

Грицюк М.І.

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

## Зміни звивистих каналців нирок при введенні НАДФ на тлі стрептозотозин-індукованого цукрового діабету в щурів

For cite: Mezhdunarodnyi Endokrinologicheskii Zhurnal. 2017;13(8):624-629. doi: 10.22141/2224-0721.13.8.2017.119282

**Резюме. Мета.** Вивчення змін структур звивистих каналців нирок при введенні нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ) на тлі індукованого стрептозотозином цукрового діабету (ЦД) у щурів. **Матеріали та методи.** Експерименти проведено на самцях білих щурів, яким моделювали ЦД шляхом уведення стрептозотозину в дозі 70 мг/кг. НАДФ вводили у дозі 30 мг/кг. Вивчали структури нирок на 11-ту, 21-шу та 31-шу добу експерименту. **Результати.** На противагу класичним методам забарвлення ранні зміни в різних структурах нирки були виявлені за допомогою гістохімічного методу на основі забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за методом Mikel Calvo. **Висновки.** Загалом структури нирок виявляли позитивну реакцію на введення НАДФ, що може бути пов'язане зі зниженням прямого ушкоджувального впливу гіперглікемії як за рахунок зменшення кількості глікозилованих білків, так і внаслідок прямого безпосереднього його позитивного впливу на стан ендотеліоцитів.

**Ключові слова:** цукровий діабет; нефропатія; стрептозотозин; звивисті каналці

### Вступ

Цукровий діабет (ЦД) — поширене не лише в Україні, а й у світі неінфекційне захворювання, що характеризується поступовим розвитком мікро- та макросудинних ускладнень. Одним із таких ускладнень є діабетична нефропатія (ДН). Доклінічною ознакою розвитку нефропатії є мікроальбумінурія — екскреція альбуміну із сечею — від 30 до 300 мг/добу. Клінічні ознаки ДН проявляються при загибелі великої кількості нефронів і склерозі 20–25 % клубочків та починаються з розвитку систоло-діастолічної гіпертензії, що переважно має ренін-залежний механізм [1–3]. Патоморфологічною основою змін у нирках є тубулоінтерстиційний фіброз, ознаками якого є зміни в інтерстиції та каналцях нирок у вигляді клітинної інфільтрації, накопичення компонентів екстрацелюлярного матриксу (колагену, фібронектину, ламініну), розрос-

тання та склероз інтерстицію, гіаліново-гідропічної дистрофії каналцевого епітелію, що в подальшому призводить до апоптозу тубулярних клітин, атрофії каналців і втрати перитубулярних капілярів [1, 4].

Важлива роль у патогенезі ушкодження нирок належить ураженню подоцитів, мезангіальних клітин, ендотелію мікросудин [5–7]. Це пов'язане з тим, що нирки більше, ніж інші органи, залежать від функціонального стану ендотелію внаслідок наявності в них великого пулу ендотеліальних клітин, які є інсулінонезалежними. Тому в умовах гіперглікемії глюкоза безперешкодно потрапляє в них, спричинюючи порушення їх функцій через патологічні метаболічні зміни [8, 9].

Окрім того, розлади нормального функціонування нирок відбуваються також через порушення процесів глікозилювання білків. Останні зв'язуються з вільними амінами білків, ліпідів і нуклеїнових

кислот, змінюючи їх якість. Цей процес супроводжується вторинною експресією цитокінів, які залучають макрофаги та моноцити, і призводить до розвитку локальної запальної реакції, накопичення в матриксі глікозильованого альбуміну, імуноглобулінів та імунних комплексів. Останні, в свою чергу, стимулюють імунокомпетентні клітини і секрецію цитокінів, що впливає на проліферацію матриксу судинної стінки, порушення її проникності [2, 10].

Для вивчення процесів, які супроводжують ЦД, застосовують різноманітні експериментальні моделі, що його відтворюють. Однією з поширених методик є застосування антибіотика з онкостатичною дією — стрептозотозину [11, 12].

**Мета** роботи: дослідити зміни структур звивистих каналців нирок у динаміці стрептозотозин-індукованого ЦД при введенні нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ).

## Матеріали та методи

Експеримент проведено на 54 статевозрілих нелінійних самцях білих шурів масою 0,17–0,20 кг. Тварин розподіляли на групи. Перша (1-ша) — контрольна група, тварини якої перебували на стандартному режимі годування, освітлення та утримання. Дослідним групам тварин (2, 3 та 4-й) одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотозин (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг [11, 12].

Виведення тварин з експерименту та відповідні дослідження проводили на 11, 21 та 31-шу добу після введення стрептозотозину. До експерименту залучали тварин, рівень глікемії яких перевищував 10 ммоль/л. Для вимірювання рівня глюкози використовували стандартний глюкометр HealthPro (Південна Корея).

У наступній серії експериментів показники контрольної групи тварин порівнювали з такими в дослідних групах із моделюванням стрептозотозинним ЦД в ті самі часові проміжки при введенні щурам інтраперитонеально розчину НАДФ у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини на ізотонічному розчині хлориду натрію.

Тварин виводили з експерименту під легким ефірним знеболюванням, 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».

Кількісну оцінку стану білків у гістохімічних препаратах, забарвлених бромфеноловим синім за Mikel Salvo, здійснювали методом комп'ютерної мікроспектрофотометрії на основі коефіцієнта R/V [13, 14].

Величину коефіцієнта R/V тлумачили так: якщо вона більше за одицию, то в білках переважали карбоксильні групи над аміногрупами, причому, якщо ця величина більша, то більше і суттєве переважання. Якщо величина коефіцієнта R/V менша за одицию, то в білках переважали аміногрупи над карбоксильними групами. Вірогідність різниці показників визначали з використанням t-критеріїв

Стьюдента. У таблицях значення вірогідності (p) наведені лише для вірогідних ( $p \leq 0,05$ ) різниць показників, що вивчалися.

## Результати

Перелік досліджуваних структур нирки був обраний з урахуванням змін, які були виявлені при експериментальному ЦД без уведення НАДФ. Таким чином вивчали базальні мембрани звивистих каналців, епітелій звивистих каналців, субендотеліальні базальні мембрани інтерстицію, сполучнотканинні волокна інтерстицію.

Дані щодо коефіцієнта R/V у базальних мембранах звивистих каналців разом з ендотеліоцитами при введенні НАДФ на тлі стрептозотозин-індукованого ЦД в різні терміни експерименту подані у табл. 1. Забарвлення мало переважно дифузний характер, було доволі інтенсивним, але відзначалося різними спектральними характеристиками.

Згідно з даними табл. 1, корекція уражень аміногруп білків субепітеліальних мембран вперше стала ефективною на 21-шу добу, причому особливо виражені зрушення встановлені на 31-шу добу експерименту.

Позитивний ефект від застосування НАДФ на епітеліоцити звивистих каналців досягнутий на 31-шу добу експерименту (табл. 2).

Отже, для звивистих каналців нирки, як і для ниркових клубочків, спостерігається ефект від корегувальних заходів тільки тоді, коли мають місце ураження аміногруп білків, а стан структур з нормальними показниками аміногруп білків не змінюється.

Описані зміни у звивистих каналцях нирки ілюструються за допомогою мікрофотознімків кіркової речовини нирки (рис. 1). Досліджено ефекти корегувальних заходів і на субендотеліальні базальні мембрани кровоносних судин інтерстицію кіркової та мозкової речовини і сосочка нирки. Цифрові дані щодо коефіцієнта R/V у зазначених структурах подані в табл. 3, згідно з якими ефекти від уведення НАДФ були присутніми на 21-шу та 31-шу добу експерименту.

Аналогічно реагували й ендотеліоцити кровоносних судин інтерстицію кіркової та мозкової речовини і сосочка нирки.

Кровоносні судини мозкової речовини нирки в експериментальних тварин різних груп дослідження визначено на рис. 2.

## Обговорення

При виконанні наших досліджень для виявлення змін ниркових структур спочатку був застосований класичний гістологічний метод за допомогою забарвлення гістологічних зрізів гематоксиліном та еозином і вивчення їх у світлооптичному мікроскопі при різному оптичному збільшенні. Як описовий метод, так і застосування морфометричних підходів не виявили жодних змін ані в ниркових клубочках, ані в звивистих каналцях, ані в стромі (у тому числі судинах кіркової речовини), ані в збірних трубочках

та інтерстиції мозкової речовини і сосочка нирки. Зокрема, у звивистих каналцях не виявлено альтеративних процесів (будь-яких проявів дегенерації чи посиленої загибелі клітин — некрозу або апоптозу) та потовщення чи змін оптичної щільності субепітеліальних базальних мембран, що зазвичай трапляється при вираженому ЦД. У збірних трубочках мозкової речовини та сосочка нирки також не виявлено ніяких морфологічних змін, так само і в інтерстиції цих ділянок нирки, включно з крово-

носними судинами інтерстицію, сполучнотканинними волокнами й основною речовиною. Однак при застосуванні НАДФ з метою ймовірної корекції ЦД, так само, як і без корекції ЦД, ранні зміни в різних структурах нирки були виявлені за допомогою гістохімічного методу на основі забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за методом Mikel Calvo. Саме ця методика була застосована як основна для виявлення можливих ефектів використання НАДФ при експериментальному ЦД.

**Таблиця 1. Коефіцієнт R/B у базальних мембранах звивистих каналців разом з ендотеліоцитами при введенні НАДФ і модельованому ЦД ( $x \pm Sx$ )**

Назва групи	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД та введенням НАДФ	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД без НАДФ
Інтактні щури (n = 8)	1,100 ± 0,018	
1. Дослідна група (11-та доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,090 ± 0,021	1,100 ± 0,022
2. Дослідна група (21-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,190 ± 0,024 P = 0,003	1,340 ± 0,021 Pi < 0,001 P11 < 0,001
3. Дослідна група (31-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 7)	1,140 ± 0,020 P < 0,001	1,430 ± 0,018 Pi < 0,001 P11 < 0,001 P21 = 0,014

**Примітки (тут і в табл. 2, 3): P — вірогідність розбіжності порівняно з тваринами без НАДФ; Pi — вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин; P11 — вірогідність розбіжності з групою на 11-ту добу; P21 — вірогідність розбіжності з групою на 21-шу добу (за критерієм Mann — Whitney).**

**Таблиця 2. Коефіцієнт R/B у цитоплазмі епітелію звивистих каналців разом з ендотеліоцитами при введенні НАДФ і модельованому ЦД ( $x \pm Sx$ )**

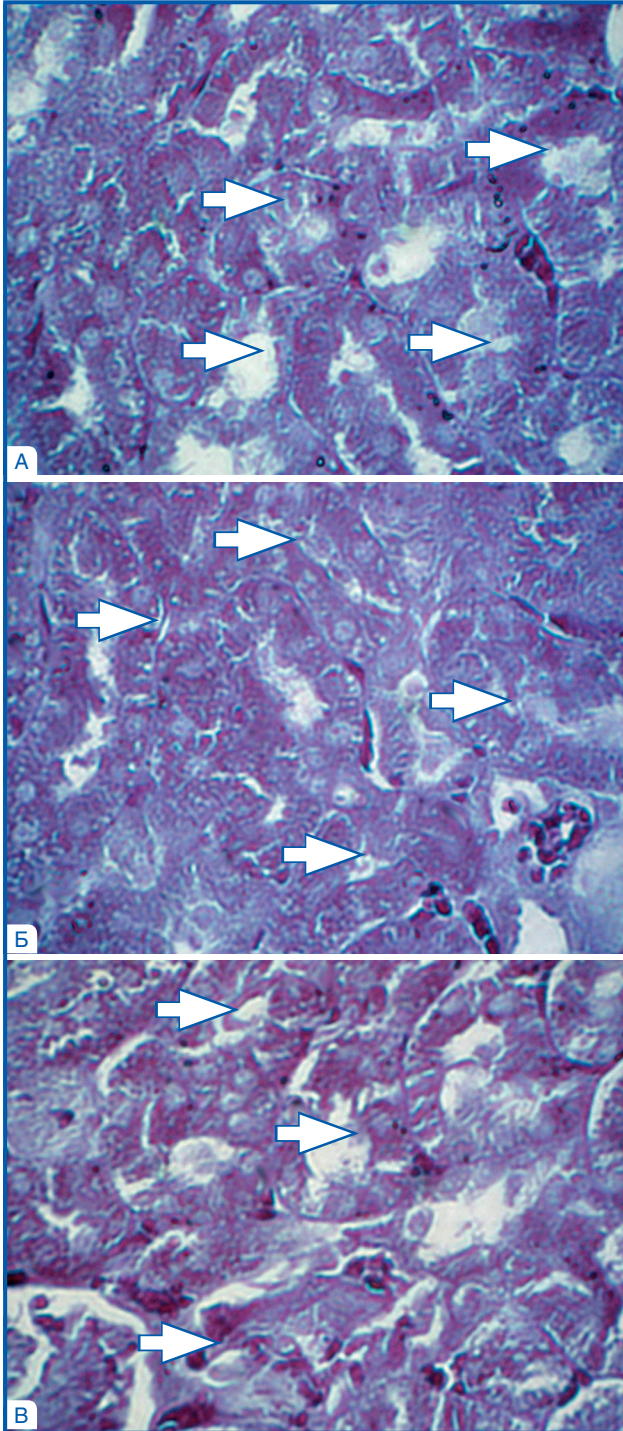
Назва групи	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД та введенням НАДФ	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД без НАДФ
Інтактні щури (n = 8)	1,220 ± 0,014	
1. Дослідна група (11-та доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,250 ± 0,020	1,260 ± 0,019
2. Дослідна група (21-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,250 ± 0,022	1,270 ± 0,022
3. Дослідна група (31-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 7)	1,290 ± 0,023 P = 0,007	1,390 ± 0,024 Pi = 0,002 P11 = 0,006 P21 = 0,009

**Таблиця 3. Коефіцієнт R/B у субендотеліальних базальних мембранах кровоносних судин інтерстицію кіркової та мозкової речовини і сосочка нирки при введенні НАДФ та експериментальному цукровому діабеті в різні терміни експерименту ( $x \pm Sx$ )**

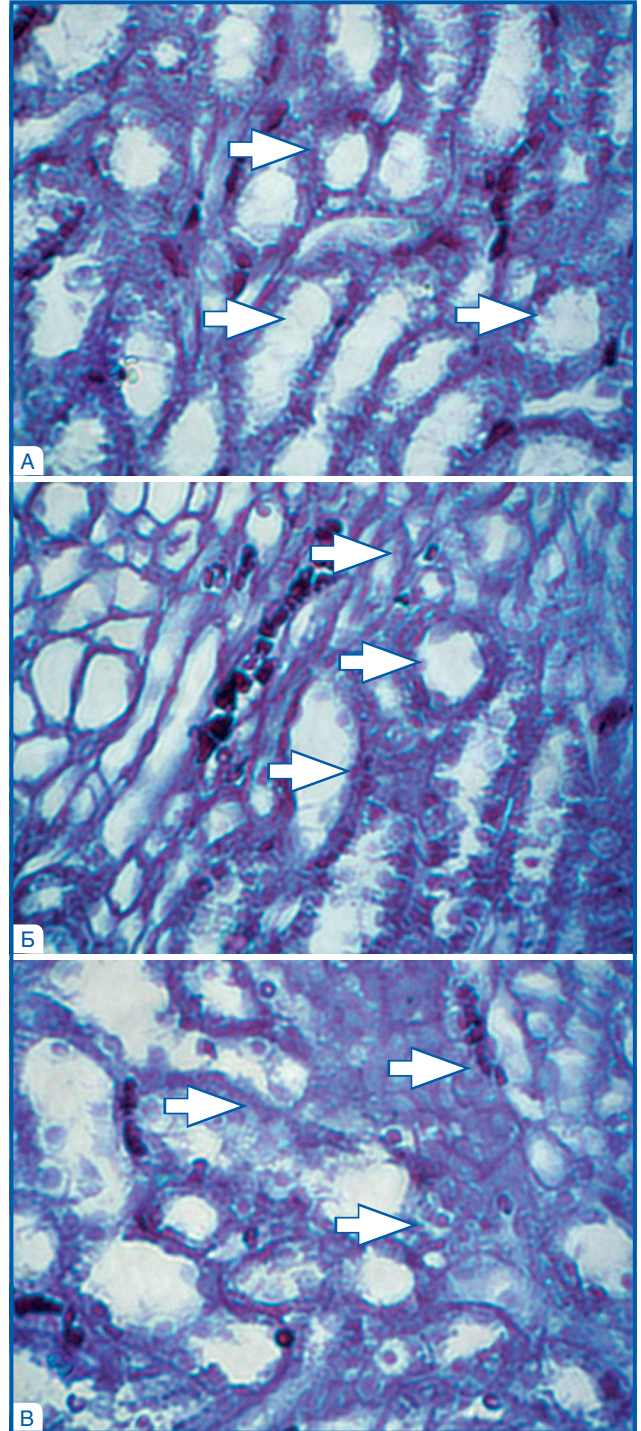
Назва групи	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД та введенням НАДФ	Коефіцієнт R/B у щурів із ЦД без НАДФ
Інтактні щури (n = 8)	1,040 ± 0,010	
1. Дослідна група (11-та доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,040 ± 0,017	1,040 ± 0,014
2. Дослідна група (21-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 8)	1,170 ± 0,013 P = 0,002	1,290 ± 0,016 Pi < 0,001 P11 < 0,001
3. Дослідна група (31-ша доба після введення стрептозотоцину) (n = 7)	1,160 ± 0,014 P < 0,001	1,310 ± 0,017 Pi < 0,001 P11 < 0,001 P21 > 0,05

Визначення коефіцієнта R/V у проведених дослідженнях показало ефективність застосованої методики. Цінність цього показника полягає у тому, що при ЦД від самого початку захворювання активізуються процеси окиснення та глікозилювання аміногруп білків, що призводить до змін у співвідношенні

між карбоксильними групами та аміногрупами в білках. Отже, метод дозволяє оцінити найперші зміни диференційовано в різних мікроскопічних структурах (різних клітинах ниркових клубочків, ендотеліюцитах кровоносних судин, епітелії ниркових каналців, базальних мембранах тощо).



**Рисунок 1.** Звивисті каналці нирки (позначені стрілками) щура. Забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за Mikel Salvo. Об. 40<sup>х</sup>. Ок. 10<sup>х</sup>; А — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 11-та доба; Б — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 21-ша доба; В — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 31-ша доба



**Рисунок 2.** Мозкова речовина нирки щура. Забарвлення гістологічних зрізів бромфеноловим синім за Mikel Salvo. Об. 40<sup>х</sup>. Ок. 10<sup>х</sup>; А — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 11-та доба; Б — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 21-ша доба; В — НАДФ + експериментальний цукровий діабет — 31-ша доба

Відомо, що гіперглікемія може сприяти внутрішньоклітинним змінам окисно-відновного стану з активацією протеїнкінази С, що призводить до виснаження клітинного пулу НАДФ, який, у свою чергу, необхідний для генерації NO.

При використанні жирних кислот як альтернативного джерела енергії в організмі накопичуються кетоніві тіла: ацетон, ацетоцтова кислота,  $\beta$ -оксимаєляна кислота. Це пояснюється тим, що ацетил-КоА (кофермент А), що утворюється внаслідок окиснення, не може повністю вступити в цикл Кребса через недостатність останнього [5, 6]. Також через недостатність пентозофосфатного циклу знижується утворення відновленого НАДФ, який необхідний для альтернативного шляху перетворення ацетил-КоА знову на жирні кислоти. Таким чином, для ацетил-КоА залишається лише один шлях перетворень — на кетоніві тіла. При ЦД 1-го типу, який характеризується інсуліновою недостатністю, швидкість утворення кетонівіх тіл значно перевищує швидкість їх розпаду й екскреції з сечею. При накопиченні кетонівіх тіл порушується кислотно-основна рівновага, розвивається метаболічний ацидоз [3, 9].

При застосуванні НАДФ ми отримали деяке покращення показників морфологічного стану окремих ниркових структур. Швидше за все, дія НАДФ відбувається не на рівні впливу на функціонування нефронів, а, ймовірно, на рівні обміну речовин, при якому спостерігається загальне зменшення виділення активних іонів в водню.

Загалом структури нирок виявляють позитивну реакцію на введення НАДФ, що може бути пов'язане зі зниженням прямого ушкоджувального впливу гіперглікемії (можливо, за рахунок зменшення кількості глікозилованих білків) або внаслідок його прямого безпосереднього позитивного впливу на стан ендотеліоцитів.

## Висновки

На підставі проведених гістохімічних досліджень можна констатувати, що застосовані методи корекції шляхом уведення НАДФ уражень аміногруп білків є частково ефективними щодо всіх структур нирок експериментальних тварин, де були виявлені зміни. Частковість ефекту полягає в тому, що стан аміногруп білків хоч і покращувався, але в основному не досягав рівня нормальних величин.

**Конфлікт інтересів.** Автор заявляє про відсутність конфлікту інтересів при підготовці даної статті.

## References

1. Skrobons'ka NA, Cymbal TS. Diabetic nephropathy: some unconventional causes of pathogenesis, basic directions of diagno-

sis and treatment (literature review and own data). *Simejna medicina*. 2011;4:18-22. (in Ukrainian).

2. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017 Dec 7;12(12):2032-2045. doi: 10.2215/CJN.11491116.

3. Urushihara M, Kagami S. Role of the intrarenal renin-angiotensin system in the progression of renal disease. *Pediatr Nephrol*. 2017;9:1471-1479. doi: 10.1007/s00467-016-3449-7.

4. Jefimov AS, Skrobons'ka NA, Cymbal TS. Pathogenetic markers in the development of diabetic nephropathy in 1 type diabetes mellitus patients, their importance in early diagnosis and treatment optimization. *Endokrynologia*. 2014;19(4):295-296. (in Ukrainian).

5. 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 Sep 15;592(18):3997-4012. doi: 10.1113/jphysiol.2014.272328.

6. Yang GK, Maahs DM, Perkins BA, Cherney DZ. Renal hyperfiltration and systemic blood pressure in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2013 Jul 4;8(7):e68908. doi: 10.1371/journal.pone.0068908.

7. Zeni L, Norden AGW, Cancarini G, Unwin RJ. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease. *J Nephrol*. 2017 Dec;30(6):701-717. doi: 10.1007/s40620-017-0423-9.

8. Srivastava T, Thiagarajan G, Alon US, et al. Role of biomechanical forces in hyperfiltration-mediated glomerular injury in congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *Nephrol Dial Transplant*. 2017 May 1;32(5):759-765. doi: 10.1093/ndt/gfw430.

9. Zhang C, Meng Y, Liu Q, et al. Injury to the endothelial surface layer induces glomerular hyperfiltration rats with early-stage diabetes. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 953740. doi: 10.1155/2014/953740.

10. Olinyk OJ, Fediv OI, Davydenko IS, Ushakov AV. The oxidant-antioxidant homeostasis and oxidative modification of proteins in patients with gastric and duodenal ulcers, combined with the diabetes mellitus, in the dynamics of treatment. *Patologia*. 2010;7(3):87-90. (in Ukrainian).

11. Bequer L, Gmez T, Molina JL, Artiles D, Berm dez R, Clap s S. Streptozotocin diabetogenic action in an experimental neonatal induction model. *Biomedica*. 2016 Jun 3;36(2):230-8. doi: 10.7705/biomedica.v36i2.2686.

12. Kolesnyk YuM, Ivanenko TV, Abramov AV, Kuzo NV. Current methods of the modeling of experimental diabetes mellitus type 2: a literature review. *Pathologia*. 2016;1(36):10-14. doi: 10.14739/2310-1237.2016.1.72365.

13. Davydenko IS, Davydenko OM. Histochemical peculiarities of protein oxidative modification in the cells of the renal glomerule in acute postinfective glomerulonephritis. *Buk Med Herald*. 2012;16(3 part 2):106-108. (in Ukrainian).

14. Davydenko IS. Measures of standardization of the histochemical method on oxidizing modification of proteins. *Ukrain's'kyj medychnyj al'manah*. 2013;16 Suppl 3:180-181. (in Ukrainian).

Отримано 03.11.2017 ■

Грицюк М.И.

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

### Изменения извитых канальцев почек при введении НАДФ на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс

**Резюме. Цель.** Изучение изменений структур канальцев почек при введении никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) на фоне индуцированного стрептозоточином сахарного диабета (СД) у крыс. **Материалы и методы.** Эксперименты проведены на самцах белых крыс, которым моделировали СД путем введения стрептозотоцина в дозе 70 мг/кг. НАДФ вводили в дозе 30 мг/кг. Изучали структуры почек на 11, 21 и 31-е сутки эксперимента. **Результаты.** В противоположность классическим методам окраски ранние изменения в различных структурах почки были обнаружены с помощью

гистохимического метода на основе окраски гистологических срезов бромфеноловым синим по методу Mikel Calvo. **Выводы.** В целом структуры почек проявляли положительную реакцию на введение НАДФ, что может быть связано со снижением прямого повреждающего воздействия гипергликемии как за счет уменьшения количества гликозилированных белков, так и вследствие прямого непосредственного его положительного влияния на состояние эндотелиоцитов.

**Ключевые слова:** сахарный диабет; нефропатия; стрептозотоцин; извитые канальцы

M.I. Grytsiuk

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

### Changes in the convoluted tubules of the kidneys at the administration of NADP on the background of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats

**Abstract. Background.** The objective of the study was to investigate the changes in kidney tubular structures during nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) administration on a background of streptozotocin-induced diabetes mellitus (DM) in rats. **Materials and methods.** The experiments were performed on male white rats, with modeled DM by administration of streptozotocin at a dose of 70 mg/kg. NADP was administered at a dose of 30 mg/kg. We studied the structure of the kidneys on the 11<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 31<sup>st</sup> day of the experiment. **Results.** In contrast to the classical methods of staining, early changes

in various kidney structures were detected using a histochemical method based on the staining of histological sections with bromophenol blue by the method of Mikel Calvo. **Conclusions.** In general, the kidney structures showed a positive reaction to the administration of NADP, which may be determined by a reduction in the direct damaging effect of hyperglycemia, both due to a reduction in the number of glycosylated proteins and the direct positive effects on the endothelial cells.

**Keywords:** diabetes mellitus; nephropathy; streptozotocin; convoluted tubules