

ЗМІНИ ОКРЕМИХ ПОКАЗНИКІВ ЕКСКРЕТОРНОЇ ФУНКЦІЇ НИРОК У ДИНАМІЦІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**М.І. Грицюк**

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

Ключові слова:*цукровий діабет, нефропатія, гіперфільтрація, стрептозотозин, діурез.**Буковинський медичний вісник. Т.21, № 4 (84). С. 48-53***DOI:***10.24061/2413-0737. XXI.4.84.2017.122***E-mail:***m.grytsiuk@gmail.com***Резюме.** Цукровий діабет залишається значною соціальною проблемою, оскільки веде не лише до втрати працездатності, а й до інвалідизації та летальних наслідків.**Мета роботи** – встановити особливості порушення показників екскреторної функції нирок на ранніх етапах розвитку експериментального стрептозотозин-індукованого цукрового діабету.**Матеріал і методи.** Експеримент проведено на 32 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів. Дослідним групам тварин одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотозин у дозі 70 мг/кг. У дослідних групах тварин заїб та відповідні дослідження проводили через 11 діб після уведення стрептозотозину, через 21 та 31 добу відповідно. Кількісну оцінку стану білків у гістохімічних препаратах проводили бромфеноловим синім за методом Mikel Calvo.**Результати.** Одним із найбільш грізних ускладнень діабету є діабетична нефропатія, патогенез якої остаточно не з'ясований, а діагностика її на ранніх термінах розвитку хвороби ускладнена. Проведені дослідження показали, що поряд із розвитком протеїнурії ураження нирок проявляється первинним зростанням швидкості клубочкової фільтрації та змінами діурезу дослідних тварин.**Висновок.** Первинними можливими механізмами розвитку діабетичної нефропатії є порушення процесів глікозилювання, перевантаження функціонуючих нефронів білком і зростаючі енерговитрати в проксимальному і дистальному відділах нефрону.**Ключевые***слова: сахарный диабет, нефропатия, гиперфилтрация, стрептозотозин, диурез.**Буковинский медицинский вестник. Т.21, № 4 (84). С. 48-53***ИЗМЕНЕНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭКСКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕК В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА****М.И. Грицюк****Резюме.** Сахарный диабет остается значительной социальной проблемой, поскольку ведет не только к потере работоспособности, но и к инвалидизации и летальному исходу.**Цель работы** – установить особенности нарушения показателей экскреторной функции почек на ранних этапах развития экспериментального стрептозотозин-индуцированного сахарного диабета.**Материал и методы.** Эксперимент проведен на 32 половозрелых нелинейных самцах белых крыс. Экспериментальным группам животных однократно внутрибрюшинно вводили стрептозотозин в дозе 70 мг/кг. В опытных группах животных убой и соответствующие исследования проводили через 11 суток после

введения стрептозоцина, через 21 и 31 сутки соответственно. Количественную оценку состояния белков в гистохимических препаратах проводили бромфеноловым синим по методу Mikel Calvo. **Результаты.** Одним из самых грозных осложнений диабета является диабетическая нефропатия, патогенез которой окончательно не выяснен, а диагностика ее на ранних сроках развития болезни затруднена. Проведенные исследования показали, что наряду с развитием протеинурии, поражение почек проявляется первичным ростом скорости клубочковой фильтрации и изменениями диуреза опытных животных.

Вывод. Первичными возможными механизмами развития диабетической нефропатии является нарушение процессов гликозилирования, перегрузки функционирующих нефронов белком и растущие энергозатраты в проксимальном и дистальном отделах нефрона.

Key words: diabetes mellitus, nephropathy, hyperfiltration, streptozotocin, diuresis.

Bukovinian Medical Herald. V.21, № 4 (84). P. 48-53

CHANGES IN PARTICULAR INDICES OF EXCRETORY RENAL FUNCTION IN THE DYNAMICS OF EXPERIMENTAL DIABETES

M.I. Grytsiuk

Abstract. Diabetes mellitus remains a serious social problem, as it leads not only to loss of efficiency, but also to disability and death.

Objective. To establish the features of disorders in the excretory renal function in the early stages of the development of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Material and methods. The experiment was performed on 32 sexually mature non-linear males of white rats. Experimental groups of animals were injected intraperitoneally with streptozotocin at a dose of 70 mg/kg. In the experimental groups of animals, slaughter and further studies were carried out 11 days after the administration of streptozotocin, 21 days and 31 days, respectively. A quantitative assessment of the state of proteins in histochemical preparations was performed with bromophenol blue according to the method of Mikel Calvo.

Results. One of the most formidable complications of diabetes is diabetic nephropathy, the pathogenesis of which has not been fully clarified, and its diagnosis in the early stages of the disease is difficult. The conducted studies showed that along with the development of proteinuria, kidney damage manifests itself by a primary increase in the glomerular filtration rate and changes in the diuresis of experimental animals.

Conclusions. The primary possible mechanisms of the development of diabetic nephropathy are disorders of glycosylation, overloading of functioning nephrons with protein and growing energy inputs in the proximal and distal tubules of the nephron.

Вступ. Незважаючи на успіхи та досягнення сучасної медицини, діабетична нефропатія (ДН) була та залишається однією з основних причин захворюваності на хронічну ниркову недостатність (ХНН) та смертності серед пацієнтів із цукровим

діабетом (ЦД) [2]. Це веде за собою суттєві соціально-економічні втрати для системи охорони здоров'я та держави в цілому.

На сьогодні на планеті проживають понад 382 млн осіб, хворих на ЦД. На думку провідних

Оригінальні дослідження

науковців, без об'єднаних і узгоджених заходів із подолання епідемії цього захворювання їх кількість сягне 592 млн до 2035 року. За даними завідувача відділу діабетології Державної установи “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України” Любові Соколової, в Україні ЦД посідає третє місце за поширеністю після серцево-судинних і онкологічних захворювань. За останні десять років поширеність ЦД в Україні збільшилася в півтора рази, і станом на 1 січня 2015 року в країні зареєстровано 1 198 047 хворих, що становить близько 2,9% від усього населення нашої держави (дані надані без урахування статистики АР Крим та окупованих територій Донецької і Луганської областей).

ДН є переважною причиною термінальної стадії ХНН у більшості країн світу та розвивається у приблизно третини пацієнтів із ЦД, призводить до протеїнурії, а в подальшому – до зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) з поступовим розвитком хронічної хвороби нирок [9, 10].

При ДН уражені усі клітинні елементи нирки: гломерулярний ендотелій, мезангіальні клітини, подоцити та епітелій ниркових каналців. Морфологічні зміни нирок найчастіше проявляються потовщенням базальної мембрани, розширенням мезангію та формуванням вузликів Кімелштайля-Уілсона [3]. Щодо каналців, то особливого ураження зазнають проксимальні відділи, які підлягають впливу метаболічних та гемодинамічних порушень [6].

При ЦД гіперглікемія є основним чинником, який провокує порушення метаболічних процесів та призводить до накопичення компонентів позаклітинного матриксу і подальшого фіброзу. При зменшенні кількості функціонально активних нефронів відбувається заміщення пошкоджених інтерстиціальними рубцями та посилення фіброзу [5, 7].

Ступінь ураження каналців залежить від таких чинників, як високий рівень глюкози та вміст кінцевих продуктів глікозилювання, а також великої кількості білка, який профільтровується через гломерулярний капілярний бар'єр [6, 9].

Для адекватного розуміння патофізіологічних механізмів виникнення та прогресування ЦД та ДН і розробки профілактичних та лікувальних підходів необхідним є використання відповідних експериментальних моделей, які максимально точно відтворюють природний перебіг цього судинного ускладнення ЦД у людей. Тому для наших досліджень було обрано стрептозотозин (СТЗ) [8].

СТЗ є токсичним з'єднанням із групи по-

хідних нітрососечовини, який зв'язаний у С2 положенні з D-глюкозою, що вибірково проникає в панкреатичні бета-клітини за допомогою переносника GLUT-2. Панкреотоксичність СТЗ значною мірою пов'язана з алкілюючою активністю його метильної групи, що призводить до фрагментації ДНК бета-клітин, у відповідь на яку активується фермент, котрий бере участь у репарації ушкодженої ДНК [1, 8]. У зв'язку з цим розвивається дефіцит запасів кофактора NAD⁺, а потім і енергетичних субстратів у вигляді АТФ, що неминуче призводить до некрозу бета-клітин. Цей процес посилюється активацією вільнорадикального окиснення, пов'язаного з генерацією пероксинітриду з утвореного в надлишку оксиду азоту, донатором якого є нітрозогрупа СТЗ. Діабетогенний ефект СТЗ спостерігається в багатьох видів тварин, включаючи мишей, собак, мавп, морських свинок та ін., причому максимальна сенсibiliзація виявлена у щурів, також відзначено, що особини чоловічої статі розвивають більш виражену гіперглікемію [4, 9].

Мета роботи. Встановити особливості порушення показників екскреторної функції нирок на ранніх етапах розвитку експериментального стрептозотозин-індукованого цукрового діабету в динаміці.

Матеріал і методи. Експеримент проведено на 32 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів, масою 0,17 – 0,20 кг. Тварин розподіляли на чотири групи. Перша (I) – контрольна група (n=9), тварини якої перебували на стандартному режимі годування, освітлення та утримання. Дослідним групам тварин (II–n=8; III–n=8 та IV–n=7) одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотозин (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг [8].

У II групі тварин забій та відповідні дослідження проводили через 11 діб після уведення стрептозотозину, показники тварин III групи досліджували через 21 добу, IV – через 31 добу відповідно. В експеримент брали тварин, рівень глікемії у яких перевищував 10 ммоль/л.

Для дослідження необхідних показників забій тварин проводили під легким ефірним знеболенням, дотримуючись положень Директиви ЄЕС №609 (1986) та наказу МОЗ України №690 від 23.09.2009 р. “Про заходи щодо подальшого удосконалення організаційних норм роботи з використанням експериментальних тварин”. Щоб оцінити функції судинно-клубочкового апарату нирки, тваринам проводили навантаження водогінною водою в об'ємі 5% маси тіла, сечу збирали упродовж 2 годин.

Кількісну оцінку стану білків у гістохімічних препаратах, забарвлених бромфеноловим синім за

Mikel Calvo, здійснювали методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії на основі коефіцієнта R/B. Вірогідність різниці показників визначали з використанням t-критеріїв Стьюдента. У таблицях значення вірогідності ("p") наведені лише для вірогідних ($p=0,05$ або менше) різниць показників, що вивчалися.

Результати дослідження та їх обговорення.

Як видно з даних таблиці, при дослідженні розвитку стрептозотозин-індукованого цукрового діабету на 11-ту добу експерименту показник водного діурезу на 18,9% нижчий, ніж показник контрольної групи тварин, при цьому на 21-шу добу різниця сягає 48,3%, а на 31-шу добу показник повертається до рівня 11-ї доби (табл.). Падіння водного діурезу обернено пропорційне до зростання рівня відносної реабсорбції води з $91,81 \pm 0,77\%$ в інтактних тварин до $97,17 \pm 0,09\%$ на 11-ту добу; $99,99 \pm 0,02\%$ – на 21-шу та з незначним підвищенням до $98,55 \pm 0,13\%$ на 31-шу

добу експерименту.

Слід підкреслити, що зменшується не добовий, а саме форсований діурез. Це можна пояснити тим, що в позаклітинній рідині зростає осмолярність внаслідок збільшення концентрації глюкози, одночасно з виявленим підвищенням вмісту натрію. Гіперосмолярність стимулює підвищення секреції вазопресину, що, за рахунок зростання реабсорбції води у збиральних трубках, зменшує водний діурез.

Необхідно зазначити, що в період глюкозурії на початку захворювання внаслідок інсулінової недостатності має місце зростання швидкості клубочкової фільтрації за механізмом гіперфільтрації. Даний показник достовірно ($p < 0,001$) зростає протягом усього періоду спостереження (табл.).

Зростання швидкості клубочкової фільтрації веде за собою і збільшення втрат білка з сечею. Загалом, відомо, що протеїнурія є тією ознакою, яка свідчить про залучення нирок у патологіч-

Таблиця

Зміни окремих показників екскреторної функції нирок при стрептозотозинному діабеті в щурів

Показник	Контроль, n=9	Стрептозотозинний діабет		
		11-та доба, n=8	21-ша доба, n=8	31-ша доба, n=7
Діурез, мл/2 год	3,60±0,19	2,92±0,09 p<0,05	1,86±0,04 p<0,01	2,92±0,29
Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	0,72±0,04	1,68±0,04 p<0,01	1,71±0,06 p<0,01	2,03±0,11 p<0,01
Концентрація креатиніну в плазмі крові, мкмоль/л	57,23±3,27	47,38±1,28 p<0,05	33,89±2,37 p<0,01	28,63±1,61 p<0,05
Концентраційний індекс ендogenous креатиніну, у.од.	24,56±0,78	35,62±1,14 p<0,05	52,80±4,67 p<0,01	53,20±6,69 p<0,05
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв	378,64±27,24	864,12±32,00 p<0,001	879,85±75,83 p<0,001	1125,21±80,21 p<0,001
Екскреція білка, мг/2 год	0,121±0,016	0,163±0,024 p<0,05	0,285±0,048 p<0,001	0,506±0,081 p<0,001
Екскреція білка, мг/100 мкл КФ	0,032±0,003	0,031±0,003	0,065±0,005 p<0,05	0,112±0,004 p<0,001

Примітка. n – кількість тварин у групі; p – вірогідність розбіжності дослідної та контрольної груп тварин, КФ – клубочковий фільтрат.

Оригінальні дослідження

ний процес (збільшення фільтрації і зменшення реабсорбції), проте у вказаних дослідженнях було зареєстровано зростання екскреції білка в абсолютних величинах, а в перерахунку на 100 мкл КФ суттєві зміни відбувалися лише на 31-шу добу. Саме тоді реєстрували протеїнурію як маркер ушкодження і, відповідно, реакцію нирок на зміни водно-солевого обміну. Про це свідчить показник екскреції білка в перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату (табл.). Слід відзначити, що навіть у здорових тварин протеїнурія спостерігається у невеликій кількості, як результат зменшення реабсорбції білка в проксимальних каналцях.

Загалом, екскреція білка на 11-ту добу на 34,7% перевищує дані інтактних тварин, на 21-шу добу вона зростає вдвічі порівняно з контролем, а на 31-шу добу – більш, ніж у 4,2 раза ($p < 0,001$).

Не можна виключити, що протеїнурія дійсно є однією з ознак порушення функціонування нирок, але провідним механізмом, ймовірно, є подальше перевантаження нефрону профільтрованим білком, що, при існуючому обмеженні реабсорбції в проксимальному каналці, веде до втрати його із сечею.

У роботах колективу дослідників Буковинсько-

го державного медичного університету (Ю.Є.Роговий та співавтори, 1999-2016 рр.) уже було показано, що збільшення навантаження на каналці є додатковим ушкоджувальним механізмом, який з часом веде до збільшення внутрішньогломерулярного тиску за механізмом активації внутрішньониркової ренін-ангіотензинової системи та подальшого пошкодження нефрону.

Враховуючи взаємодію між каналцієво-інтерстиційним та гломерулярним відділом із прогресуванням діабетичної нефропатії, ураження клубочків викликає зміни в їх мікроциркуляції, що призводить до гіперфільтрації в неушкоджених клубочках із підвищенням внутрішньогломерулярного тиску.

За нашими даними, найбільш ранні реакції (вже на 11-ту добу експерименту) відзначаються в мезангіоцитах та мезангіальному матриксі ниркових клубочків з подальшим прогресуванням. На 21-шу добу такі зміни з'являються в ендотеліоцитах та субендотеліальних базальних мембранах кровоносних судин ниркових клубочків, інтерстицію кіркової, мозкової речовини та сосочка нирки, а також у базальній мембрані капсули Боумена. Найбільш пізно в процес залучаються епітеліоцити – подоцити ниркових клубочків та

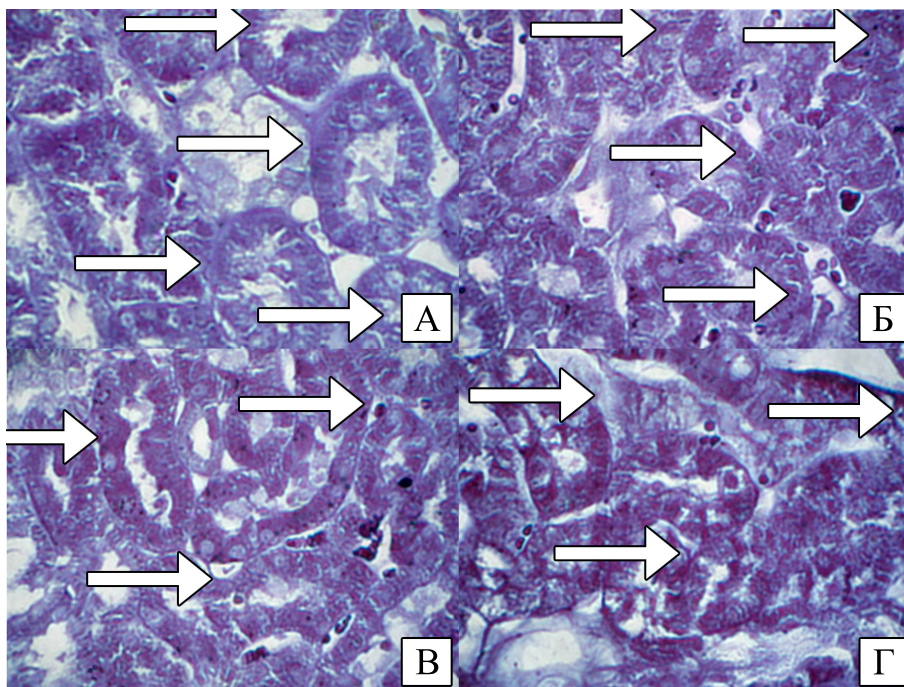


Рис. Звивисті каналці нирки щура (позначені стрілками). Забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за Mikel Calvo. Об.40х. Ок.10х
 А. Інтактна тварина
 Б. Експериментальний цукровий діабет - 11-та доба
 В. Експериментальний цукровий діабет - 21-ша доба
 Г. Експериментальний цукровий діабет - 31-ша доба

епітеліоцити звивистих каналців нирки (рис.).

При гіперфільтрації з внутрішньогломерулярною гіпертензією поступово уражуються решта клубочків і каналців, що в подальшому призводить до розвитку гломерулосклерозу і каналцієво-інтерстиційного фіброзу. При прогресуванні захворювання відбувається поступове зниження швидкості клубочкової фільтрації з розвитком хронічної ниркової недостатності.

Висновок. Проведені дослідження дозволяють дійти висновку, що на ранніх термінах розвитку експериментального цукрового діабету зберігається відносно ефективною регуляція осмотичного гомеостазу – зростання діурезу не спостерігається через високі показники реабсорбції води, особливо в збиральних трубках (зважаючи на показники індексу ендogenous креатиніну). Загалом можна констатувати, що первинними можливими механізмами розвитку діабетичної нефропатії є порушення процесів глікозилювання, перевантаження функціонуючих нефронів білком і зростаючі енерговитрати в проксимальному і дистальному відділах нефрону. Поєднання цих факторів і ушкодження базальної мембрани клубочків ведуть до прямого і гіперфункціонального пошкодження нирок.

Перспектива подальших досліджень. Беручи до уваги отримані дані, актуальним буде подальше з'ясування перебудов ниркових функцій на ранніх термінах розвитку діабетичної нефропатії з метою пошуку можливостей профілактики даного ускладнення цукрового діабету.

Список літератури.

1. Bequer L, Gómez T, Molina JL. Streptozotocin diabe-

togenic action in an experimental neonatal induction model. *Biomedica*. 2016;36(2):230-8.

2. Romero MJ, Lucas R, Dou H. Role of growth hormone-releasing hormone in dyslipidemia associated with experimental type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016;113(7):1895-1900.
3. Herrera GA, Turbat-Herrera EA, Teng J. Animal Models of Light Chain Deposition Disease Provide a Better Understanding of Nodular Glomerulosclerosis. *Nephron*. 2016;132(2):119-36.
4. Liu X, Mo Y, Gong J. Puerarin ameliorates cognitive deficits in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab. Brain Dis.* 2016;31(2):417-23.
5. Bruna BN, Luis HC. The role of progranulin in diabetes and kidney disease. *Diabetol. Metab. Syndr.* 2015;7:117-25.
6. Mohammad S, Basel M, Abozor L, Khalid H, Zawawi G. The relationship between periapical lesions and the serum levels of glycosylated hemoglobin and C-reactive protein in type 2 diabetic patients. *Saudi Med. J.* 2017;1(38): 36-40.
7. Sen Zh, Dongjie W, Nina X. Nicousamide protects kidney podocyte by inhibiting the TGFβ receptor II phosphorylation and AGE-RAGE signaling. *Am. J. Transl. Res.* 2017;9(1):115-25.
8. Boonloh K, Lee ES, Kim, Hong M, Kwon MH, Kim YM, Pannangpetch P. Rice bran protein hydrolysates attenuate diabetic nephropathy in diabetic animal model. *European journal of nutrition*. 2016;1-12. DOI:10.1007/s00394-016-1366-y.
9. El Din UAAS, Salem MM, Abdulazim DO. Diabetic nephropathy: Time to withhold development and progression A review. *Journal of advanced research*. 2017;8(4):363-73. doi: 10.1016/j.jare.2017.04.004.
10. Mora-Fernández C, Domínguez-Pimentel V, de Fuentes MM, Górriz JL, Martínez-Castelao A, Navarro-González JF. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics. *J Physiol*. 2014;592(18):3997-4012. doi: 10.1113/jphysiol.2014.272328.

Відомості про авторів:

Грицюк Мар'яна Іванівна — к.мед.н., доцент, завідувач кафедри соціальної медицини та організації охорони здоров'я Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет», здобувач наукового ступеня доктора наук за спеціальністю 14.03.04. — «патологічна фізіологія». m.grytsiuk@gmail.com Моб. Телефон — 050707 5177.

Сведения об авторах:

Грицюк Марьяна Ивановна — к. м. н., доцент, заведующая кафедрой социальной медицины и организации здравоохранения Высшего государственного учебного заведения Украины «Буковинский государственный медицинский университет», соискатель ученой степени доктора наук по специальности 14.03.04. — «патологическая физиология». m.grytsiuk@gmail.com моб. Телефон — 050707 5177.

Information about the authors:

Grytsiuk Maryana Ivanivna — Ph.D., Associate Professor, Head of the Department of Social Medicine and Public Health of the Higher State Educational Institution of Ukraine "Bukovinian State Medical University", a candidate for the degree of Doctor of Science in specialty 14.03.04. — "pathological physiology". m.grytsiuk@gmail.com Mob. Phone — 050707 5177.

*Надійшла до редакції 20.11.2017
Рецензент – проф. Мислицький В.Ф.
© М.І. Грицюк, 2017*