

Ю.В. Мартовицька

Імуноморфологічна та морфометрична характеристика змін мікросудин і нервів нижніх кінцівок хворих на цукровий діабет типу 2

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: цукровий діабет, ангіопатія, мікросудини.

У роботі досліджено особливості ранніх змін мікросудин та нервів нижніх кінцівок у хворих на цукровий діабет з нейро-ішемічною формою діабетичної стопи за допомогою імуноморфологічних та морфометричних методів. Визначено критерії ранніх змін ендотеліальних клітин, структури базальних мембран мікросудин та закономірності морфологічних змін структури ендоневральних судин, пошкодження яких обумовлює невропатичний компонент синдрому діабетичної стопи.

Иммунорфологическая и морфометрическая характеристика изменений микрососудов и нервов нижних конечностей больных сахарным диабетом типа 2

Ю.В. Мартовицкая

В работе исследованы особенности ранних изменений микрососудов и нервов нижних конечностей у больных сахарным диабетом с нейро-ишемической формой диабетической стопы с помощью иммуноморфологических и морфометрических методов. Установлены критерии ранних изменений эндотелиальных клеток, структуры базальных мембран микрососудов и закономерности морфологических изменений эндоневральных сосудов, повреждение которых обуславливает невропатический компонент синдрома диабетической стопы.

Ключевые слова: сахарный диабет, ангиопатия, микрососуды.

Патологія. – 2009. – Т.6., №1. – С. 59-61

Immunomorphological and morphometrical changes of the Microvasculature and Nerves of lower extremities in diabetic patients type 2

Yu.V. Martovitskaya

During scientific work features of early changes of micro-vessels and nerves of lower extremities in diabetic patients with neuro-ischemic form of diabetic foot were explored by the immunomorphological and morphometrical methods. There were distinguished criteria of early changes of endothelial cells, structures of basal membranes of micro-vessels and conformity of morphological changes of endoneural vessels, damage of which stipulates neurological component of diabetic foot syndrome.

Keywords: diabetes mellitus, angiopathia, micro-vessels.

Patologia. 2009; 6(1): 59-61

Пошкодження мікросудин є найпоширенішою клініко-морфологічною ознакою цукрового діабету, що приводить до тяжких ускладнень, зниження якості життя хворих та до втрати працездатності. Діабетична мікроангіопатія (ДМАП) судин нижніх кінцівок приводить до звуження їх просвіту і обмежує розвиток колатерального кровообігу, та у поєднанні з поразкою периферичних нервів сприяє розвитку ішемії кінцівок і розвитку синдрому діабетичної стопи (СДС). До теперішнього часу не вивчені початкові молекулярно-клітинні механізми розвитку ДМАП для ранньої діагностики її розвитку та своєчасної профілактики незворотних змін в мікросудинах хворих.

Мета роботи: визначення імуноморфологічних та морфометричних особливостей змін мікросудин і нервів нижніх кінцівок хворих на цукровий діабет типу 2.

Об'єкт дослідження. Для вивчення патології мікроциркуляторного русла та периферичної нервової системи у хворих на ЦД проведено гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне та комп'ютерноморфометричне дослідження ампутованих кінцівок 46 хворих з синдромом діабетичної стопи. Середній вік хворих становив 52 роки, співвідношення жінки/чоловіки становило 1/1,4. Групу порівняння склали дослідження кінцівок 40 померлих хворих з інших причин, не пов'язаних з цукровим діабетом і пошкодженням нижніх кінцівок. Середній вік хворих групи порівняння склав 58 років.

Методи дослідження. Дослідження мікросудин нижніх кінцівок проводили на п'яти рівнях:

1) по задній поверхні гомілки – на 7-8см нижче підколінної ямки, на глибині a.tibialis posterior та поверхневій зоні м'яких тканин;

2) по передній поверхні гомілки – середина передньо-латеральної поверхні гомілки, на глибині a.tibialis anterior та поверхневій зоні;

3) передньо-латеральна поверхня гомілковостопного суглобу в зоні a.malleolaris anterior lateralis;

4) тильна поверхня стопи, дистальна частина, на рівні міжпальцевого проміжку (aa.metatarsae dorsales);

5) підошовна поверхня – дистальна частина, на рівні aa. metatarsae plantares. Для гістологічного дослідження шматочків тканин кінцівок фіксували у забуференому 5-10% розчині нейтрального формаліну і заливали в парафін. На прецезійному ротаційному мікромомі НМ 3600 (Німеччина) виготовлялись серійні зрізи, які забарвлювались за стандартною методикою гематоксилином і еозином, трикольоровим методом Масона та методом Ван-Гізона. Імуногістохімічним непрямим імунопероксидазним методом з використанням систем візуалізації DAKO EnVision та DAKO CSA System (Данія) на парафінових зрізах формалін-фіксованої тканини виявляли активовані клітини ендотелію капілярів, артеріол та венул антитілами до CD-105-антигену, активовані міофібробласти - антитілами до гладком'язового актину (α -SMA), а також нефібрилярний

колаген IV типу базальних мембран (БМ) - антитілами до колагену IV типу. В мікроскопі Axioplan 2 (Karl Zeiss, Німеччина) з відеокамерою DXC-151A (Sony, Японія) методом комп'ютерного цифрового аналізу зображення з використанням пакета програм KS200 (Kontron Elektronik, Німеччина) проводилося комп'ютерно-морфометричне визначення товщини стінки та просвіту судин видалених нижніх кінцівок. Кількісні дані оброблялись статистично на комп'ютері "Athlon-1000" з використанням програмного пакету STATISTICA 6.0 для Windows. Обчислювалася середня арифметична величина (M), середнє квадратичне відхилення (б) і стандартна помилка середньої арифметичної (S). Достовірність відмінностей порівнюваних величин визначалася за допомогою критерію Ст'юдента (T). За достовірну мінімальну вірогідність відмінностей бралася $P < 0,05$. Проводився також кореляційний аналіз з використанням коефіцієнта кореляції Пірсона (r).

Отримані результати. Патологічні зміни при діабетичній мікроангіопатії (ДМАП) розвиваються у всіх структурних елементах судинної стінки: ендотеліальних клітинах (ЕК), базальній і еластичній мембранах, гладком'язових клітинах (ГМК), волокнистих структурах, перицитах і адвентиції. Для визначення превалювання патоморфологічного процесу у генезі мікроангіопатій та нейропатій при ЦД типу 2 досліджено імуноморфологічну характеристику структури базальної мембрани, стан ендотеліальних клітин та активність гладком'язових клітин судинної стінки.

У 82% досліджених мікросудин у хворих з нейроішемічною формою діабетичної стопи відзначено звуження просвіту судини та потовщення судинної стінки до $0,53 \pm 0,01$ мкм (при $1,02 \pm 0,05$ в групі порівняння), обумовлене послідовними багаторівневими метаболічними розладами в стінках судин.

За даними [3, 5, 6, 7, 17, 19] в генезі змін структури судинної стінки значну роль відіграє ендотеліальна дисфункція з втратою продукції ендотеліального оксиду азоту та зростання активності про-запального транскрипційного ядерного фактору κB (NF- κB), що приводить до експресії лейкоцитарних молекул адгезії і надлишкової продукції цитокінів та хемокінів.

Надлишок внутрішньоклітинної глюкози ендотеліоцитів є ініціатором продукції активного кисню, який інактивує ендотеліальну синтазу оксиду азоту та активує формування пероксинітриду з залишків оксиду азоту [3, 4, 5, 6]. Метаболічні розлади в ЕК віддзеркалюються в морфологічних особливостях структури ЕК, так в мікросудинах з потовщеною та деформованою базальною мембраною ЕК експресія CD105 слабка або зовсім відсутня, в цитоплазмі ЕК накопичуються гранули ліпофусцину, частина ендотеліоцитів десквамується. Порушення структури та функції ЕК зі зниження продукції ендотеліального оксиду азоту та його деструкція приводять до порушення ендотеліально-залежної вазодилатації та дисрегуляції ГМК, що морфологічно проявляється

звуженням просвіту та потовщенням стінки судин.

Такі зміни активують міграцію гладком'язових клітин судинної стінки до інтими з ймовірною трансформацією їх нових поколінь у макрофаги. Активація ГМК є вибірконим процесом, так у хворих на ЦД типу 2 в стінках мікросудин шкіри виявляли клітини, що одночасно експресують CD105 та α -SMA. Клітини з подвійною експресією CD105 та α -SMA розташовані в мікросудинах з мінімальним потовщенням стінки та БМ під ендотеліальними клітинами, що свідчить про початкові морфологічні зміни судинної стінки при цукровому діабеті.

Основними білковими складовими БМ є фібрилярні колагени інтерцелюлярного матриксу I, II, III, V типів та нефібрилярний колаген IV типу базальної мембрани, які суттєво впливають на стан ендотеліальних клітин судин [13, 19]. При дослідженні БМ мікросудин нижніх кінцівок виявили їх нерівномірне потовщення, особливо у зонах найбільшого пошкодження ендотеліальних клітин. При імуногістохімічному дослідженні структури судинної стінки відмітили зворотну залежність ($r = -0,32$) експресії CD105 від рівня потовщення БМ судин та виразності позитивної реакції з антитілами до колагену IV типу БМ.

Потовщення БМ мікросудин обумовлене накопиченням PAS- позитивних білків, нерівномірним розподілом колагену IV типу, вогнищами деструкції ЕК з формуванням пристіночних клітинно-білкових агрегатів. За даними багатьох досліджень [4, 7, 8, 13] підвищена експресія трансформуючого фактору росту в ендотелії, регуляторних T-клітинах (CD-25 і CD-4 позитивних), перицитах і ГМК різко підвищує синтетичний фенотип цих клітин і приводить до накопичення надмірної кількості колагену IV типу в мікросудинах.

Особливе значення цих процесів полягає у порушенні конформаційних взаємин між протеогліканами та іншими компонентами БМ, що в результаті приводить до клітинної адгезії та спотворює повноцінну регенерацію пошкоджених ЕК і ГМК мікросудин. Таким чином, колаген IV типу діє антиангіогенно, оскільки порушується його структура, самоагрегація мембранних матриксних молекул та міжмолекулярні взаємозв'язки БМ у хворих на ЦД типу 2, а ініціаторним фактором такого процесу є морфо-функціональні зміни ЕК. Порушення взаємодії між білками БМ не тільки посилює підвищення неспецифічної мембранної проникності, але і перешкоджає регенерації пошкоджених структур мікросудин.

Патогенез мікроангіопатій пов'язаний і з накопиченням в судинних стінках PAS-позитивних речовин, ліпопротеїдів низької щільності (ЛПНЩ), активізацією процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), збільшенням утворення вільних радикалів, сповільненням синтезу простагліну, який має антиагрегантні і судинорозширювальну властивості [1, 2, 11, 13, 17]. Певне значення має порушення нейрогенної регуляції мікроциркуляторного кровотоку [9, 10], що приводить до спазму прекапілярів

та скидання крові по артеріовенозних шунтах, минаючи капілярний кровообіг, що особливо актуально для діабетичної поразки стоп.

Нейрогенний компонент, обумовлений зменшенням кількості ламініну в БМ та потовщенням мієлінової оболонки за рахунок збільшення колагену IV типу, приводить до порушення архітекtonіки та пригнічення регенерації нервових волокон.

Істотну роль у розвитку нейропатії кінцівок у хворих на ЦД типу 2 відіграє поразка судин нервових волокон. Нами визначено тотальну відсутність експресії антигену CD105 в артеріолах нервових стволів при наявності виразного накопичення колагену IV типу в БМ артеріол. Наслідком потовщення БМ судин нервів та пригнічення активації ендотелію мікросудин є хронічна гіпоксія нерва.

Прогресування мікроангіопатії приводить до зниження ендоневрального кровотоку, та до пропорційного зниження тиску кисню і судинної резистентності. Дисгемічна гіпоксія при ЦД перемикає енергетичний метаболізм нервів на анаеробний гліколіз, позначений крайньою неефективністю, оскільки при ньому з 1 молекули глюкози утворюються 2 молекули АТФ. Таким чином, розвивається кисневе і енергетичне голодування нерва.

Висновки

1. При нейро-ішемічній формі діабетичної стопи у хворих на цукровий діабет типу 2 ендотеліальні клітини мікросудин з потовщеною та деформованою базальною мембраною не експресують CD105.

2. Ступінь деформації БМ судин та накопичення колагену IV типу в стінках мікросудин зворотно пропорціональні кількості активованих ендотеліальних клітин, що експресують на своїй поверхні CD105 ($r = -0,32$).

3. В мікросудинах з мінімальними морфологічними проявами діабетичної ангіопатії виявляються клітини з подвійною експресією CD105 та α -SMA, що є проявами початкових морфологічних змін судинної стінки.

4. Нейропатичний компонент синдрому діабетичної стопи у хворих на цукровий діабет типу 2 обумовлений пошкодженням ендоневральних мікросудин зі зміною структури ендотелію та БМ - тотальна відсутність експресії антигену CD105 при наявності виразного накопичення колагену IV типу в БМ, що приводить до хронічної ішемії нерву.

Література

1. Балаболкин М.И., Колебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей).-М: Медицина, 2005. -511с.
2. Салтыков Б.Б., Кауфман О.Я., Великов В.К., Шубина О.И. Морфогенез диабетической микроангиопатии // Архив патологии.- 1991.- № 7.- С.60-65.

3. Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice //Proc Natl Acad Sci USA.-2000.-Vol.97, №17.-P.9747-52.

4. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications //Diabetes Care.-1992.-Vol.15, №12.-P.1835-1843.

5. Bucala R., Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease //American Journal of Kidney Disease.-1995.-Vol.26, №6.-P.875-888.

6. Endemann D. H., Schiffrin E. L. Endothelial Dysfunction //Journal of Am. Soc. Nephrology.-2004.-Vol.15, №8.-P.1983-1992.

7. Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Parkington HC, Head GA, Evans RG. Endothelial dysfunction and arterial pressure regulation during early diabetes in mice: roles for nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor //American J Physiol Regul Integr Comp Physiol.-2007.-Vol.23, №2.-P.241-248.

9. Hosotani H, Ohashi Y, Yamada M, Tsubota K. Reversal of abnormal corneal epithelial cell morphologic characteristics and reduced corneal sensitivity in diabetic patients by aldose reductase inhibitor, CT-112 //Am J Ophthalmol.- 1995.- Vol.119, №4.-P.288-294.

10. John L. Culleton Preventing diabetic foot complications // Postgraduate medicin - 1999, Vol.106 – P. 107-119.

11. Kennedy, WR, Wendelschafer-Crabb, G, Johnson, T. (1996) Quantitation of epidermal nerves in diabetic neuropathy //Neurology 47,1042-1048

12. Lavi S., Gaitini D., Milloul V., Jacob G. Impaired cerebral CO₂ vasoreactivity: association with endothelial dysfunction //Am J Physiol Heart Circ Physiol.-2006.-Vol.291, №4.-P.56-61.

13. Lloyd CE, Orchard TJ. Diabetes complications: the renal-retinal link //Diabetes Care.-1995.- Vol. 18, №1.-P.1034-1036.

14. Mark A. Creager, Thomas F. Lusher Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. Part I // Circulation – 2003, Vol.108 – P.1527-1532.

15. McKnight JA Assessing vascular risk in people with Type 1 diabetes: implications for the effectiveness of statin therapy //Diabet Med.- 2007.-Vol. 24, №6.-P.575-578.

16. Miyazaki Y, He H, Mandarino LJ, DeFronzo RA Rosiglitazone improves downstream insulin-receptor signaling in type 2 diabetic patients // Diabetes - 2003, Vol.52. – P.1943-1950.

17. Munivappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MG. Cardiovascular Actions of Insulin //Endocrine Review.-2007.-Vol.38, №24.-P.143-148.

18. Ptak, W.; Klimek, M.; Bryniarski, K.; Ptak, M. & Majcher, P. Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals // Clin. Exper. Immunology.-1998.-Vol. 11, №4.-P.13-18.

19. R. Gianani*, A. Putnam, T. Still, L. Yu, D. Miao, R. G. Gill, J. Beilke, P. Supon, A. Valentine, A. Iveson, S. Dunn, G. S. Eisenbarth, J. Hutton, P. Gottlieb, A. Wiseman Initial results of screening of non - diabetic organ donors for expression of islet autoantibodies // Diabetes - 2006, Vol.36. – P.148-1962

20. Tooke J. E., Goh K. L. Vascular function in Type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: the case for intrinsic endotheliopathy// Diabetic Medicine.-2006.-Vol.16, №9, P. 710-715.

Відомості про автора:

Мартовицька Юлія Валеріївна, к.мед.н., асистент кафедри патологічної анатомії та судової медицини з основами права.

Контактний телефон: 99-52-04