.

Key words: diabetic neuropathy, aldose reductase inhibition, synaptosomes.