УДК 612
ББК 28.903
Б 79

Болеева Г.С.
Аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», тел. (495) 939-14-16, e-mail: boleeva-msu@yandex.ru

Нарушение симпатической нейропередачи в артериях кожи у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом*

(Рецензирована)

Аннотация
В подкожной артерии крыс через 10–12 недель после введения стрептозотоцина наблюдается нарушение пресинаптических механизмов симпатической нейропередачи, которое проявляется в уменьшении констрикторных ответов на электрическое раздражение нервов без изменения чувствительности гладкомышечных клеток к норадреналину. Морфологические изменения периартериального нервного сплетения на этом сроке развития диабета еще не обнаруживаются.
Ключевые слова: *подкожная артерия, крыса, норадреналин, перфузия, пропранолол, глиоксиловая кислота, сахарный диабет, стрептозотоцин, флуоресценция, электрическое раздражение нервов.*

Boleeva G.S.
Post-graduate student of Human and Animal Physiology Department, Faculty of Biology, Moscow State University named after M.V. Lomonosov, ph. (495) 939-14-16, e-mail: boleeva-msu@yandex.ru

The disturbance of sympathetic neurotransmission in saphenous artery of rats with insulin-dependent diabetes mellitus

Abstract
The prejunctional mechanisms of sympathetic neurovascular transmission are impaired in saphenous artery of rats 10–12 weeks after treatment with streptozotocin. This is manifested in reduced constrictor response to electrical nerve stimulation without alteration of smooth muscle cell sensitivity to noradrenaline. Morphological changes of periarterial nerve plexus are not observed at that stage of diabetes development.
Keywords: *saphenous artery, rat, noradrenaline, perfusion, propranolol, glyoxilic acid, diabetes mellitus, streptozotocin, fluorescence, electrical stimulation of nerves.*

При инсулин-зависимом сахарном диабете наблюдаются нарушения кровообращения как на системном, так и на региональном уровне. Ведущей причиной таких нарушений служит диабетическая нейропатия, которая развивается у 50% больных [1, 2]. Перегрузка нервных клеток глюкозой приводит к окислительному стрессу, что сопровождается нарушением их кальциевого гомеостаза, а также снижением биодоступности нейротрофических факторов [3]. Признаки нарушения вазомоторной иннервации обнаруживаются и у животных с экспериментальным диабетом: такие как уменьшение плотности нервных сплетений [4], снижение уровня экспрессии тирозингидроксилазы – ключевого фермента синтеза норадреналина [5].

Симпатические нервные влияния играют ведущую роль в регуляции кровоснабжения кожи. При диабете регуляция кожного кровотока нарушается: происходит расширение артерио-венозных шунтов и, следовательно, уменьшение скорости кровотока в капиллярном русле кожи. Такие нарушения ведут к развитию тяжелой патологии, которая получила название «диабетическая стопа» [2].

Показано, что изменения нервной регуляции микроциркуляторного русла выяв-

* *Работа проводилась при поддержке гранта РФФИ № 10-04-01723-а.*

ляются еще до развития органических повреждений [6], однако механизмы таких изменений изучены мало. В частности, остается неясным, на каком уровне (пре- или постсинаптическом) происходят начальные изменения симпатической нейропередачи. Кроме того, хотя известно, что диабетические нарушения вазомоторной регуляции неодинаково проявляются в разных органах [7], на уровне отдельных сосудов резистивного типа этот вопрос изучен мало. В частности, на данный момент времени отсутствуют прямые доказательства нарушения нейрогенных реакций мелких артерий кожи. В связи с этим *целью данной работы* было исследованин влияния сахарного диабета 1 типа на механизмы симпатической нейропередачи в подкожной артерии (*a. saphena*), которая регулирует приток крови к стопе крысы.

Материалы и методы

Исследования проводили на самцах крыс Вистар в соответствии с правилами, установленными комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Инсулин-зависимый сахарный диабет вызывали путем введения стрептозотоцина (СТЗ, 65 мг/кг внутрибрюшинно), контрольным животным вводили растворитель (цитратный буфер, *pH* 4,5). Концентрацию глюкозы в крови измеряли глюкометром Super Glucocard II GT-1640 (Arkray Inc., Япония) до введения СТЗ и с 1-недельными интервалами в период развития диабетических патологий.

Через 10–12 недель после введения СТЗ крыс декапитировали гильотиной, из обеих задних конечностей выделяли сегменты подкожных артерий длиной 10–13 мм (начиная от ответвления подкожной артерии от бедренной). Одну из артерий использовали для исследования вазомоторных ответов в условиях перфузии с постоянным расходом. Для этого в концы выделенного сегмента вставляли две канюли и помещали препарат в термостатируемую (37єС) камеру, заполненную раствором, имевшим следующий состав (ммоль/л): NaCl 120; $NaHCO_3$ 26; KCl 4,5; $CaCl_2$ 1,6; $MgSO_4$ 1,0; NaH_2PO4 1,2; D-глюкоза 5,5; ЭДТА 0,025; HEPES 5,0. Раствор аэрировали смесью 95%O_2+5%CO_2 для поддержания *pH* 7,3–7,4. Постоянный поток раствора через сосуд (2 мл/мин) обеспечивался перистальтическим насосом (LKB, Швеция), при этом с помощью датчика BLPR2 (WPI, США) непрерывно измеряли давление перед входной канюлей. Постоянство потока контролировали с помощью ультразвукового флоуметра (Transonic System Inc. T106, датчик 1N).

В начале эксперимента после периода стабилизирующей перфузии (длительность – не менее 20 мин, что необходимо для расслабления гладкой мышцы) проводили разрушение эндотелия путем пропускания через просвет сосуда воздуха (3 мл в течение 2,5 мин). Во всех экспериментах действие норадреналина на в-адренорецепторы блокировали пропранололом (10^{-6} М).

Для раздражения интрамуральных нервных волокон с обеих сторон сосуда помещали платиновые электроды, между которыми пропускали импульсы тока с амплитудой 200 мА и длительностью 0,2 мс. Частота следования импульсов составляла от 2 до 15 Гц. Ответ сосуда на такую стимуляцию полностью блокировался тетродотоксином ($3 \cdot 10^{-6}$ М), т.е. сокращение было нейрогенным. Раздражение проводили в течение 60 с с интервалами в 4 мин. Далее исследовали чувствительность гладкой мышцы сосуда к норадреналину, медиатору симпатических нервов. Для этого норадреналин в возрастающих концентрациях кумулятивно добавляли в раствор, протекающий через сосуд.

Регистрацию и обработку данных проводили с помощью оригинальной программы на компьютере типа IBM PC с использованием 16-разрядного аналого-цифрового преобразователя E-14-140 (L-Card, Россия), частота оцифровки составляла 10 Гц. Величину вазоконстрикторных ответов оценивали по повышению перфузионного давления,

которое при постоянстве потока пропорционально увеличению гидравлического сопротивления сосуда.

В другой подкожной артерии исследовали сплетение адренергических нервных волокон. Для этого сегмент артерии помещали в 0,1 М фосфатно-солевой раствор (pH 7,2) с добавлением глиоксиловой кислоты (2%), сахарозы (10%) и понтамина небесно-голубого (0,03%). После 30-минутной инкубации препарат расправляли на предметном стекле, высушивали (30 мин под струей теплого воздуха, 5 мин при 100°С), заливали вазелиновым маслом и накрывали покровным стеклом. Исследование проводили на флуоресцентном микроскопе Axiovert-200 (Германия) при 40-кратном увеличении с использованием фильтра S25 (длина волны возбуждающего света – 380-440 нм, исследуемой люминесценции – 440-480 нм). Плотность сплетения нервных волокон оценивали, подсчитывая количество их пересечений с сеткой, наложенной на фотографию препарата. Сетка состояла из 40 маркеров, равномерно распределенных в поле зрения (326x258 мкм). Для оценки интенсивности флуоресценции нервных волокон изображения обрабатывали в программе WCIF ImageJ. В каждом поле зрения измеряли тотальную интенсивность флуоресценции и нормировали ее на уровень флуоресценции в фоне (на участках между волокнами). Обработку проводили для 9 полей зрения на каждом препарате.

Все использовавшиеся фармакологические препараты были получены из фирмы Sigma (США).

Статистический анализ данных проводили с использованием критерия Манна-Уитни. Все данные приведены в виде: среднее ± стандартная ошибка среднего.

Результаты исследований

Масса тела в начале эксперимента у двух групп крыс не различалась. В течение эксперимента масса тела контрольных крыс увеличилась на 70%, тогда как масса тела крыс с диабетом не изменилась (табл. 1).

Таблица 1

Масса тела и концентрация глюкозы в крови крыс на разных этапах эксперимента

Этапы эксперимента	Контроль (n=9)		Диабет (n=8)	
	Масса тела, г	Глюкоза, ммоль/л	Масса тела, г	Глюкоза, ммоль/л
Перед введением стрептозотоцина	239,7±7,8	5,3±0,2	247,4±10	5,3±0,2
Через неделю после введения стрептозотоцина	266,0±8,3	5,7±0,7	234,1±8	24,8±2,7*
В конце эксперимента	411,0±6,4	5,3±0,5	256,0±15,4*	26,4±2,1*

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с контролем.

Концентрация глюкозы в крови перед введением стрептозотоцина у всех крыс находилась в пределах физиологической нормы. Введение стрептозотоцина приводило к выраженной гипергликемии, которая сохранялась до конца эксперимента (табл. 1).

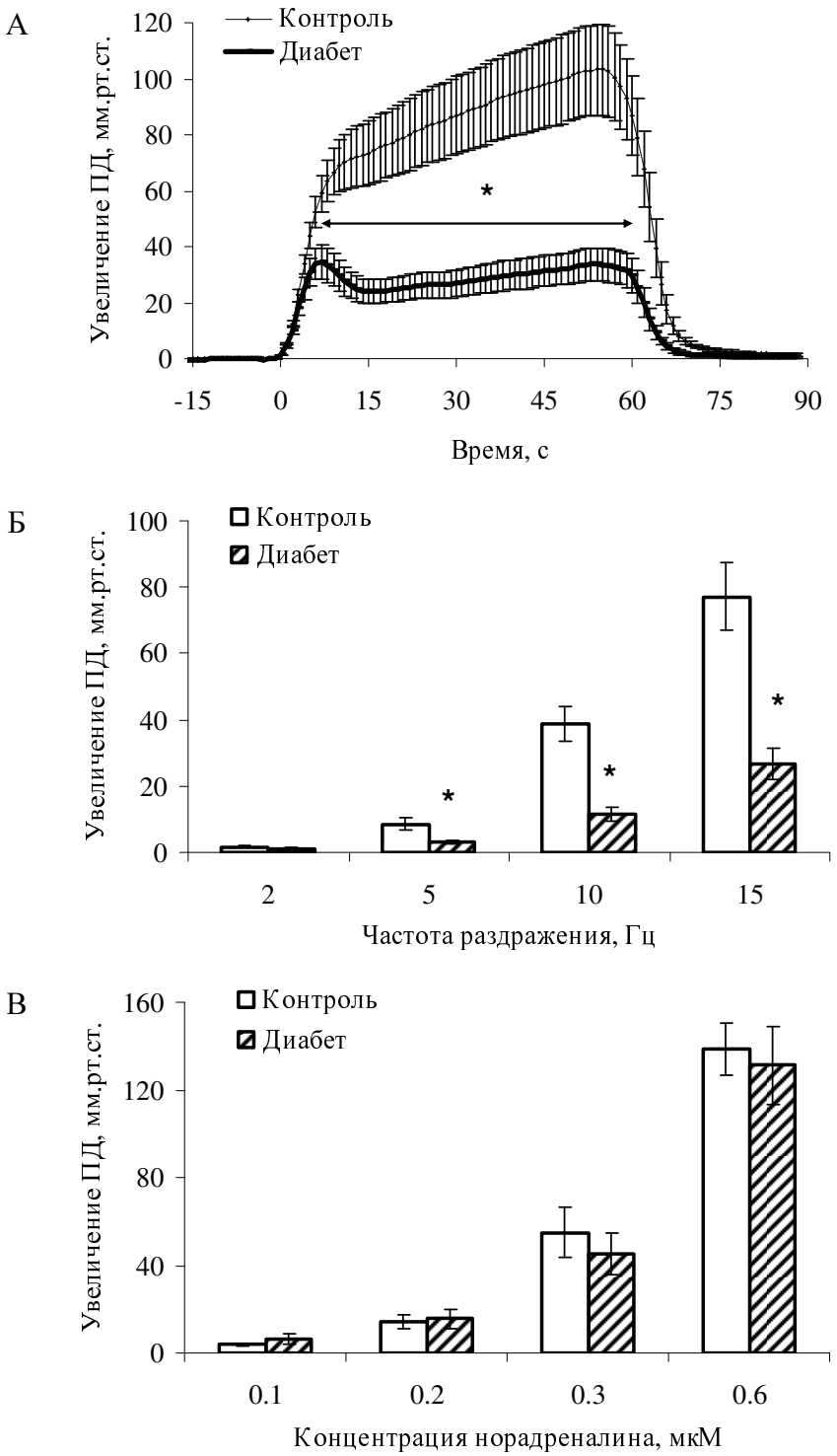

Рис. 1. А: Динамика развития констрикторного ответа подкожной артерии крысы при раздражении нервов с частотой 15 Гц (раздражению соответствует участок записи с 0 с по 60 с). Тонкая линия – группа «Контроль», толстая линия – группа «Диабет». Представлены результаты усреднения значений перфузионного давления для всех крыс каждой группы (шаг усреднения – 1 с). Б: Величина реакции, рассчитанная как среднее повышение перфузионного давления с 1 с по 60 с раздражения нервов. Белые столбики – группа «Контроль», заштрихованные столбики - группа «Диабет». В: Реакции подкожной артерии на экзогенный норадреналин у контрольных крыс (белые столбики) и у крыс с диабетом (заштрихованные столбики). На всех рисунках: ПД – перфузионное давление; * – $p<0,05$ по сравнению с контролем

В экспериментах на изолированной артерии уровень перфузионного давления в отсутствие констрикторных влияний составлял 30-40 мм рт.ст. и не различался у двух групп крыс, то есть анатомический просвет подкожной артерии при диабете не изменялся.

Раздражение симпатических нервов приводило к быстрому увеличению перфузионного давления (рис. 1А). При всех значениях частоты раздражения у крыс с диабетом нейрогенные ответы были уменьшенными по сравнению с контролем, при частоте 15 Гц – почти втрое (рис. 1Б). Кроме того, на рисунке 1А видно, что динамика констрикторной реакции у двух групп крыс существенно различается. У контрольных крыс первичный быстрый рост давления сменяется второй, более медленной, фазой нарастания. У крыс с диабетом давление сначала также повышается, но далее не растет, в результате наиболее выраженное различие реакций между двумя группами крыс наблюдается к концу 60-секундного периода раздражения.

В отличие от нейрогенных ответов (рис. 1Б), реакции на экзогенный норадреналин у контрольных крыс и крыс с диабетом не различались (рис. 1В).

Кроме того, нами не обнаружено морфологических изменений периартериального сплетения адренергических нервных волокон. Плотность сплетения (количество пересечений нервных волокон с сеткой в пересчете на 10000 мкм^2) в артериях крыс контрольной группы составила 2,10±0,07, а в артериях крыс с диабетом – 2,08±0,14 (p>0,05). Тотальная интенсивность флуоресценции нервного сплетения в контроле и при диабете составила 1,47±0,11 у.е. и 1,38±0,08 у.е., соответственно (p>0,05).

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инсулин-зависимый сахарный диабет приводит к существенному снижению вазомоторных ответов подкожной артерии крысы на раздражение симпатических нервных волокон. Это наблюдение согласуется с данными литературы об уменьшении нейрогенного сокращения хвостовой артерии [8] и сосудистого бассейна брыжейки [9] у крыс с индуцированным стрептозотоцином диабетом. Однако следует отметить, что уменьшение нейрогенных ответов артерий, приносящих кровь к стопе, показано нами впервые.

Для исследования адренергического сужения сосудов при диабете мы старались минимизировать влияние других факторов на нейрогенный ответ. Во-первых, устраняли влияние сосудистого эндотелия, секреторная функция которого при диабете изменяется [10]. Во-вторых, блокировали в-адренорецепторы, путем влияния на которые норадреналин вызывает расширение сосудов. Это представлялось важным, поскольку в предыдущих исследованиях было показано уменьшение чувствительности этих рецепторов при диабете [11].

Обнаруженное нами изменение динамики развития нейрогенного ответа может отражать влияние диабета на медиаторные характеристики нервных волокон. Известно, что наряду с норадреналином из постганглионарных симпатических волокон выделяется аденозинтрифосфат, причем его действие проявляется именно в первой фазе нейрогенного ответа: в виде собственного сосудосуживающего эффекта или потенцирования адренергического сокращения [12].

Ранее было показано, что у крыс с индуцированным стрептозотоцином сахарном диабетом уменьшение нейрогенного сокращения хвостовой артерии связано с ослаблением только адренергического компонента реакции, тогда как пуринергический компонент не уменьшается или даже может увеличиваться [13]. Таким образом, выраженное

снижение второй фазы ответа на раздражение нервов говорит в пользу уменьшения адренергического компонента нервной регуляции сосудов при диабете.

Для анализа механизмов этого явления, а именно выявления возможных изменений симпатической нейропередачи на постсинаптическом уровне, мы исследовали реакции артерий на экзогенный норадреналин. В результате оказалось, что адренореактивность гладкомышечных клеток в подкожной артерии крыс с диабетом не изменена. Данные литературы по этому вопросу довольно противоречивы. Есть сообщения о том, что сокращение артерий при действии б-адреномиметиков у крыс с диабетом может оставаться неизменным [9], уменьшаться [14] или же увеличиваться [10]. По-видимому, характер изменений постсинаптической адреночувствительности определяется длительностью развития диабетической васкулопатии или же типом сосудистого русла.

Отсутствие изменений в реактивности сосудов на норадреналин в нашей работе говорит о том, что снижение нейрогенных ответов у крыс с диабетом обусловлено изменением пресинаптических механизмов симпатической нейропередачи. Однако при исследовании периартериального сплетения симпатических волокон мы не обнаружили различий в плотности сплетения между двумя группами животных, хотя возможность таких изменений в артериальных сосудах некоторых органов описана в литературе [7].

Интенсивность флуоресценции периартериального нервного сплетения в препаратах, окрашенных глиоксиловой кислотой, отражает содержание норадреналина в нервных волокнах [15]. Развитие диабета может приводить к уменьшению содержания норадреналина в сосудистой стенке [8] в результате нарушения его синтеза в нервных волокнах [5]. Однако в нашей работе тотальная флуоресценция сплетения нервных волокон не была изменена, как и в некоторых из предыдущих работ [13].

Таким образом, обнаруженное в нашей работе уменьшение реакции артерий на раздражение симпатических нервов не было сопряжено с разреживанием сплетения нервных волокон или уменьшением содержания в них медиатора. Вероятно, морфологические изменения вазомоторной иннервации артерий кожи развиваются на более позднем сроке диабетической нейропатии. На начальном этапе развития патологии наблюдаются более тонкие функциональные изменения вазомоторной иннервации, что проявляется в нарушении механизмов сопряжения возбуждения наружной мембраны и секреции медиатора [3].

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что сахарный диабет 1 типа оказывает выраженное влияние на пресинаптические механизмы симпатической нейропередачи, в то время как гладкая мышца сосудов менее подвержена изменениям. На исследованном нами сроке развития диабета наблюдаются функциональные, а не структурные изменения симпатической иннервации артерий, приносящих кровь к коже стопы.

Примечания:

1. Tack C.J., van Gurp P.J., Holmes C, Goldstein D.S. Local sympathetic denervation in painful diabetic neuropathy // Diabetes. 2002. Vol. 51, No. 12. P. 3545-3553.
2. Boulton A.J. The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture //

References:

1. Tack C.J., van Gurp P.J., Holmes C, Goldstein D.S. Local sympathetic denervation in painful diabetic neuropathy // Diabetes. 2002. Vol. 51, No. 12. P. 3545-3553.
2. Boulton A.J. The diabetic foot: from art to science. The 18th Camillo Golgi lecture //

Diabetologia. 2004. Vol. 47, No. 8. P. 1343-1353.

3. Verkhratsky A., Fernyhough P. Mitochondrial malfunction and Ca2+ dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes // Cell Calcium. 2008. Vol. 44, No. 1. P. 112-122.
4. Cohen R.A, Tesfamariam B., Weisbrod R.M., Zitnay K.M. Adrenergic denervation in rabbits with diabetes mellitus // Am. J. Physiol. 1990. Vol. 259, No. 1. Pt. 2. P. 55-61.
5. Webster G.J., Petch E.W., Cowen T. Streptozotocin-induced diabetes in rats causes neuronal deficits in tyrosine hydroxylase and 5-hydroxytryptamine specific to mesenteric perivascular sympathetic nerves and without loss of nerve fibers // Exp. Neurol. 1991. Vol. 113, No. 1. P. 53-62.
6. Sun P.C., Chen C.S., Kuo C.D., Lin H.D., Chan R.C., Kao M.J., Wei S.H. Impaired microvascular flow motion in subclinical diabetic feet with sudomotor dysfunction // Microvasc. Res. 2012. Vol. 83, No.2. P. 243-248.
7. Dhital K., Lincoln J., Appenzeller O., Burnstock G. Adrenergic innervation of vasa and nervi nervorum of optic, sciatic, vagus and sympathetic nerve trunks in normal and streptozotocin-diabetic rats // Brain Res. 1986. Vol. 367, No. 1-2. P. 39-44.
8. Hart J.L., Freas W., McKenzie J.E., Muldoon S.M. Adrenergic nerve function and contractile activity of the caudal artery of the streptozotocin diabetic rat // J. Auton. Nerv. Syst. 1988. Vol. 25, No. 1. P. 49-57.
9. Ralevic V., Belai A., Burnstock G. Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed // Eur. J. Pharmacol. 1995. Vol. 286, No. 2. P. 193-199.
10. Yousif M.H., Benter I.F., Dunn K.M., Dahly-Vernon A.J., Akhtar S., Roman R.J. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in altering vascular reactivity in diabetes // Auton. Autacoid Pharmacol. 2009. Vol. 29, No. 1-2. P. 1-12.
11. Mayhan W.G. Effect of diabetes mellitus on responses of the rat basilar artery to activation of beta-adrenergic receptors // Brain Res. 1994. Vol. 659, No. 1-2. P. 208-212.
12. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends Pharmacol. Sci. 2006. Vol. 27, No. 3. P. 166-176.
13. Speirs L., Donnelly A., Lynch J., Scholfield

Diabetologia. 2004. Vol. 47, No. 8. P. 1343-1353.

3. Verkhratsky A., Fernyhough P. Mitochondrial malfunction and Ca2+ dyshomeostasis drive neuronal pathology in diabetes // Cell Calcium. 2008. Vol. 44, No. 1. P. 112-122.
4. Cohen R.A, Tesfamariam B., Weisbrod R.M., Zitnay K.M. Adrenergic denervation in rabbits with diabetes mellitus // Am. J. Physiol. 1990. Vol. 259, No. 1. Pt. 2. P. 55-61.
5. Webster G.J., Petch E.W., Cowen T. Streptozotocin-induced diabetes in rats causes neuronal deficits in tyrosine hydroxylase and 5-hydroxytryptamine specific to mesenteric perivascular sympathetic nerves and without loss of nerve fibers // Exp. Neurol. 1991. Vol. 113, No. 1. P. 53-62.
6. Sun P.C., Chen C.S., Kuo C.D., Lin H.D., Chan R.C., Kao M.J., Wei S.H. Impaired microvascular flow motion in subclinical diabetic feet with sudomotor dysfunction // Microvasc. Res. 2012. Vol. 83, No.2. P. 243-248.
7. Dhital K., Lincoln J., Appenzeller O., Burnstock G. Adrenergic innervation of vasa and nervi nervorum of optic, sciatic, vagus and sympathetic nerve trunks in normal and streptozotocin-diabetic rats // Brain Res. 1986. Vol. 367, No. 1-2. P. 39-44.
8. Hart J.L., Freas W., McKenzie J.E., Muldoon S.M. Adrenergic nerve function and contractile activity of the caudal artery of the streptozotocin diabetic rat // J. Auton. Nerv. Syst. 1988. Vol. 25, No. 1. P. 49-57.
9. Ralevic V., Belai A., Burnstock G. Effects of streptozotocin-diabetes on sympathetic nerve, endothelial and smooth muscle function in the rat mesenteric arterial bed // Eur. J. Pharmacol. 1995. Vol. 286, No. 2. P. 193-199.
10. Yousif M.H., Benter I.F., Dunn K.M., Dahly-Vernon A.J., Akhtar S., Roman R.J. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid in altering vascular reactivity in diabetes // Auton. Autacoid Pharmacol. 2009. Vol. 29, No. 1-2. P. 1-12.
11. Mayhan W.G. Effect of diabetes mellitus on responses of the rat basilar artery to activation of beta-adrenergic receptors // Brain Res. 1994. Vol. 659, No. 1-2. P. 208-212.
12. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter // Trends Pharmacol. Sci. 2006. Vol. 27, No. 3. P. 166-176.
13. Speirs L., Donnelly A., Lynch J., Scholfield

C.N., Johnson C. ATP and norepinephrine contributions to sympathetic vasoconstriction of tail artery are altered in streptozotocin-diabetic rats // Am. J. Physiol. 2006. Vol. 291, No. 5. P. 2327-2333.

14. Misurski D.A., Hopfner R.L., Gopalakrishnan V. Attenuated agonist evoked vasoconstrictor responses in the perfused mesenteric vascular bed of streptozotocin diabetic rats // Exp. Biol. Med. 2001. Vol. 226, No. 10. P. 940-946.
15. Furness J.B., Costa M. The use of glyoxylic acid for the fluorescence histochemical demonstration of peripheral stores of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in whole mounts // Histochemistry. 1975. Vol. 41, No. 4. P. 335-352.

C.N., Johnson C. ATP and norepinephrine contributions to sympathetic vasoconstriction of tail artery are altered in streptozotocin-diabetic rats // Am. J. Physiol. 2006. Vol. 291, No. 5. P. 2327-2333.

14. Misurski D.A., Hopfner R.L., Gopalakrishnan V. Attenuated agonist evoked vasoconstrictor responses in the perfused mesenteric vascular bed of streptozotocin diabetic rats // Exp. Biol. Med. 2001. Vol. 226, No. 10. P. 940-946.
15. Furness J.B., Costa M. The use of glyoxylic acid for the fluorescence histochemical demonstration of peripheral stores of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine in whole mounts // Histochemistry. 1975. Vol. 41, No. 4. P. 335-352.