

УДК 616.611.018-02:616.37-008.64]-092.9

Т.М. Бойчук, М.І. Грицюк, І.С. Давиденко

## ГІСТОХІМІЧНІ ДАНІ ЩОДО ПОРУШЕННЯ ОКРЕМИХ СТРУКТУР КЛУБОЧКІВ НИРОК ЩУРІВ НА РАННІХ ТЕРМІНАХ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці

**Резюме.** У статті розкрито гістохімічний підхід щодо оцінки змін білкових аміногруп при застосуванні різної методики забарвлення гістологічних зрізів. Виявлено різну послідовність ураження аміногруп білків у

клубочках нирок щурів на ранніх термінах розвитку експериментального цукрового діабету.

**Ключові слова:** нирки, глікозилювання, аміногрупи, цукровий діабет.

**Вступ.** Цукровий діабет (ЦД) та діабетична нефропатія, як одне з тяжких та прогностично несприятливих його ускладнень, посідає лідируючі позиції серед причин термінальної ниркової недостатності у країнах Європи та США [4, 9, 13]. У центрі уваги багатьох дослідницьких груп виявилися дисфункції клубочкового апарату нирок – епітеліальних, ендотеліальних та мезангіальних клітин у патогенезі діабетичного ураження нирок [2, 5, 6, 11, 12].

Рання інвалідизація та висока смертність хворих на ЦД, пов'язана з його ускладненнями, зумовлює необхідність вирішення питань первинної і вторинної профілактики [7, 8, 10, 14]. Саме тому питання активного виявлення і своєчасного лікування ускладнень ЦД на ранніх стадіях залишаються актуальними [8, 15, 16].

При цукровому діабеті серед механізмів uszkodження задіяні такі два незалежні процеси: 1) неферментативне глікозилювання білків, 2) окисна модифікація білків. Обидва процеси характеризуються зменшенням числа аміногруп білків.

Існує гістохімічний підхід, який дозволяє провести оцінку щодо білкових аміногруп. Підхід ґрунтується на застосуванні методики забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім, коли по-різному забарвлюються білки із різним співвідношенням аміно- та карбоксильних груп. Зокрема, якщо в білку переважають аміногрупи – забарвлення характеризується синім кольором, а якщо карбоксильні – то червоним [3].

Колір оцінюють кількісно на цифрових мікрофотографіях при застосуванні системи RGB за допомогою комп'ютерної мікроспектрофотометрії, зокрема на основі коефіцієнта R/B. Такі дослідження при цукровому діабеті на даний час ще не виконувалися [3].

**Мета дослідження.** Гістохімічним методом встановити кількісні параметри співвідношення між аміно- та карбоксильними групами білків у різних структурах клубочків нирок щурів на ранніх етапах розвитку експериментального ЦД.

**Матеріал і методи.** Експеримент проведено на 24 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів, масою 0,18 – 0,20 кг. Тварин розподіляли на три групи. Перша (I) – контрольна група (n=7),

яка перебувала на стандартному режимі годування, освітлення та утримання. Дослідним групам тварин (II – n=8 та III – n=9) одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотоцин (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг [1]. У другій групі тварин забій та відповідні дослідження проводили через 11 діб після уведення стрептозоточину, показники тварин третьої групи досліджували через 21 добу відповідно.

Для дослідження основних показників функцій нирок забій тварин проводили під легким ефірним знеболенням. Кількісну оцінку стану білків у гістохімічних препаратах, забарвлених бромфеноловим синім за Mikel Calvo, здійснювали методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії на основі коефіцієнта R/B. Розбіжності між групами дослідження здійснювали згідно з методом Стьюдента.

**Результати дослідження та їх обговорення.** У клубочках нирок, забарвлених бромфеноловим синім, розрізнялися наступні структури: ендотеліоцити разом із субендотеліальною базальною мембраною, мезангіоцити з мезангіальним матриксом, подоцити, базальна мембрана капсули Боумена (рис.).

Оскільки ЦД є патологією, яка відома розвитком ангіопатій, у першу чергу буда звернута увага на ендотеліоцити та субендотеліальну базальну мембрану капілярів ниркових клубочків. Вони візуально характеризувалися інтенсивним забарвленням із деяким переважанням червоного кольору. Цей суб'єктивний висновок підтверджений за допомогою вищевказаного кількісного дослідження на основі комп'ютерної мікроспектрофотометрії, адже коефіцієнт R/B завжди був вищим за одиницю.

В ендотеліоцитах разом із субендотеліальною базальною мембраною коефіцієнт R/B становив: в інтактних тварин –  $1,09 \pm 0,014$ , у дослідних тварин на 11-ту добу експерименту –  $1,10 \pm 0,018$  ( $p > 0,05$ ), на 21-шу добу –  $1,38 \pm 0,012$  ( $p < 0,01$ ) (табл. 1).

Для мезангіоцитів із мезангіальним матриксом отримані такі дані: в інтактних тварин –  $1,13 \pm 0,019$ , у дослідних тварин на 11-ту добу –  $1,49 \pm 0,017$  ( $p < 0,001$ ), на 21-шу добу –  $1,68 \pm 0,016$  ( $p < 0,001$ ) (табл. 2).

Таблиця 1

**Коефіцієнт R/B у базальних мембран ниркових клубочків разом з ендотеліоцитами при експериментальному цукровому діабеті в різні терміни експерименту ( $X \pm s_x$ )**

Назва групи	Коефіцієнт R/B	Вірогідність розбіжності (P) з інтактними тваринами та в динаміці
Інтактні (n=7)	1,09±0,014	
1. Дослідна група (11-та доба після уведення стрептозотоцину) (n=8)	1,10±0,018	Pi>0,05
2. Дослідна група (21-ша доба після уведення стрептозотоцину) (n=9)	1,38±0,012	Pi<0,001 P11<0,001

Примітка. Pi – вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин, P11 – вірогідність розбіжності з групою на 11-ту добу

Таблиця 2

**Коефіцієнт R/B у мезангіальному матриксі та мезангіоцитах при експериментальному цукровому діабеті в різні терміни експерименту ( $X \pm s_x$ )**

Назва групи	Коефіцієнт R/B	Вірогідність розбіжності (P) з інтактними тваринами та в динаміці
Інтактні	1,13±0,019	
1. Дослідна група (11-та доба після уведення стрептозотоцину)	1,49±0,017	Pi<0,001
2. Дослідна група (21-ша доба після уведення стрептозотоцину)	1,68±0,016	Pi<0,001 P11<0,001

Примітка. Pi – вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин, P11 – вірогідність розбіжності з групою на 11-ту добу

Таблиця 3

**Коефіцієнт R/B у базальній мембрані капсули Боумена при експериментальному цукровому діабеті в різні терміни експерименту ( $X \pm s_x$ )**

Назва групи	Коефіцієнт R/B	Вірогідність розбіжності (P) з інтактними тваринами та в динаміці
Інтактні	1,11±0,012	
1. Дослідна група (11-та доба після уведення стрептозотоцину)	1,13±0,019	Pi>0,05
2. Дослідна група (21-ша доба після уведення стрептозотоцину)	1,39±0,014	Pi<0,001 P11<0,001

Примітка. Pi – вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин, P11 – вірогідність розбіжності з групою на 11-ту добу

Важливо відмітити, що середнє збільшення коефіцієнта R/B у мезангіальному матриксі та мезангіоцитах порівняно з інтактними тваринами відбулося вже до 11-ї доби експерименту. Можливо, це вказує на те, що на білки мезангіоцитів більше впливають процеси підсилення окисної модифікації білків, ніж неферментативного глікозювання білків.

Подоцити, на відміну від попередньо описаних структур ниркового клубочка, мали забарвлення, в якому переважав синій колір. На це вказує те, що коефіцієнт R/B у цих клітинах був завжди нижче за одиницю.

Подоцити характеризувалися наступними середніми цифрами коефіцієнта R/B: в інтактних тварин - 0,84±0,012, у дослідних тварин на 11-ту добу - 0,86±0,014 (p>0,05), на 21-шу добу - 0,86±0,018 (p>0,05). Для базальної мембрани капсули Боумена встановлені такі результати: в інтактних тварин - 1,11±0,012, у дослідних тварин на 11-ту добу - 1,13±0,019 (p>0,05), на 21-шу добу - 1,39±0,014 (p<0,001) (табл. 3).

Варто відмітити, що коефіцієнт R/B у базальній мембрані капсули Боумена мав таку ж динаміку, як і ендотеліоцити та субендотеліальна мембрана капілярів ниркових клубочків.

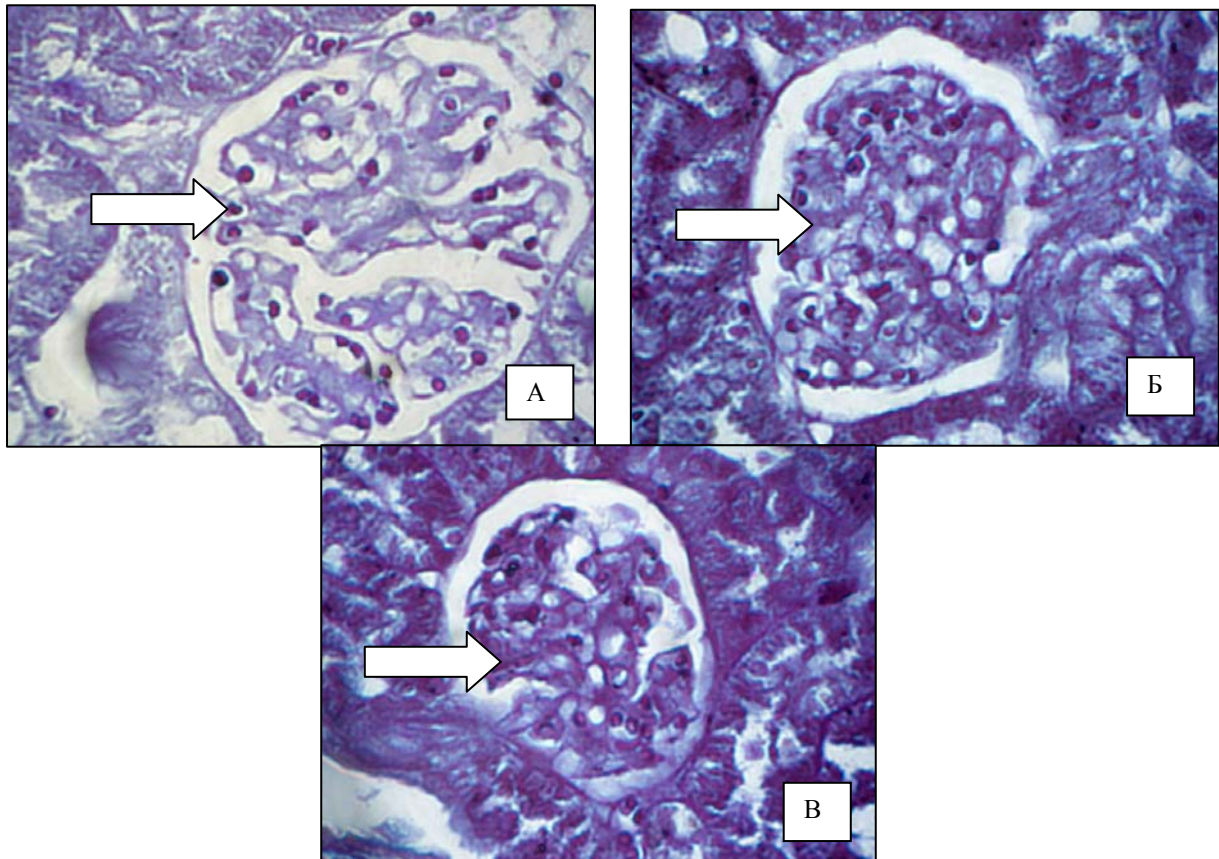


Рис. Ниркові клубочки (позначені стрілками): А) Інтактна тварина; Б) Експериментальний цукровий діабет - 11-та доба; В) Експериментальний цукровий діабет - 21-ша доба

Забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за Mikel Calvo. Об.40<sup>x</sup>. Ок.10<sup>x</sup>.

### Висновок

При експериментальному цукровому діабеті ураження аміногруп білків у клубочках нирок найбільш рано відбувається в мезангіоцитах із мезангіальним матриксом, наступними уражуються ендотеліоцити разом із субендотеліальною базальною мембраною та в базальній мембрані капсули Боумена, пізніше – у подоцитах.

### Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати дозволяють продовжувати дослідження щодо гістохімічних особливостей окиснювальної модифікації білків у клітинах ниркового клубочка на ранніх термінах розвитку експериментального стрептозотоцинового діабету в щурів.

### Література

1. Відтворення експериментальної стрептозоточин-індукованої моделі цукрового діабету 2-го типу у щурів / Т.І. Галенова, В.В. Конопельнюк, О.М. Савчук [та ін.] // Фізика живого. – 2010. – Т. 18, № 3. – С. 50-54.
2. Гавалешко В.П. Гістологічні зміни в нирках при експериментальному цукровому діабеті, ускладненому неповною глобальною ішемією-реперфузією / В.П. Гавалешко // Клін. анат. та операт. хірургія. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 62-65.
3. Давиденко І.С. Гістохімічні особливості окиснювальної модифікації білків у клітинах ниркового клубочка при гострому післяінфекційному гломерулонефриті / І.С. Давиденко, О.М. Давиденко // Бук. мед. вісник. – 2012. – Т. 16, № 3 (63). – Ч. 2. – С. 106-108.
4. Лобода О.М. Механізми розвитку та прогресування діабетичної нефропатії / О.М. Лобода, І.О.Дудар, В.В. Алексєєва // Клін. імунол. Алергол. Інфектол. – 2010. – № 9-10 (38-39). – С. 46-50.
5. Майданник В.Г. Молекулярні механізми ураження нирок при цукровому діабеті у дітей (огляд літератури) / В.Г. Майданник, Є.А. Бурлака // Педіатрія, акушерство та гінекол. – 2010. – №3. – С. 34-47.
6. Ребров Б.А. Пораження почек при сахарном диабете / Б.А. Ребров // Международный. эндокринолог. ж. – 2011. – № 2 (34). – С. 51-55.
7. Скробонська Н.А. Діабетична нефропатія: деякі нетрадиційні фактори патогенезу, основні напрямки діагностики та лікування (огляд літератури та власні дані) / Н.А. Скробонська, Т.С. Цимбал // Сім. мед. – 2011. – № 4. – С. 18-22.
8. Боднар І.А. Роль дисфункцій клубочкових кліток в розвитку діабетической нефропатии / І.А. Боднар, В.В. Климонтов // Пробл. эндокринолог. – 2006. – Т. 52, № 4. – С. 45-49.
9. Хуторська Л.А. Поширеність, абсолютний і відносний ризик розвитку діабетичної нефропатії у хворих на цукровий діабет / Л.А. Хуторська // Бук. мед. вісник. – 2012. – Т. 16, № 4 (64). – С. 170-174.
10. Шуляренко Л.В. Хронічна діабетична хвороба нирок: сучасний погляд на проблему / Л.В. Шуляренко // Endokrynologia. – 2013. – Vol. 18, № 1. – P. 73-82.
11. The Attenuation of Moutan Cortex on Oxidative Stress for Renal Injury in AGEs-Induced Mesangial Cell Dysfunction and Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats / Mingua Zhang, Liang Feng, JunfeiGu [et al.] // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2014. – Vol. 18. – P. 1-13.
12. Dranovalli S. The Pathogenesis of Diabetic Nephropathy / S. Dranovalli, I. Duka, G.L. Bakris // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. – 2008. – № 2. – P. 444-452.

13. Evans T.C. Diabetic Nephropathy / T.C. Evans, P. Capell // *Clinical Diabetes*. – 2000. – № 1. – P. 198-214.
14. Forst T. Role of C-Peptide in the Regulation of Microvascular Blood Flow / T. Forst, T. Kunt, B. Wilhelm // *Exp. Diabetes Res.* – 2008. – № 6. – P. 176-245.
15. Hills C.E. Cellular and Physiological Effects of C-Peptide / C.E. Hills, N.J. Brunskill // *Clin. Sci (Lond)*. – 2009. – Vol. 116 (7). – P.565-574.
16. Palmer J.P. C-Peptide in the Natural History of Type 1 Diabetes / J.P. Palmer // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2009. – Vol. 25 (4). – P. 325-328.

**ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ДАННЫЕ О НАРУШЕНИЯХ ОТДЕЛЬНЫХ СТРУКТУР  
КЛУБОЧКОВ ПОЧЕК КРЫС НА РАННИХ СРОКАХ РАЗВИТИЯ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА**

*Т.Н. Бойчук, М.И. Грицюк, И.С. Давыденко*

**Резюме.** В статье раскрыто гистохимический подход к оценке изменений белковых аминокислотных групп при применении различной методики окраски гистологических срезов. Выявлена разная последовательность поражения аминокислотных групп белков в клубочках почек крыс на ранних сроках развития экспериментального сахарного диабета.

**Ключевые слова:** почки, гликозилирование, аминокислотные группы, сахарный диабет.

**HISTOCHEMICAL INDICES OF VIOLATION OF PARTICULAR STRUCTURES  
IN RATS GLOMERULUS AT THE EARLY TERMS OF EXPERIMENTAL DIABETES**

*T.M. Boychuk, M.I. Hrytsiuk, I.S. Davydenko*

**Abstract.** The article reveals histochemical approach to the assessment of changes of protein amino groups while applying different methods of histological sections staining. A different sequence of lesions of protein amino groups in the renal glomeruli of rats in the early stages of experimental diabetes has been revealed.

**Key words:** kidneys, glycosylation, amino groups, diabetes.

Higher State Educational Institution “Bukovinian State Medical University” (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.Є. Роговий

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 3 (75). – P. 19-22

Надійшла до редакції 09.04.2015 року