

Таблица 2

## ОКС эстрадиола, этинилэстрадиола и нистранола

Соединение	ОКС
Эстрадиол	100,0
Этинилэстрадиол	150,0 ± 16,8
Нистранол	0,2 ± 0,01

тозольной фракции тканей матки неполовозрелых самок крыс через 1, 6, 24 и 48 ч после однократного введения представлены на рисунке. Через 1 ч после введения эстрадиола и этинилэстрадиола связывание меченого эстрадиола снижается на 75 и 25% соответственно, через 6 ч после введения этинилэстрадиола и нистранола этот показатель снижается на 50 и 80% соответственно. Связывание эстрадиола после введения нистранола и этинилэстрадиола не восстанавливается за 24 ч, тогда как после введения эстрадиола к этому сроку оно возрастает почти в 2 раза. Показанная ранее [5, 6] высокая утеротропная активность нистранола может быть обусловлена его способностью увеличивать скорость транслокации гормон-рецепторных комплексов в ядро, что также объясняет низкую концентрацию цитозольных рецепторов эстрадиола в тканях матки крыс, получавших нистранол.

Критерием способности нистранола конкурировать с эстрадиолом за связывание в цитозольной фракции тканей матки крыс *in vitro* служит показатель ОКС нистранола, представленный в табл. 2. Полученные результаты показали, что нистранол практически не конкурирует с эстрадиолом за связывание с его цитозольными рецепторами в отличие от этинилэстрадиола, моонитратом диоксипроизводного которого он является.

## Выводы

1. Отсутствие у нистранола способности конкурировать с эстрадиолом *in vitro* и наличие выра-

женного влияния на связывание эстрадиола и прогестерона в цитозольной фракции *in vivo* наряду с выраженным утеротропным эффектом вероятно связано с превращением нистранола в организме в активный(е) метаболит(ы).

2. При изучении потенциальных лекарственных препаратов с эстрогенной активностью необходимо использовать сочетание методов исследования *in vivo* и *in vitro*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бассалык Л. С. Рецепторы стероидных гормонов. — М., 1987. — С. 198—203.
2. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. — Л., 1978. — С. 72—75.
3. Куршенблат Я. Д. Практикум по эндокринологии. — М., 1969. — С. 139—141.
4. Покровская Е. В., Иваненко Т. И. // Пробл. эндокринологии. — 1981. — № 6. — С. 66—70.
5. Ржезников В. М., Иваненко Т. И., Покровская Е. В., Федотов В. П. // Хим.-фарм. журн. — 1986. — № 9. — С. 1057—1061.
6. Ржезников В. М., Иваненко Т. И., Федотов В. П. // Пат. 1202250 РФ, 1993.
7. Katzenellenbogen J. A., Johnson H. J., Carlson K. E. // Biochemistry. — 1973. — Vol. 12. — P. 4092—4093.
8. Lowry O. U. et al. // Anal. Biochem. — 1977. — Vol. 83, № 2. — P. 346—356.

Поступила 22.11.95

*Ye. N. Kareva, V. P. Fedotov, V. M. Rzheznikov, Ye. V. Solovyova, Ye. V. Pokrovskaya* — INTERACTION OF NISTRANOL WITH ESTRADIOL AND PROGESTERONE RECEPTORS IN THE RAT UTERUS CYTOSOL *IN VITRO* AND *IN VIVO*

**Summary.** Interactions between nistranol and estradiol and progesterone receptors in the cytosol fraction of the uterine tissue of oophorectomized rats and the relative competitive capacity of nistranol have been studied 24 h after a single injection of the drug. The results demonstrate the effects of nistranol on estradiol and progesterone binding. Nistranol boosting of uterine growth in rats is explained by its capacity to accelerate the translocation of hormone-receptor complexes into the nucleus. Investigations of the capacity of new estrogens to compete with estradiol for binding in the tissues of target organs *in vitro* and affect estradiol and progesterone binding *in vivo* permit a more effective screening of estrogens than use of only the classical *in vitro* method.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1996

УДК 616.379-008.64-06:616.61-005-092.9]-076.4

С. А. Шестакова, М. Л. Степанян, В. А. Титова, Н. В. Бойкова

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ В РАННИЕ СРОКИ ФОРМИРОВАНИЯ АНГИОПАТИИ У КРЫС С АЛЛОКСАНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Кафедра патофизиологии (зав. — проф. Н. Н. Петрищев) и НИЦ (руководитель В. В. Томсон) Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова

Одним из звеньев патогенеза диабетической микроангиопатии (МА) является расстройство микроциркуляции — изменение гемодинамики и гемореологии [2, 6, 7]. С нарушениями микроциркуляции тесно связано состояние тромбоцитов, которые, видимо, участвуют в возникновении и прогрессировании МА. Исследования функциональной активности тромбоцитов у больных сахарным диабетом (СД), осложненным и не осложненным МА, привели к противоречивым результатам [14], что отчасти, вероятно, обусловлено трудностями ранней диагностики ангиопатий, особенно диабетической нефропатии (ДН). Для выяснения роли тромбоцитов в патогенезе МА

необходимо исследовать состояние системы тромбоцит—сосудистая стенка в ранние сроки формирования сосудистой патологии, используя для этого животных с экспериментальным СД.

Задачей нашего исследования было изучение функциональной активности тромбоцитов и антиагрегационной активности (АА) аорты в ранние сроки формирования микрососудистых повреждений в почках у крыс с экспериментальным СД.

## Материалы и методы

Опыты выполнены на 64 нелинейных белых крысах-самцах массой 180—240 г, находившихся на обычном рационе питания. Инсулинзависимый СД (ИЗСД) воспроизводили введе-

**Показатели тяжести заболевания и микрососудистых осложнений МД в разные сроки его течения**

Показатель	15-е сутки		30-е сутки		60-е сутки	
	СД	контроль	СД	контроль	СД	контроль
Гликемия, ммоль/л	12,8 ± 4,6**	4,2 ± 0,9	13,8 ± 5,1**	4,3 ± 0,8	13,9 ± 3,2**	4,1 ± 1,1
Глюкозурия, ммоль/л	8,3 ± 2,4	0	9,4 ± 2,1	0	6,9 ± 2,3	0
Протеинурия, г/л	0,62 ± 0,31	0	0,71 ± 0,26	0	0,68 ± 0,32	0
Изменение массы тела, г	-27 ± 6,0	+10 ± 2,0	-30 ± 4,0	+15 ± 3,0	-61 ± 3,2	+40 ± 5,0
МДА, нмоль/мл	37,2 ± 5,5**	12,5 ± 2,4	39,2 ± 8,9**	14,1 ± 1,5	32,7 ± 2,6**	14,4 ± 3,1
Удельный объем мезангия, %	20,0 ± 4,1	0	24,1 ± 1,8	0	31,6 ± 3,9***	0

Примечание. \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* — достоверность ( $p < 0,01$ ) различия с СД на 15-е сутки его развития.

нием 5% раствора аллоксана подкожно в дозе 140—180 мг/кг. Тяжесть СД оценивали по уровню гликемии натощак (глюкозооксидазным методом), глюкозурии и протеинурии (с помощью стандартных полосок "Lachema", Чехия) и по изменению массы тела. В плазме крови определяли уровень малонового диальдегида (МДА) согласно [10]. В опыт брали крыс с выраженными признаками СД через 15, 30 и 60 сут после введения аллоксана.

Агрегацию тромбоцитов исследовали в плазме крови, полученной из брюшного отдела аорты, используя в качестве индуктора  $10^{-5}$  М АДФ ("Reanal", Венгрия). Содержание МДА определяли в тромбоцитах, не активированных и активированных тромбином (2,5 ЕД/мл) [10]. АА аорты исследовали согласно [12] и оценивали по разведению инкубата аорты, снижающего в 2 раза максимальную агрегацию тромбоцитов интактных крыс.

Методом световой микроскопии исследовали почки крыс, фиксированные в 10% формалине и залитые в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и ставили PAS-реакцию. Морфометрическую оценку нефрона проводили методом точечного счета по Вайбелю. Для ультраструктурного исследования почки фиксировали в 2% растворе глутаральдегида с последующим осмириванием и заливкой в эпон-812. Срезы готовили на ультратоме УМТП-3 и просматривали в микроскопе "Hitachi-300".

**Результаты и их обсуждение**

Характеристика СД в динамике течения заболевания представлена в таблице. У животных выявлен диабет средней тяжести, который сопровождался изменениями почечных клубочков, отмеченными на 15-е сутки заболевания и неуклонно прогрессирующими к 60-м суткам.

Исследование агрегации тромбоцитов не выявило значимых изменений ее на 15-е и 30-е сутки развития СД, однако на 60-е сутки агрегация тромбоцитов увеличилась на 25% по сравнению с показателями в контроле (рис. 1). Одновременно прослеживалось замедление дезагрегации тромбоцитов у 30% крыс с СД, наиболее выраженное на 60-е сутки его течения.

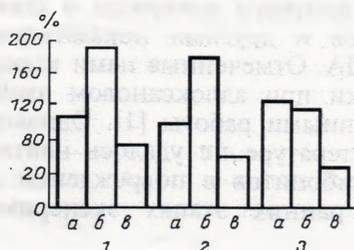


Рис. 1. Агрегация тромбоцитов, содержание в них МДА и АА аорты у крыс в динамике течения СД (показатели в контроле приняты за 100%).

1, 2, 3 — соответственно 15, 30, 60-е сутки развития СД. а — агрегация тромбоцитов; б — МДА в неактивированных тромбоцитах; в — АА инкубата аорты.

В механизме сосудисто-тромбоцитарного взаимодействия большое значение имеют метаболиты арахидоновой кислоты (АК) — простаноиды, обладающие высокой физиологической активностью и оказывающие реципрокное действие в отношении тонуса сосудов и агрегации тромбоцитов. Мы исследовали содержание в тромбоцитах МДА, конечного продукта метаболизма АК, образующегося в эквимольных количествах с тромбоксаном  $A_2$  и отражающего синтез последнего [11]. Содержание МДА в неактивированных и активированных тромбоцитах у крыс с СД на 15-е сутки составило соответственно  $2,35 \pm 0,26$  и  $4,87 \pm 0,39$  нмоль/ $10^9$  клеток ( $p < 0,01$ ), а на 30-е сутки —  $2,04 \pm 0,26$  и  $4,57 \pm 0,61$  нмоль/ $10^9$  клеток (в контроле — соответственно  $1,20 \pm 0,13$  и  $2,77 \pm 0,25$  нмоль/ $10^9$  клеток). На 60-е сутки уровень МДА в неактивированных и активированных тромбоцитах приближался к контрольным значениям (см. рис. 1). Эти данные указывают на повышение образования МДА тромбоцитами крыс с СД как *in vivo*, так и *in vitro*.

Исследование АА аортального инкубата на 15-е сутки СД выявило снижение ее по сравнению с контролем. Она продолжала нарастать, и на 60-е сутки АА аорты была в 2 раза ниже, чем в соответствующей контрольной группе.

Морфометрический анализ показал, что во все исследуемые сроки СД наблюдается рост удельного объема мезангия, в котором накапливалось PAS(+)-вещество. Отмечалась гиалиново-капельная и зернистая дистрофия эпителия проксимального отдела нефрона, что, по-видимому, обусловлено протеинурией (см. таблицу), возможно, вследствие повышения проницаемости гломерулярного фильтра и истощения реабсорбционных механизмов. На ультраструктурном уровне на 15-е сутки развития СД в клубочках отмечались деструкция фенестр эндотелия, вакуолизация и очаговое отслоение его от базальной мембраны (БМ), которая местами была утолщена и пропитана электронно-плотным мелкозернистым материалом. Наблюдались сегментарная пролиферация мезангиоцитов и в отдельных петлях капилляров скопления прилежащих к эндотелию тромбоцитов. Через 60 сут в клубочках нарастала деформация капиллярных петель вплоть до полной облитерации (рис. 2), БМ была утолщена и разрыхлена на обширных участках и местами лишена эпителиального покрытия. В просвете капсулы и мезангиуме накапливался электронно-плотный материал. Отмечались скопления пристеночно расположенных тромбоцитов (до 10—20 в поле зре-

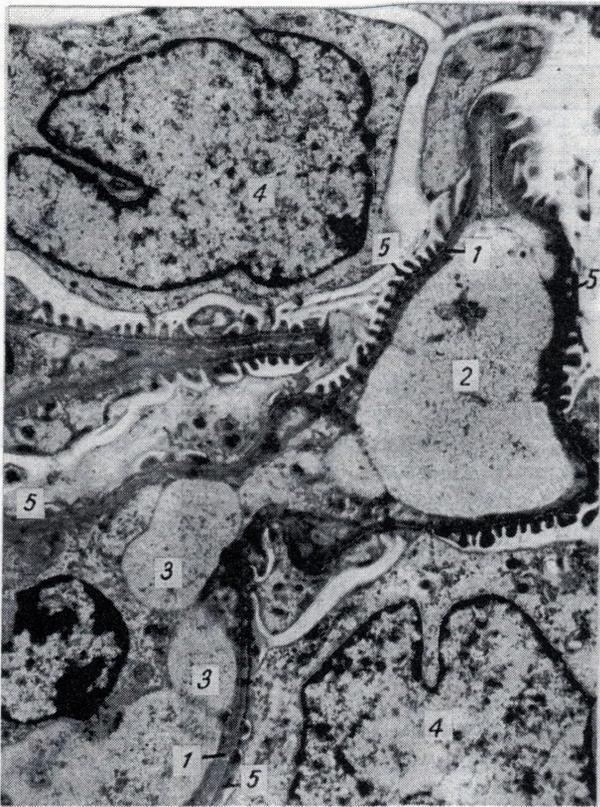


Рис. 2. Капиллярные петли клубочка крысы с аллоксановым диабетом (60 сут).

1 — БМ; 2 — просвет капилляра; 3 — вакуолизация эндотелия; 4 — подоциты; 5 — ножковые отростки подоцитов. Ув. 7000.

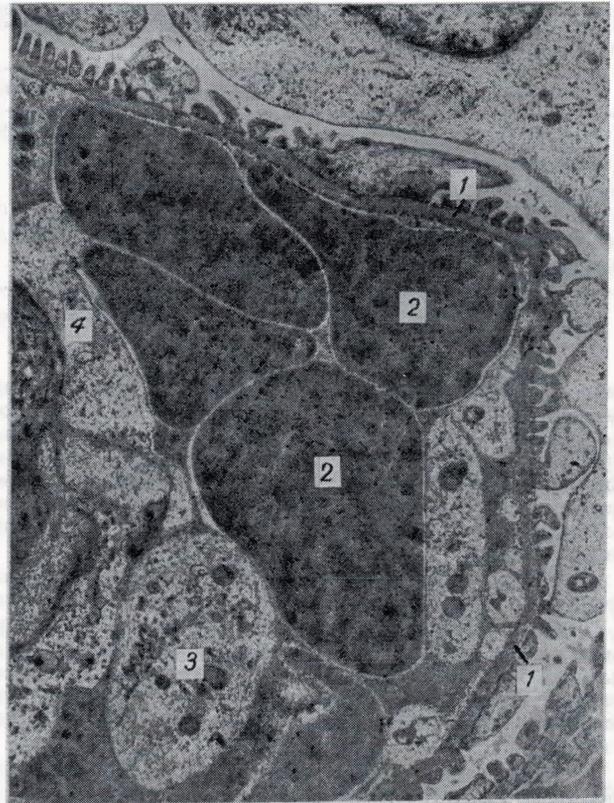


Рис. 3. Участок капиллярной петли почки крысы с аллоксановым диабетом (60 сут).

1 — БМ; 2 — эритроцит; 3 — тромбоциты; 4 — дегранулированный тромбоцит. Ув. 12 000.

ния), часть из которых была дегранулирована (рис. 3). Эти изменения клубочков указывают на микрососудистые повреждения, эквивалентные описанным в литературе ранним изменениям клубочков при ДН [1, 9].

Таким образом, нами выявлен комплекс нарушений показателей тромбоцитарно-сосудистого гемостаза у крыс с СД: усиление агрегации и продукции МДА тромбоцитами, указывающее на повышение их реактивности, и прогрессирующее снижение АА аорты. При этом различные функции тромбоцитов изменялись не одновременно: более ранние изменения (на 15-е сутки) отмечались со стороны процессов липопероксидации (увеличение образования МДА) и дезагрегации, тогда как агрегация изменялась лишь на 60-е сутки течения СД. Усиление ПОЛ в тромбоцитах сочетается с общей активизацией свободнорадикального окисления липидов при СД в плазме крови (см. таблицу) и в тканях, что согласуется с данными работ [4, 8]. Причиной усиления ПОЛ, в том числе в тромбоцитах, считают нарушения липидного обмена при дефиците инсулина и недостаток антиоксидантных систем защиты, в частности  $\alpha$ -токоферола [3, 4].

Ослабление АА аорты у крыс с СД, по-видимому, связано со спецификой метаболизма АК в стенке сосуда и обусловлено угнетением активности Pgl<sub>2</sub>-синтетазы избытком продуктов ПОЛ при СД [13]. В литературе также описан дисбаланс между проагрегантными простаноидами тромбоцитов и антиагрегантными простаноидами

сосудистой стенки в сторону превалирования первых у больных ИЗСД и у крыс со стрептозототиновым диабетом, осложненным МА [3, 5], что является важным фактором нарушения тромбоцитарно-сосудистого взаимодействия, приводящего к гиперагрегации.

Существенно, что активация тромбоцитов *in vivo*, о чем свидетельствует повышение содержания МДА в неактивированных тромбоцитах, отмечалась в те же сроки СД (на 15-е сутки), что и признаки МА — протеинурия, утолщение мезангия клубочков (см. таблицу), коррелирующие с уровнем гликемии ( $r = +0,53$ ;  $p < 0,05$ ). В дальнейшем усиление внутрисосудистой активации тромбоцитов, на что указывает появление дегранулированных клеток в тромбоцитарных агрегатах (см. рис. 3), сочеталось с усилением повреждения эндотелия, утолщением мезангия, накоплением электронно-плотного материала в стенке и просвете сосудов и другими показателями формирующейся МА. Отмеченные нами изменения клубочков почки при аллоксановом диабете согласуются с данными работы [1]. Однако в доступной нам литературе не удалось найти описания участия тромбоцитов в повреждении сосудистой стенки на ранних этапах экспериментального диабета.

Сопоставление свойств тромбоцитов и сосудистой стенки с изменениями в почечных клубочках в ранние сроки развития сосудистых повреждений у крыс с СД позволило продемонстрировать тесную связь между появлением и накоплением пу-

ла гиперреактивных тромбоцитов и состоянием стенки сосудов *in vivo* и *in vitro*. По-видимому, возникающие при СД нарушения углеводного и жирового обмена и их последствия (полиоловый путь метаболизма глюкозы, неферментное гликозилирование белков, активизация ПОЛ) затрагивают и тромбоциты, и эндотелий, однако степень изменения каждого из них зависит от местных условий в различных сосудистых бассейнах. Существуют определенные особенности гемодинамики в клубочках при СД. Можно предположить, что внутрисклубочковая гипертензия как дополнительный фактор обуславливает реализацию активности подготовленных (гиперреактивных) тромбоцитов — агрегацию и высвобождение проагрегантов и вазоконстрикторов (серотонин, тромбоксан А<sub>2</sub> и др.) и продуктов ПОЛ (МДА), которые, вызывая спазм сосудов и повреждения эндотелия, нарушают микроциркуляцию в клубочках, способствуют микротромбозу и формированию ДН.

## Выводы

1. У крыс с хроническим аллоксановым диабетом в динамике его течения изменения функциональной и метаболической активности тромбоцитов наступают не одновременно: усиление образования МДА и снижение дезагрегации тромбоцитов отмечаются на 15-е сутки развития СД, тогда как увеличение АДФ-индуцированной агрегации и отсутствие изменений в содержании и продукции тромбоцитами МДА — на 60-е сутки течения СД.

2. На ранних этапах развития СД (15-е сутки) у крыс отмечается снижение АА аорты, прогрессирующее к 60-м суткам СД.

3. Выявлен параллелизм между появлением ранних признаков ДН, протеинурией и наличием пула гиперреактивных тромбоцитов, которым принадлежит определенная роль в механизмах повреждения сосудов клубочков на ранних этапах формирования диабетической ангиопатии.

## ◆ ОБЗОРЫ

© А. В. ВОРОНЦОВ, М. В. ШЕСТАКОВА, 1996

УДК 616.379-008.64-06:616.611-092-08(048.8)

А. В. Воронцов, М. В. Шестакова

### ДИАБЕТИЧЕСКАЯ НЕФРОПАТИЯ: ПАТОГЕНЕЗ И ЛЕЧЕНИЕ

Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН, Москва

В настоящее время диабетическая нефропатия (ДН) является ведущей причиной инвалидизации и смертности больных сахарным диабетом (СД). Развиваясь у 40—45% больных как инсулинзависимым — ИЗСД (I тип), так и инсулиннезависимым — ИНСД (II тип) СД [35], это грозное осложнение приводит к развитию хронической почечной недостаточности, а в итоге — к гибели больных от уремии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Берулава М. Х. Морфологические изменения в почках при экспериментальном аллоксановом диабете. — Тбилиси, 1980.
2. Ефимов А. С. Диабетические ангиопатии. — М., 1989.
3. Задкова Г. Ю., Авакян Х. М., Марков А. М. // Пробл. эндокринологии. — 1993. — № 5. — С. 40—43.
4. Корчин В. И., Ланкин В. З. и др. // Бюл. eksper. биол. — 1992. — № 9. — С. 279—282.
5. Сергиенко А. А. // Пробл. эндокринологии. — 1991. — № 4. — С. 24—26.
6. Шестакова М. В., Дедов И. И. // Тер. арх. — 1994. — № 6. — С. 75—78.
7. Belfiore A. et al. // Vascular Complications in Diabetes Mellitus. — Basel, 1987.
8. Noberasco G., Odetti P., Boeri D. et al. // Biomed. Pharmacother. — 1991. — Vol. 45, № 4—5. — P. 193—196.
9. Steffer M. W., Qsterby R. et al. // Diabetes. — 1989. — Vol. 38, № 9. — P. 1077—1083.
10. Stuart H. J., Murphy S., Oski F. A. // N. Engl. J. Med. — 1975. — Vol. 292. — P. 10—13.
11. Stuart H. J. // Thromb. Haemost. — 1979. — Vol. 42. — P. 649—654.
12. Ts'ao C., Krajewski D., Galuzzo T. // Proc. Soc. exp. Biol. — 1981. — Vol. 166. — P. 383—388.
13. Vane J. R., Bunting S., Moncada S. // Int. Rev. exp. Pathol. — 1982. — Vol. 23. — P. 162—196.
14. Winocour P. // Diabetes. — 1992. — Vol. 41, Suppl. 2. — P. 26—31.

Поступила 04.08.95

S.A. Shestakova, M.L. Stepanyan, V.A. Titova, N.V. Boikova — FUNCTIONAL ACTIVITY OF PLATELETS IN THE EARLY PERIODS OF ANGIOPATHY FORMATION IN RATS WITH ALLOXANE DIABETES

**Summary.** Functional and metabolic activity of platelets and antiaggregation activity of aortic wall, as well as the specific features in the structure of renal glomeruli were studied in rats at the early stages of alloxan diabetes development. A decrease of platelet disaggregation, increase in the levels of malonic dialdehyde (MDA) in nonactivated platelets, and an expressed increase of MDA production by thrombin-activated platelets were observed in animals with 15-day diabetes mellitus. A depression of the antiaggregation activity of the aorta was observed at the same period. In the renal glomeruli, ultrastructure of the epithelium was changed (destruction of its fenestrae, vacuolization, and detachment from the basal membrane), and proliferation of the mesangial elements of a glomerulus observed. In later periods of diabetes mellitus (60 days) the maximal increase of platelet aggregation activity and a continuing decrease of their disaggregation were observed, which were not paralleled by a higher production of MDA in nonactivated and activated platelets. Decrease of antiaggregation activity of the aorta and changes in the renal glomeruli progressed by day 60 of the disease: degranulated platelets and aggregations thereof were found in the lumens of glomerular capillaries.

Впервые поражение почек при СД было описано Р. Kimmelstiel и С. Wilson в 1936 г. [42]. Клинически оно характеризуется следующими проявлениями: нарастающей протеинурией (при неизменном мочевом осадке), артериальной гипертензией, формированием нефротического синдрома (примерно у 30% больных) и прогрессирующим снижением фильтрационной функции почек. Коварство этого осложнения СД состоит в том, что оно развивается постепенно и долгое время оста-