

Бойчук Т.М.¹, Оленович О.А.¹, Грицюк М.І.¹, Гоженко А.І.²

¹ Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна

² ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України», м. Одеса, Україна

Особливості порушень функціонального стану нирок у ранній період експериментального цукрового діабету

For cite: Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal. 2017;13:463-7. doi: 10.22141/2224-0721.13.6.2017.112894

Резюме. Мета. Проведення порівняльного аналізу специфічності та вираженості ниркових дисфункцій у ранній період розвитку алоксанового та стрептозотоцинового цукрового діабету. **Матеріали та методи.** У статті наведені дані щодо особливостей порушень функціонального стану нирок на 11-ту добу після введення нелінійним статевозрілим самцям білих щурів діабетогенної дози стрептозоточину (70 мг/кг) та алоксану (160 мг/кг). **Результати.** Встановлено спільні закономірності розвитку ренальних розладів у ранній період стрептозоточин- та алоксан-індукованого діабету, що мають переважно функціональне походження за відсутності значущих структурних змін канальцевого апарату нирок. **Висновки.** У ранній період розвитку експериментального цукрового діабету обох типів порушення канальцевого відділу нефрона не відповідальні за зміни функції нирок.

Ключові слова: експериментальний цукровий діабет; алоксан; стрептозоточин; діабетична нефропатія; функціональний стан нирок

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) був і залишається глобальною проблемою сьогодення, що призводить до інвалідації пацієнтів, втрати працездатності та передчасної смерті. Діабетична нефропатія — одне з найтяжчих ускладнень ЦД, наявність якого різко знижує якість та тривалість життя хворих [10, 13]. Інтерес до вивчення цієї патології не згасає і спонукає науковців до пошуків нових шляхів діагностики й лікування ЦД та його ускладнень.

На сьогодні в арсеналі дослідників є багато генетичних і негенетичних моделей експериментального ЦД як першого, так і другого типу [4, 8], що дають змогу дослідникам викликати в експерименті той чи інший тип захворювання, який відповідає ЦД у людей. Найпростішими у відтворенні є негенетичні моделі, в яких використовують гідрофільні β-клітинні глюкозні аналоги, такі як алоксан, стрептозоточин, хлорозоточин, ципрогептадин тощо [5, 9]. Механізм дії цих речовин полягає перш за все у деструкції β-клітин панкреатичного островця шляхом генерації вільних радикалів кисню,

що порушують цілісність клітини; алкілування дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) і подальшої активації полі-АТФ-рибозосинтетази — зниження вмісту NAD у β-клітині; пригнічення активного транспорту кальцію і кальмодулін-активованої протеїнкінази [6, 11, 15].

Алоксан (піридин-2,4,5,6,(1H,3H)-тетра) є похідним сечовини, блідо-рожевого кольору, розчинний у воді або алкоголі, легко підлягає автоокисненню з утворенням активних радикалів, викликає селективний некроз β-клітин панкреатичних островців. Паралельно з самоокисненням молекул подібних ксенобіотиків здійснюється продукція реактивних форм кисню. Найчастіше алоксановий діабет викликається дворазовим підшкірним введенням водного розчину алоксангідрату тваринам (кролики, щури, миші та собаки), які попередньо голодували упродовж доби, та за клінічним перебігом відповідає ЦД 1-го типу [4]. Змінюючи дозу алоксану, можна викликати різний ступінь ушкодження клітин підшлункової залози. Здебільшого при моделюванні ЦД у щурів одноразова доза

алоксану становить 55–65 мг/кг [3, 14]. У разі його введення внутрішньоочеревинно ефективну дозу слід збільшити. Алоксан за наявності внутрішньоклітинних тіолів, особливо глутатіону, здатний генерувати активні форми кисню в циклічній реакції з утворенням продукту відновлення діалурової кислоти. Автоокиснення діалурової кислоти генерує супероксидні радикали (O_2^-) і пероксид водню (H_2O_2), а в кінцевій реакції, що каталізується залізом, — гідроксильні радикали (ОН). Ці гідроксильні радикали і вважають відповідальними за загибель β -клітин, які мають особливо низьку антиоксидантну властивість, і подальший розвиток інсулінозалежного алоксанового діабету [6]. Вплив реактивних форм кисню з одночасним масивним зростанням рівня цитозольного кальцію викликає швидку деструкцію β -клітин підшлункової залози, оскільки саме ДНК панкреатичних острівців є однією з мішеней їх дії.

Іншою поширеною моделлю ЦД є стрептозотоциновий діабет. Діабетогенна дія стрептозотоцину (СТЦ), описана у 1963 році, виявилася побічним ефектом при перевірці у клініці антибактеріальної та протипухлинної активності цього антибіотика [9, 12]. СТЦ (2-діокси-D-глюкоза, похідне N-метил-N-нітрососечовини) являє собою заморожений порошок жовтувато-білого кольору, який зберігається у стерильному посуді. СТЦ запобігає синтезу ДНК у бактеріальних клітинах і клітинах ссавців. У бактеріальних клітинах він викликає спеціальну реакцію з цитозинними групами, наслідком якої є дегенерація та деструкція ДНК. Результатом цього біохімічного механізму є клітинна смерть. Основним метаболітом СТЦ, з яким найбільшою мірою пов'язаний його токсичний ефект, є оксид азоту (NO). Завдяки наявності нітрозного залишку СТЦ здатний неферментативно вивільняти вільний NO, який може перетворюватися в пероксинітрил і призводити до процесів вільнорадикального окиснення. Специфічна дія NO на β -клітини полягає також в активації гуанілатциклази, що призводить до підвищення рівня cGMP, інгібування мітохондріальної аконітази та порушень аеробного окиснення глюкози і, як наслідок, пригнічення глюкозостимульованої секреції та синтезу інсуліну [4].

Висока відтворюваність зазначених експериментальних моделей ЦД і можливість приведення експериментальних умов у відповідність із поставленими завданнями дослідження розширюють можливості вивчення особливостей розвитку та прогресування діабет-асоційованих ренальних розладів.

З огляду на це метою дослідження стало проведення порівняльного аналізу специфічності та вираженості ниркових дисфункцій у ранній період розвитку алоксанового та стрептозотоцинового ЦД.

Матеріали та методи

Експеримент проведено на 23 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів масою 0,18–0,20 кг. Упродовж місяця до початку та під час експерименту тварин утримували у віварії за умов сталої темпера-

тури (20–21 °C) і вологості повітря (52–55 %) в окремих клітках із вільним доступом до води та їжі, з дотриманням 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».

Тварин розподіляли на три групи. Перша (1-ша) група — контрольна (n = 7), яка перебувала на стандартному режимі годування, освітлення та утримання. Дослідній другій (2-й) групі тварин (n = 8) одноразово внутрішньоочеревинно вводили СТЦ (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг [2, 3]. У третій (3-й) групі дослідних тварин (n = 8) здійснювали одноразове внутрішньоочеревинне введення алоксану (Alloxan monohydrate, Acros Organics, Бельгія) у дозі 160 мг/кг [6]. Через 11 діб після введення діабетогенних речовин тварин виводили з експерименту. З метою вивчення функції судинно-клубочкового апарату нирки тваринам проводили навантаження водогінною водою в об'ємі 5 % маси тіла, сечу збирали впродовж двох годин, здійснювали евтаназію шляхом декапітації під легким ефірним знеболюванням. Рівень глюкози в крові експериментальних тварин визначали за допомогою портативного глюкометра One Touch Ultra (LifeScan, США).

Статистична обробка отриманих даних здійснювалась із визначенням середньої величини, стандартних відхилень. Вірогідність різниці показників визначали з використанням t-критерію Стьюдента. У таблицях значення вірогідності (p) наведені лише для вірогідних ($p \leq 0,05$) різниць показників, що вивчалися.

Результати

Концентрація глюкози в крові тварин з експериментальним ЦД обох типів вірогідно перевищувала контрольну величину — у 2,4 раза ($p < 0,001$) на тлі дії СТЦ та у 2,3 раза ($p < 0,001$) за алоксан-індукованого ЦД, що підтверджує адекватність використаних експериментальних моделей (рис. 1).

При вивченні впливу експериментальної інсулінозалежної гіперглікемії на функції нирок нами встановлено, що, попри окремі відмінності, зміни показників функціонального стану нирок у щурів з

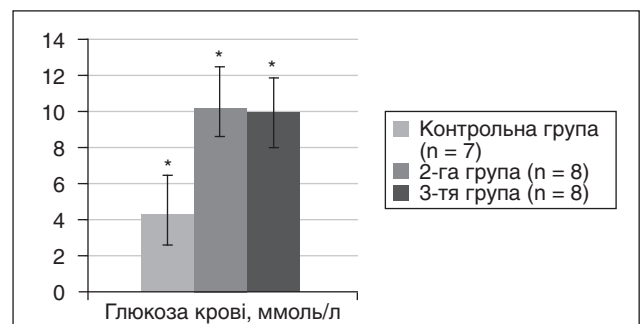


Рисунок 1. Рівень глікемії у тварин зі стрептозотоциновим (2-га група) та алоксановим (3-тя група) цукровим діабетом; * — ступінь вірогідності різниць показників щодо контролю

експериментальним ЦД мають спільні закономірності розвитку у ранній період стрептозототин- та алоксан-індукованого діабету (табл. 1).

Як відомо, одним із класичних проявів ЦД є поліурія, причиною якої у хворих на ЦД вбачають механізм осмотичного діурезу [7, 12]. Разом з тим зростання діурезу, очікуваного на тлі експериментального ЦД, не спостерігається. Більше того, на 11-ту добу після введення діабетогенних речовин рівень діурезу виявив тенденцію до зниження (статистично вірогідного за умов експериментального стрептозототин-індукованого ЦД — $p < 0,01$), яка, ймовірно, пов'язана з тим, що дослідження проводились за умов водного діурезу. Останній за інтенсивністю перевищує добовий більше ніж у 10 разів, а його величина залежить від блокування секреції вазопресину, що спричинене гіпоосмією внаслідок всмоктування води — відзначається ефект розведення у позаклітинному просторі. За умов експериментальної гіперглікемії надходження води до організму після водного навантаження не повністю нормалізує концентрацію осмотично активних речовин у позаклітинному просторі, а тому секреція вазопресину не блокується.

Інтенсифікація процесів клубочкової фільтрації у дослідних тварин загалом відображає гіпердина-

мічний характер функціонування нирок, притаманний ЦД: на 11-ту добу експерименту показники швидкості клубочкової фільтрації вірогідно перевищують контрольні як за стрептозототин-індукованого діабету, так і на тлі дії алоксану (у 2,3 раза ($p < 0,001$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно). Внаслідок гіперфільтрації спостерігається зростання екскреції креатиніну: його концентрація в сечі тварин зі стрептозототинним та алоксановим ЦД вірогідно перевищує відповідний показник інтактних тварин — відповідно у 2,3 раза ($p < 0,001$) та 2,2 раза ($p < 0,001$). Це супроводжується розвитком гіпокреатиніемії у тварин зі стрептозототин-індукованим ЦД — концентрація креатиніну в сечі експериментальних тварин 2-ї групи на 17,2 % нижча від контрольного рівня ($p < 0,05$). Разом з тим у групі алоксан-індукованого ЦД спостерігаються протилежні зміни — плазмовий рівень креатиніну в сечі експериментальних тварин 3-ї групи вірогідно зростає (у 1,6 раза щодо контролю, $p < 0,001$), що, ймовірно, пов'язано з впливом алоксану на метаболізм креатиніну в організмі. Тим не менш розрахунки концентраційного індексу ендogenous креатиніну підтверджують спільне походження його надмірної екскреції з сечею в ранній період розвитку експериментального ЦД обох типів (кліренс креатиніну ві-

Таблиця 1. Характеристика функціонального стану нирок у ранній період експериментального ЦД ($x \pm Sx$)

Показник	Групи, кількість тварин		
	Контрольна, n = 7	11-денний експериментальний діабет	
		стрептозототин-індукований, n = 8	алоксан-індукований, n = 8
Діурез, мл/2 год	3,60 ± 0,19	2,92 ± 0,09 $p < 0,01$	3,43 ± 0,16 $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$
Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	0,72 ± 0,04	1,68 ± 0,04 $p < 0,001$	1,59 ± 0,10 $p < 0,001$ $p_1 > 0,4$
Концентрація креатиніну в плазмі крові, ммоль/л	57,23 ± 3,27	47,38 ± 1,28 $p < 0,05$	89,38 ± 3,64 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Концентраційний індекс ендogenous креатиніну, од.	12,58 ± 0,63	35,62 ± 1,14 $p < 0,001$	18,19 ± 1,87 $p < 0,05$ $p_1 < 0,001$
Швидкість клубочкової фільтрації, мкл/хв	378,64 ± 27,24	864,12 ± 32,00 $p < 0,001$	515,60 ± 49,36 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$
Концентрація білка в сечі, г/л	0,034 ± 0,004	0,090 ± 0,008 $p < 0,001$	0,098 ± 0,004 $p < 0,001$ $p_1 > 0,2$
Екскреція білка, мг/2 год	0,121 ± 0,016	0,263 ± 0,024 $p < 0,001$	0,335 ± 0,023 $p < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Екскреція білка, мг/100 мкл Ccr	0,032 ± 0,003	0,031 ± 0,003 $p > 0,8$	0,067 ± 0,005 $p < 0,001$ $p_1 < 0,001$
pH сечі, од.	7,05 ± 0,11	6,25 ± 0,10 $p < 0,001$	6,39 ± 0,15 $p < 0,01$ $p_1 > 0,4$

Примітки: p — ступінь вірогідності різниць показників щодо контролю; p_1 — ступінь вірогідності різниць показників у тварин зі стрептозототин-індукованим та алоксан-індукованим ЦД.

рогідно зростає у тварин 2-ї та 3-ї груп — у 2,8 раза ($p < 0,001$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно).

Обговорення

Класичним порушенням, яке зазвичай свідчить про початок розвитку діабетичної нефропатії, є протеїнурія [1, 7]. Поява мікроальбумінурії, що переходить у виражену протеїнурію, є ознакою порушення транспорту білка і типовою ознакою діабетичної нефропатії. Оскільки екскреція білка з сечею істотно зростає як за стрептозототин-індукованого, так і за алоксанового діабету — відповідно у 2,2 раза ($p < 0,001$) та 2,8 раза ($p < 0,001$), це обумовлює підвищення його концентрації в сечі тварин з експериментальним ЦД обох типів (у 2,6 раза ($p < 0,001$) у тварин 2-ї групи та у 2,9 раза ($p < 0,001$) у тварин 3-ї групи). Однак при розрахунку екскреції білка на 100 мкл клубочкового фільтрату (приведенні до одиниці діючого нефрона) ми не отримали підвищення цього показника у тварин 2-ї групи ($p > 0,8$), зате виявили його дворазове зростання у тварин 3-ї групи ($p < 0,001$).

Це дає нам змогу припустити, що загальні втрати білка, які спостерігалися у ранній період експериментального ЦД, є здебільшого наслідком збільшення швидкості клубочкової фільтрації зі зростанням фільтраційного завантаження нефрона. Виникає феномен переважання транспортних систем реабсорбції у проксимальних канальцях. Останні є практично інтактними у шурів, яким вводили СТЦ, та виявляють початкові ознаки зменшення проксимальної реабсорбції білка за алоксанової моделі ЦД.

Таким чином, у ранній період розвитку експериментального ЦД обох типів порушення канальцевого відділу нефрона не відповідає зміні функції нирок. Це підтверджується отриманими даними, оскільки в цей період нирки не втрачають здатності виводити кислоти, про що свідчить вірогідне зменшення кислотності сечі у тварин 2-ї та 3-ї груп (на 11,3 % ($p < 0,001$) і 9,4 % ($p < 0,01$) відповідно). Це можливо лише у відносно не ушкодженому нефроні, адже екскреція кислот тісно пов'язана з активним енергозалежним транспортом натрію, що завжди пригнічується при ушкодженні ниркових канальців.

Висновки

Незважаючи на різний механізм діабетогенного впливу СТЦ та алоксану, включаючи ступінь вираженості гіперглікемії, зміни показників функціонального стану нирок у шурів з експериментальним ЦД мають спільні закономірності розвитку у ранній період стрептозототин- та алоксан-індукованого діабету.

Характер і динаміка їх розвитку засвідчують переважно функціональне походження ренальних розладів на 11-ту добу експериментального діабету на тлі гіпердинамічного функціонування нирок, спричиненого гіперглікемією, за відсутності значущих структурних змін канальцевого апарату нирок.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

References

1. Bondar' IA, Klimentov VV. A role of glomerular cell dysfunction in the development of diabetic nephropathy. *Problemi endokrinologii*. 2006;52(4):45-9. (in Russian).
2. Galenova TI, Konopel'nyuk VV, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Reproduction of the streptozotocin-induced experimental model of type 2 diabetes mellitus in rats. *Fizyka zhyvogo*. 2010;18(3):50-4. (in Ukrainian).
3. Loboda OM, Dudar IO, Aljeksjejeva VV. Mechanisms of the development and progression of diabetic nephropathy. *Klinichna imunologija. Alergologija. Infektologija*. 2010;9-10(38-39):46-50. (in Ukrainian).
4. Majdannik VG, Burlaka JeA. Molecular mechanisms of kidney damage in diabetes mellitus in children (literature review). *Pediatrics, akusherstvo ta ginekologija*. 2010;3:34-47. (in Ukrainian).
5. Merets'kyj VM. Peculiarities of free-radical lipid oxidation and antioxidant protection in renal and liver tissue in the experimental diabetes mellitus. *Zdobutky klinichnoi' i eksperymental'noi' medycyny*. 2012;1:96-8. (in Ukrainian).
6. Mozheyko LA. Experimental models for studying diabetes mellitus. Part 1. Alloxan diabetes. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2013;3(43):26-9. (in Russian).
7. Rebrov BA. Kidney damage in diabetes mellitus. *Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal*. 2011;2(34):51-5. (in Russian).
8. Senatorova AS, Muratova EG. Features of renal function in children with diabetes mellitus in the kharkiv region. *Medycyna s'ogodni i zavtra*. 2012;2(55):76-80. (in Ukrainian).
9. Skrobons'ka NA, Cymbal TS. Diabetic nephropathy: some nontraditional factors of pathogenesis, basic directions of diagnosis and treatment (literature review and own data). *Simejna medycyna*. 2011;4:18-22. (in Ukrainian).
10. Khutorska LA. Prevalence, absolute and relative risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus. *Buk Med Herald*. 2012;16(4):170-5. (in Ukrainian).
11. Shulyarenko LV. Chronic diabetic renal disease: the contemporary view on the problem. *Endokrynologia*. 2013;18(1):73-82. (in Ukrainian).
12. Dranovalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2008 Aug;4(8):444-52. doi: 10.1038/ncpendmet0894.
13. Evans TC, Capell P. Diabetic nephropathy. *Clin Diabetes* 2000;18(1). Available from: <http://journal.diabetes.org/clinical-diabetes/v18n12000/Pg7.htm>. Accessed: 22 May 2011.
14. Forst T, Kunt T, Wilhelm B, Weber MM, Pfützner A. Role of C-Peptide in the regulation of microvascular blood flow. *Exp Diabetes Res*. 2008; 2008: 176245. doi: 10.1155/2008/176245.
15. Zhang M, Feng L, Gu J, et al. The attenuation of moutan cortex on oxidative stress for renal injury in AGEs-induced mesangial cell dysfunction and streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;18:1-13. doi: 10.1155/2014/463815.

Отримано 18.08.2017 ■

Бойчук Т.Н.¹, Оленович О.А.¹, Грицюк М.И.¹, Гоженко А.И.²

¹ Высшее государственное учебное учреждение Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина

² ДП «Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта МЗ Украины», г. Одесса, Украина

Особенности нарушений функционального состояния почек в ранний период экспериментального сахарного диабета

Резюме. *Цель.* Проведение сравнительного анализа специфичности и выраженности почечных дисфункций в ранний период развития аллоксанового и стрептозототинового сахарного диабета. *Материалы и методы.* Представлены данные относительно особенностей нарушений функционального состояния почек на 11-е сутки после введения нелинейным половозрелым самцам белых крыс диабетогенной дозы стрептозототина (70 мг/кг) и аллоксана (160 мг/кг). *Результаты.* Установлены общие закономерности развития ренальных нарушений в ранний

период стрептозототин- и аллоксан-индуцированного диабета, имеющих, преимущественно, функциональное происхождение в отсутствие значительных структурных изменений канальцевого аппарата почек. *Выводы.* В ранний период развития экспериментального сахарного диабета обоих типов нарушения канальцевого отдела нефрона не ответственные за изменения функции почек.

Ключевые слова: экспериментальный сахарный диабет; аллоксан; стрептозототин; диабетическая нефропатия; функциональное состояние почек

T.M. Boychuk¹, O.A. Olenovych¹, M.I. Grytsiuk¹, A.I. Gozhenko²

¹ Higher State Education Institution of Ukraine "Bukovinian State Medical University", Chernivtsi, Ukraine

² State Enterprise "Ukrainian Scientific Research Institute of Transport Medicine of Ministry of Health of Ukraine", Odesa, Ukraine

Peculiarities of disturbances of the functional renal state in the early period of experimental diabetes mellitus

Abstract. *Background.* The purpose of our research was a comparative analysis of specificity and severity of kidney dysfunction in the early period of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Materials and methods.* The article presents data concerning the peculiarities of disturbances of the functional renal state on 11th day after the administration of diabetogenic dose of streptozotocin (70 mg/kg) and alloxan (160 mg/kg) in white non-linear matured male rats. *Results.* There were found common patterns in the develop-

ment of renal disorders in the early period of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes having, mainly, a functional origin in the absence of significant structural changes in the renal tubular apparatus. *Conclusions.* Disorders of nephron tubular system are not responsible for the changes in renal functions in the early period of experimental diabetes mellitus of both types.

Keywords: experimental diabetes mellitus; alloxan; streptozotocin; diabetic nephropathy; functional renal state