

торопосредованного высвобождения эндотелиального релаксирующего фактора (NO) и, возможно, гиперполяризующего фактора. Данные регуляторные сдвиги являются одним из механизмов реактивной гиперемии, которая характерна для гипертиреоза.

Выводы

1. При гипертиреозе сократительные реакции аорты на норадреналин ослабевают в результате снижения чувствительности гладкомышечных клеток к данному агонисту и усиления ингибирующего влияния эндотелия на эти реакции.

2. Дилататорные эндотелийзависимые реакции изолированной аорты при гипертиреозе усиливаются. Усиление дилататорных эффектов карбахолина может быть обусловлено эндотелиальным гиперполяризующим фактором за счет повышения эффективности его действия в результате тироксинстимулируемого увеличения числа единиц Na^+ , K^+ -АТФазного насоса.

3. В механизмах гипертиреоидного нарушения кровообращения важная роль принадлежит усилению дилататорных влияний эндотелия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян Э. С., Амроян Э. А., Акопов С. Э. Физиология и фармакология сосудистой стенки. — Ереван, 1987.
2. Лобанок Л. М., Лукиш Л. С. // Радиационная биология. Радиоэкология. — 1995. — Т. 35, № 2. — С. 269–273.
3. Марри Р., Греннер Д., Меуес П., Родуэлл В. Биохимия человека: Пер. с англ. — М., 1993. — Т. 1–2.
4. Chemla D., Levenson J., Valensi P. et al. // Am. J. Cardiol. — 1990. — Vol. 65, N 7. — P. 494–500.
5. Del Rio G., Zizzo G., Marrama P. et al. // Clin. Endocrinol. — 1994. — Vol. 40, N 2. — P. 235–239.
6. Furchgott R. F., Zawadzki J. V. // Nature. — 1980. — Vol. 288, N 5789. — P. 373–376.
7. Gunasekera R. D., Kuriyama H. // Br. J. Pharmacol. — 1990. — Vol. 99, N 3. — P. 541–547.
8. Klein I. // Am. J. Med. — 1990. — Vol. 88, N 6. — P. 631–637.
9. Komori K., Vanhoutte P. M. // Blood Vessels. — 1990. — Vol. 27. — P. 238–245.
10. Lockette W., Otsuka Y., Hirt E. // Agents Actions. — 1987. — Vol. 22, Suppl. — P. 125–132.
11. Luscher T. F., Vanhoutte P. M. // The Pulmonary Circulation and Acute Lung Injury. — New York, 1991. — P. 79–116.
12. McAllister R. M., Grossenburger V. D., Delp M. D., Laughlin M. H. // Am. J. Physiol. — 1998. — Vol. 274, N 5. — P. E946–E953.
13. Nagao T., Illiano S., Vanhoutte P. M. // Ibid. — 1992. — Vol. 263. — P. H1090–H1094.
14. Scivoletto R., Fortes Z. B., Garsia-Leme J. // Eur. J. Pharmacol. — 1986. — Vol. 129, N 3. — P. 271–278.
15. Stratton D. B., Morrow R. J. // Life Sci. — 1991. — Vol. 48. — P. 2207–2214.

Поступила 13.07.99

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2000

УДК 616.379-088.64-06:616.611-092.9

В. В. Полторак, Н. И. Горбенко, А. И. Гладких, О. В. Иванова

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНА Е НА РАЗВИТИЕ НЕФРОПАТИИ У КРОЛИКОВ С ДИТИЗОНЫМ ДИАБЕТОМ

Лаборатория патофизиологии (зав. — проф. В. В. Полторак) Украинского научно-исследовательского института фармакотерапии эндокринных заболеваний, Харьков

Целью работы было исследование влияния витамина Е на развитие ранней стадии диабетической нефропатии в условиях экспериментального инсулинзависимого сахарного диабета. Абсолютную инсулиновую недостаточность воспроизводили путем внутривенной инъекции дитизона (35 мг на 1 кг массы тела) самцам кроликов породы шиншилла. Витамин Е (токоферол ацетат) применяли перорально в виде желатиновых капсул по 100 мг на кролика ежедневно в течение 2 мес. У животных, получавших витамин Е, отмечалось достоверное снижение базальной гипергликемии, повышение базальной инсулинемии и улучшение толерантности к глюкозе относительно диабетического контроля. Под влиянием витамина Е наблюдались нормализация повышенного дитизоном уровня холестерина, β -липопротеидов и снижение концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови диабетических животных. Ангипротекторный эффект витамина Е, который проявлялся в снижении микроальбуминурии, массы почки и толщины базальной гломерулярной мембраны, обосновывает целесообразность его использования для предупреждения или ослабления клинической нефропатии у больных сахарным диабетом.

The effects of vitamin E (VE) on early-stage diabetic nephropathy were studied in experimental insulin-dependent diabetes mellitus. Absolute insulin deficiency was modelled with an intravenous injection of ditizone to male rabbits (35 mg/kg). Vitamin E (tocopherol acetate) was given orally as gelatin capsules, 100 mg per animal daily for 2 months. VE-fed rabbits exhibited a significant lowering of basal hyperglycemia, rise of basal insulinemia, and better glucose tolerance than diabetic control. VE also normalized ditizone-increased level of cholesterol, beta-lipoproteins and reduced concentrations of dienic conjugates in blood serum of the diabetic animals. Angioprotective effect of VE manifesting in lowering of microalbuminuria, mass of the kidney and thickness of basal glomerular membrane validates the efficiency of VE in prevention or attenuation of clinical nephropathy in patients with diabetes mellitus.

В настоящее время приблизительно у 35% больных инсулинзависимым сахарным диабетом (тип 1) и у 15% пациентов с инсулиннезависимой формой заболевания (тип 2) развивается одно из самых серьезных микрососудистых осложнений — диабетическая нефропатия [17]. Это клинический син-

дром, который характеризуется стойкой альбуминурией, ранним повышением артериального давления, неуклонным снижением уровня клубочковой фильтрации и высоким риском инвалидизации и смертности вследствие сердечно-сосудистой патологии [20].

Одним из патофизиологических звеньев между гипергликемией и развитием дисфункции эндотелия является повышенное образование кислородсодержащих свободных радикалов, которое возникает вследствие трех процессов: аутоокисления глюкозы, неферментативного гликозилирования и гипоксии [21]. Являясь высокоактивными окислителями, свободные радикалы дают цитотоксический эффект, поскольку вызывают денатурацию, связывание и агрегацию белков, а также окисление липидов с образованием их перекисей [15]. В нормальных условиях свободные радикалы быстро элиминируются природными жир- и водорастворимыми антиоксидантами. Однако у больных сахарным диабетом уровень естественных антиоксидантов существенно снижен, что приводит к патологическому повышению количества реактивных радикалов, или так называемому "оксидативному стрессу" [8]. Причиной этого может быть повышенное потребление НАДФН в результате активации альдозоредуктазы, что приводит к истощению восстановленной формы этого кофактора, необходимого для регенерации таких антиоксидантов, как глутатион, витамины С и Е [19].

Исследования на крысах и кроликах с абсолютной инсулиновой недостаточностью выявили существенное повышение маркеров "оксидативного стресса" на ранних стадиях диабетической нефропатии по сравнению с контролем [13, 14]. В то же время было показано, что применение антиоксидантных витаминов С и Е способствует снижению выраженности микроальбуминурии и нефромегалии у экспериментальных животных [11].

Исходя из патогенетически обоснованной целесообразности использования антиоксидантов для предупреждения или ослабления диабетических микроангиопатий, целью настоящей работы являлось исследование влияния витамина Е на развитие нефропатии у кроликов с абсолютной инсулиновой недостаточностью.

Материалы и методы

Абсолютную инсулиновую недостаточность прямого β -цитотоксического генеза вызывали путем внутривенной инъекции дитизона (35 мг на 1 кг массы тела) самцам кроликов породы шиншилла массой 2,5–3 кг [18].

Обработку диабетических животных витамином Е начинали через 2 мес после индукции диабета, т. е. на стадии формирования микрососудистой патологии. Витамин Е (токоферол ацетат фирмы "Словакофарма") применяли перорально в виде желатиновых капсул по 100 мг на кролика ежедневно в течение 2 мес. Группа контрольных диабетических животных по аналогичной схеме получала плацебо.

Оценку глюкозного гомеостаза проводили ежемесячно по уровню базальной гликемии и инсулинемии, а также во время внутривенного теста толерантности к глюкозе (2 г/кг). Содержание глюкозы в крови определяли глюкозооксидазным методом с помощью ферментативного анализатора глюкозы "Ексан-Г" (Литва). Инсулинемию оценивали радиоиммунологическим методом "двойных антител" с использованием наборов "Беларис".

Величины интегральной гликемии и инсулинемии рассчитывали, суммируя показатели во всех временных точках исследования (0, 3, 5, 10, 30,

60 мин) при проведении внутривенного теста толерантности к глюкозе [10].

Состояние липидного обмена у экспериментальных животных характеризовали, определяя содержание диеновых конъюгатов [4], общего холестерина и β -липопротеидов в сыворотке крови [3].

Концентрацию альбумина в суточной моче определяли с помощью иммуноферментного анализа [6].

С целью верификации микрососудистой патологии в почках проводили гистологическое исследование с помощью электронной микроскопии. Кусочки ткани фиксировали в 2% растворе четырехоксида осмия, приготовленном на фосфатном буфере (рН 7,36). Материал обезжировали в спиртах растущих концентраций и в абсолютном ацетоне и заливали в эпон-эралин. Блоки ткани резали на ультрамикротоме LKB "NOVA". Ультратонкие срезы (300–400 Å) окрашивали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца. Исследование ультраструктуры и фотографирование препаратов проводили на электронном микроскопе УЭМБ-100К. Толщину гломерулярной базальной мембраны определяли по методу Hirose и соавт. [12].

Цифровой материал обрабатывали статистически с применением параметрического критерия Стьюдента [5] и непараметрического критерия Вилкоксона [1].

Результаты и их обсуждение

Исследования проводили на модели абсолютной инсулиновой недостаточности, которая возникает вследствие образования дитизоном токсических комплексов с цинком, что вызывает деструктивные изменения в панкреатических β -клетках [18].

В результате проведенного эксперимента установлено, что уже через 1 сут после введения дитизона у кроликов, которые получали плацебо, отмечается повышение концентрации сахара в крови, которое сохраняется в течение 4 мес эксперимента (рис. 1). Применение витамина Е в течение 2 мес, которое начинали через 2 мес после индукции диа-

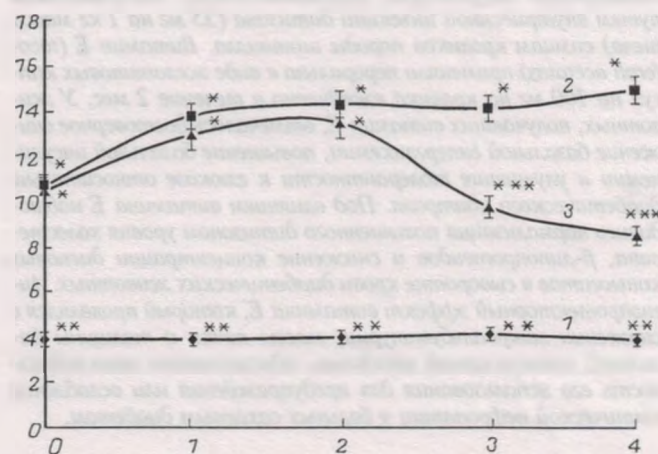


Рис. 1. Динамика базальной гликемии у кроликов с дитизиновым диабетом, получавших витамин Е или плацебо, начиная со 2-го месяца после инъекции дитизона ($\bar{X} \pm S_x$).

По оси ординат — концентрации глюкозы (в ммоль/л); по оси абсцисс — временные интервалы исследования (в мес).

Здесь и на рис. 2, 3: 1 — интактный контроль (n = 6); 2 — диабет + плацебо (n = 8); 3 — диабет + витамин Е (n = 8).

* — отклонение достоверно по сравнению с интактным контролем ($p < 0,05$); ** — отклонение достоверно по сравнению с группой диабет + плацебо ($p < 0,05$).

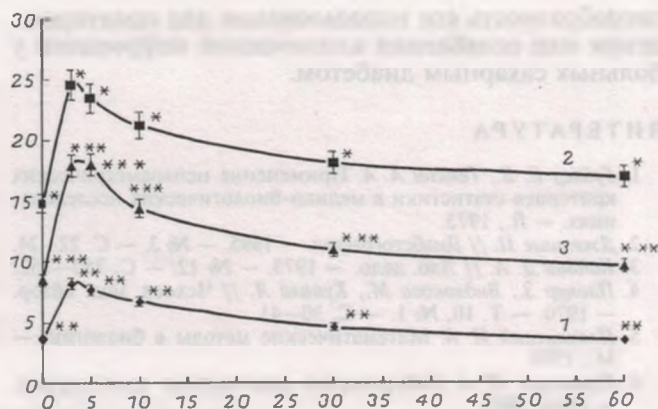


Рис. 2. Динамика гликемии во время теста толерантности к глюкозе (2 г/кг внутривенно) у кроликов с дитизоновым диабетом, получавших витамин Е или плацебо в течение 2 мес ($\bar{X} \pm S_2$).

По оси ординат — концентрацию глюкозы (в ммоль/л); по оси абсцисс — время взятия сыворотки крови (в мин).

бета, приводило к достоверному снижению базальной гипергликемии, составляющему около 35% от исходного уровня до лечения. Подтверждением ослабления инсулиновой недостаточности у диабетических животных, получавших витамин Е, было также снижение гипергликемической реакции на нагрузку глюкозой (рис. 2) и повышение базальной и интегральной инсулинемии (рис. 3) относительно диабетического контроля.

В настоящее время существуют сведения о том, что концентрация таких первичных продуктов перекисного окисления липидов, как диеновые конъюгаты, значительно выше в сыворотке крови у пациентов с диабетическими микроангиопатиями, чем у больных без сосудистых осложнений [2]. Как свидетельствуют полученные результаты (табл. 1), через 4 мес после индукции диабета у животных, получавших плацебо, отмечается 5-кратное увеличение концентрации диеновых конъюгатов в сыворотке крови, в то время как применение витамина Е способствовало существенному снижению выше-

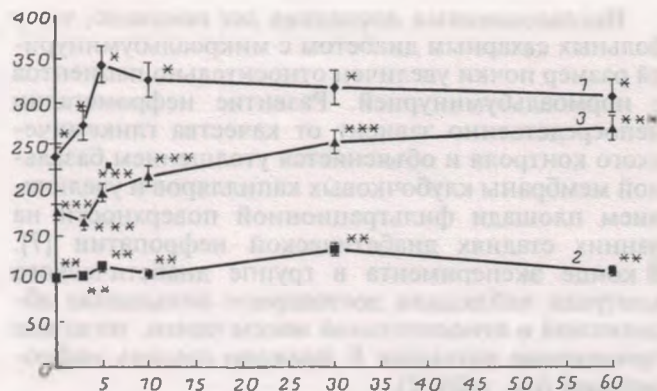


Рис. 3. Динамика инсулинемии во время теста толерантности к глюкозе (2 г/кг внутривенно) у кроликов с дитизоновым диабетом, получавших витамин Е или плацебо в течение 2 мес ($\bar{X} \pm S_2$).

По оси ординат — концентрацию инсулина (в пмоль/л); по оси абсцисс — время взятия сыворотки крови (в мин).

указанного показателя. Кроме того, у этой группы животных наблюдали нормализацию повышенного дитизоном уровня холестерина и β -липопротеидов в сыворотке крови кроликов (см. табл. 1).

Одним из ранних признаков клинической диабетической нефропатии и сердечно-сосудистой патологии у больных сахарным диабетом является микроальбуминурия (содержание альбумина в моче в пределах 30—300 мг/сут). Увеличение проницаемости клубочковых капилляров возникает вследствие роста гломерулярного давления и изменений толщины и заряда базальной мембраны [16]. Как видно из результатов, приведенных в табл. 2, через 4 мес после инъекции дитизона у диабетического контроля отмечается экскреция альбумина с мочой, что является подтверждением развития ранней стадии диабетической нефропатии. В то же время применение витамина Е в течение 2 мес вызывало снижение выраженности микроальбуминурии по сравнению с контрольной диабетической группой.

Таблица 1

Показатели липидного обмена в сыворотке крови кроликов с дитизоновым диабетом, получавших витамин Е и плацебо в течение 2 мес ($\bar{X} \pm S_2$)

Группа животных	Число животных	Концентрация холестерина, ммоль/л	Концентрация β -липопротеидов, мг%	Концентрация диеновых конъюгатов, ммоль/л
Интактный контроль	6	$1,84 \pm 0,26^{**}$	$172,7 \pm 9,3^{**}$	$0,528 \pm 0,100^{**}$
Диабет + плацебо	8	$2,74 \pm 0,33^*$	$212,7 \pm 12,6^*$	$2,684 \pm 0,200^*$
Диабет + витамин Е	8	$1,79 \pm 0,13^{**}$	$142,6 \pm 17,5^{**}$	$0,807 \pm 0,013^{*..}$

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий: одна — с группой интактного контроля, две — с группой "диабет + плацебо".

Таблица 2

Некоторые показатели структурного и функционального состояния почки у кроликов с дитизоновым диабетом, получавших витамин Е и плацебо в течение 2 мес ($\bar{X} \pm S_2$)

Группа животных	Число животных	Масса почки		Альбуминурия, мг/сут	Толщина базальной мембраны клубочка, мкм
		абсолютная, г	относительная, $\cdot 10^{-4}$		
Интактный контроль	6	$5,8 \pm 0,4^{**}$	$20,64 \pm 1,48^{**}$	$4,3 (0,9-6,0)^{**}$	$0,38 \pm 0,04^*$
Диабет + плацебо	8	$8,9 \pm 0,5^*$	$39,58 \pm 3,11^*$	$29,4 (15,0-60,0)^*$	$0,78 \pm 0,03^{**}$
Диабет + витамин Е	8	$7,0 \pm 0,5^{*..}$	$24,38 \pm 0,87^{**}$	$19,8 (9,5-30,0)^{*..}$	$0,64 \pm 0,05^{*..}$

Исследованиями последних лет показано, что у больных сахарным диабетом с микроальбуминурией размер почки увеличен относительно пациентов с нормоальбуминурией. Развитие нефромегалии непосредственно зависит от качества гликемического контроля и объясняется утолщением базальной мембраны клубочковых капилляров и увеличением площади фильтрационной поверхности на ранних стадиях диабетической нефропатии [7]. В конце эксперимента в группе диабетического контроля наблюдали достоверное повышение абсолютной и относительной массы почки, тогда как применение витамина Е снижало степень нефромегалии (см. табл. 2).

Характерным морфологическим признаком диабетической нефропатии является утолщение базальной мембраны клубочковых капилляров, что является следствием изменения ее биохимического состава [9]. Гистологический анализ почки подтвердил наличие ультраструктурных изменений, которые приводили к функциональным нарушениям у кроликов через 16 нед после индукции диабета, о чем свидетельствовало 2-кратное увеличение толщины гломерулярной базальной мембраны (см. табл. 2). При этом изучаемый показатель был снижен у животных, получавших витамин Е, хотя и оставался выше нормы.

Выводы

1. Пероральное использование витамина Е в течение 2 мес тормозит развитие диабетической нефропатии у кроликов с дитизоновым диабетом, что проявляется в снижении микроальбуминурии, массы почки и толщины гломерулярной базальной мембраны.

2. Ангиопротекторный эффект витамина Е, который реализуется за счет улучшения глюкозного гомеостаза и липидного обмена, обосновывает це-

лесообразность его использования для предупреждения или ослабления клинической нефропатии у больных сахарным диабетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
2. Дженингс П. // Диабетогрфия. — 1995. — № 3. — С. 22—24.
3. Кайдин Д. А. // Лаб. дело. — 1973. — № 12. — С. 750—752.
4. Плацер З., Видлакова М., Купила Л. // Чехосл. мед. обзор. — 1970. — Т. 10, № 1. — С. 30—41.
5. Плохинский Н. А. Математические методы в биологии. — М., 1978.
6. Пушкарев И. А. Лабораторная диагностика протеинурии. — Рига, 1985.
7. Baumgartl H., Banholzer P., Sigl G. et al. // Nephrol. Dial. Transplant. — 1998. — Vol. 13. — P. 630—634.
8. Baynes J. W. // Diabetes. — 1991. — Vol. 40. — P. 405—412.
9. Born J., Kraats A. A., Bakker M. A. et al. // Diabetologia. — 1995. — Vol. 38. — P. 1169—1175.
10. Coupland R., Davidson J., Lazarow A. // Anat. Res. — 1956. — Vol. 124. — P. 394.
11. Graven P., Derubertis F., Kagan V. et al. // J. Am. Soc. Nephrol. — 1997. — Vol. 8. — P. 1405—1414.
12. Hirose K., Osterby R., Nosava M. et al. // Kidney Int. — 1982. — Vol. 21. — P. 689—695.
13. Ivanova O., Poltorack V., Gorbenko N., Gladkich A. // Diabetologia. — 1998. — Vol. 41, Suppl. 1. — P. 266.
14. Kakkar R., Mantha S., Radhi J. et al. // Life Sci. — 1997. — Vol. 60. — P. 667—779.
15. Kennedy L. A., Lyons T. J. // Metabolism. — 1997. — Vol. 46, N 12. — P. 14—21.
16. Mogensen C. E. // J. Intern. Med. — 1994. — Vol. 235. — P. 297—316.
17. Mogensen C. E. // Diabetologia. — 1999. — Vol. 42, N 3. — P. 263—286.
18. Okamoto K. // Folia Endocr. Jpn. — 1949. — Vol. 25, N 1. — P. 32—61.
19. Packer L., Witt E., Trischler H. // Free Radic. Biol. Med. — 1995. — Vol. 19. — P. 227—250.
20. Parving H. // Diabetologia. — 1998. — Vol. 41. — P. 745—759.
21. Porte D., Schwartz M. // Science. — 1996. — Vol. 272. — P. 699—700.

Поступила 21.02.00