

М.Р. Красний, В.О. Сергієнко, В.І. Ковалишин, О.О. Сергієнко

ВПЛИВ ВІТАМІНУ С НА УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ ГЕМОКАПІЛЯРІВ НИРОК У БІЛИХ ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ

Національний медичний університет імені Данила Галицького, Львів

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) наразі визнано глобальною медико-соціальною проблемою на підставі епідемічного характеру розповсюдження цього захворювання, яке посідає сьоме місце серед провідних причин смертності населення у більшості країн світу. Соціальний тягар ЦД головним чином обумовлено розвитком мікро- і макроангіопатій, які істотно знижують тривалість і якість життя хворих. Сьогодні діабетична нефропатія розвивається у третини хворих на ЦД 1-го типу та залишається головною причиною (25–35%) усіх випадків кінцевої стадії ниркової недостатності в Європі, США та Японії. Прогресування цукрового діабету (ЦД) супроводжується розвитком склеротичних змін у судинах ниркового клубочка та нирковою недостатністю [1, 3, 7, 10, 11, 14]. Діабетична нефропатія (ДН) є однією із провідних причин інвалідизації та смерті хворих на ЦД.

Наразі частково досліджено особливості морфологічних змін нирок за ЦД методами світлооптичної та електронної мікроскопії [1, 3, 8, 11, 22]. Зокрема, акцентується увага на патоморфологічних змінах клітин нефрона та сполучної тканини, а розвиток ДН аналізується з позицій сорбітолової та інших альтернативних теорій патогенезу [1–11, 14].

В окремих працях зроблено аналіз ультраструктурних змін у судинах на ранніх етапах розвитку стрептозотоцинового діабету із залученням гіпотези про їх коагуляційний генезис [15]. Натомість аналіз системних електронно-мікроскопічних змін клубочкових і перитубулярних гемокapілярів ниркової кори на ранніх і пізніх стадіях розвитку стрептозотоцинового діабету в динаміці відсутній. Водночас сучасні уявлення про множинність механізмів, за допомогою яких гіперглікемія спричинює ушкодження судин, ставлять під сумнів можливість їхнього усунення за допомогою одного фармакологічного агента.

Проблемі пошкодження паренхіматозних органів, у тому числі і нирок, за ЦД 2-го типу присвячено значну кількість публікацій із різних галузей науки, зокрема морфології, виконаних із застосуванням як світлооптичних приладів, так і електронного мікроскопа у трансмісійному або скануючому режимі.

Відомо також, що поєднаний вплив вітамінів С та Е на ліпідний профіль у жінок, хворих на ЦД 2-го типу з дисліпідемією, та в експерименті приводить до поліпшення глюкозного гомеостазу та вірогідного зниження концентрації загального холестерину, холестерину ліпопротеїнів низької щільності та інтенсивності перекисного окислення ліпідів порівняно з діабетичним контролем. Що ж до морфологічних праць, які стосувалися проблем морфології в даному питанні, то є лише поодинокі повідомлення, що вказують на позитивний вплив вітаміну С на регенеративні процеси клітин, клітинних і неклітинних елементів низки органів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

У статевозрілих щурів-самців лінії Вістар вагою 180–200 г (n=10) моделювали діабет шляхом одноразового внутрішньочеревного введення стрептозотоцину (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг маси тіла. Експериментальні тварини протягом 1 місяця отримували перорально плацебо (рослинну олію) або вітамін С у дозі 7 мг на 100 г маси тіла. Інтактні тварини відповідного віку та статі склали контрольну групу (n=5). Глюкозу у крові визначали глюкозооксидазним методом. Діабет діагностували після досягнення показників глікемії ~15,0 ммоль/л. Через 1 місяць після лікування вітаміном С проводили евтаназійну декапітацію тварин.

Для електронномікроскопічного дослідження біоптати ниркової кори фіксували у 2% OsO_4 на 0,1 М фосфатному буфері з рН 7,36 впродовж 2 годин. Після фіксації обробку матеріалу здійснювали за загальноприйнятою методикою [20]. Ультратонкі зрізи з блоків тканин готували на ультрамікромомі УМТП-3М і послідовно контрастували у розчинах ураніацетату [22] і цитрату свинцю [21]. Проконтрастовані зрізи вивчали та фотографували за допомогою електронного мікроскопа УЕМВ-100К (прискорююча напруга 75 кВ). Отримані дані статистично обробляли параметричними методами із застосуванням t критерію Стьюдента та визначенням показника вірогідності різниці (p).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За результатами електронномікроскопічного дослід-

ження ультраструктуру ниркової кори через один місяць лікування у вигляді щоденного введення білим щурам, що перебували на четвертому тижні стрептозотоцин-індукованого діабету, вітаміну С у дозі 7 мг на 100 г маси тіла було представлено оптимально розвинутими клітинами, клітинними та неклітинними елементами як нефронів, так і сполучної тканини. Насамперед це стосувалося клубочкових і перитубулярних гемокапілярів.

Деяко розширені просвіти клубочкових гемокапілярів були заповнені електронно-світлою плазмою крові. У плазмі крові виявлялися гомогенно розташовані незначні скупчення дрібноволокнистого матеріалу. Крім цього, у центральних частинах просвітів гемокапілярів знаходилися еритроцити та поодинокі тромбоцити. По периферії еритроцитів визначалася розвинута, чітко контурована плазматична мембрана. Між окремими еритроцитами та люменальною поверхнею ендотеліальних клітин завжди виявлялися значні прошарки плазми крові (рис. 1).

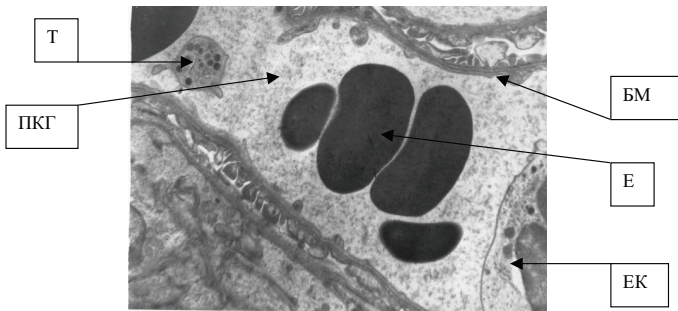


Рис. 1. Ультраструктура гемокапіляра, розширений просвіт якого заповнено еритроцитами, тромбоцитами, плазмою крові. 36. 10 000.

Тут і далі на рисунках:

БМ — базальна мембрана; Е — еритроцит; ЕК — ендотеліальна клітина; ЕПД — епітеліальна клітина канальця дистального відділу нефрона; ЕПП — епітеліальна клітина проксимального відділу нефрона; ЗТ — залишкові тільця; М — мітохондрія; МВ — мікроворсинка; ПКГ — просвіт клубочкового гемокапіляра; ПКП — просвіт канальця проксимального відділу нефрона; ПМ — плазматична мембрана; ПОД — пододцит; ППГ — просвіт перитубулярного гемокапіляра; СЕН — субендотеліальний шар; СЕП — субепітеліальний шар; СТ — сполучна тканина; Т — тромбоцит; ЦП — цитоподія; Я — ядро; Яд — ядерце.

До складу стінки клубочкових гемокапілярів зсередини входили електронно-світлі ендотеліальні клітини. Ці клітини містили великих розмірів ядро, заповнене в основному еухроматином. Цитоплазма даних клітин була головним чином насичена електронно-світлою дрібнозернистою гіалоплазмою. Основна маса цитоплазматичних органел, рибосоми та полісоми були розташовані у цитоплазмі, прилеглий до ядра. Треба також відзначити, що між базальною плазматичною мембраною ендотеліальних клітин і базальною мембраною стінки клубочкових гемокапілярів знаходився електронно-світлий проша-

рок, субендотеліальний шар. Базальна мембрана у таких ділянках клубочкових гемокапілярів була тонкою, майже однакової товщини на всьому протязі. З іншого боку вказаних базальних мембран виділявся субепітеліальний шар, який обмежували термінальні закінчення плазматичних мембран цитоподій і фільтраційні щілини, що перебували на етапах формування (рис. 2).

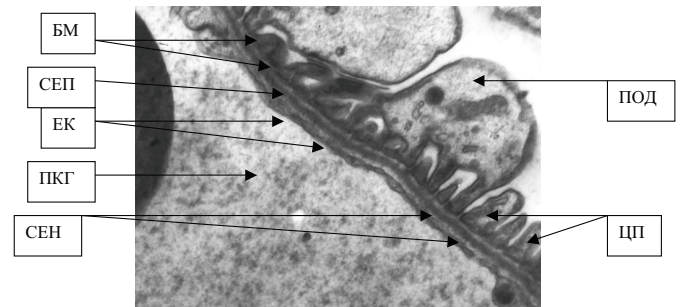


Рис. 2. Ультраструктура гломерулярного фільтра нирково-го тільця білого щура зі стрептозотоциновим діабетом через один місяць лікування вітаміном С. 36. 46 000.

Після лікування просвіти перитубулярних гемокапілярів були оптимально розширеними та містили в основному електронно-світлу плазму крові з поодинокими еритроцитами (рис. 3).

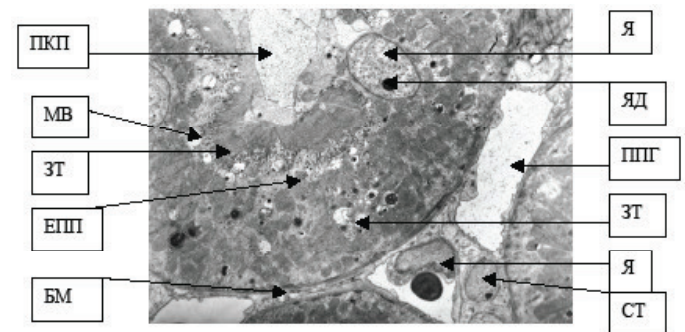


Рис. 3. Ультраструктура перитубулярних гемокапілярів та епітеліальних клітин канальців проксимального відділу нефрона білого щура зі стрептозотоциновим діабетом через один місяць лікування вітаміном С. 36. 6 000.

Стінка таких гемокапілярів була побудована електронно-світлими ендотеліальними клітинами. Основна маса цитоплазматичних органел клітин була сконцентрована у ділянках цитоплазми, наближених до ядра. Серед цитоплазматичних органел розрізнялись поодинокі мітохондрії з добре розвинутою системою крист, ендоплазматичний ретикулум гранулярного типу, поодинокі профілі канальців агранулярного типу, рибосоми, полісоми. Периферичні, базальні частини цитоплазми ендотеліальних клітин, що знаходились поблизу ядра, утворювали вузький цитоплазматичний прошарок, що простягався на значну відстань вздовж базальної мембрани таких гемокапілярів. Треба відзначити, що периферичні тонкі части-

ни ендотеліальних клітин містили значну кількість діафрагмованих фенестр (рис. 4).

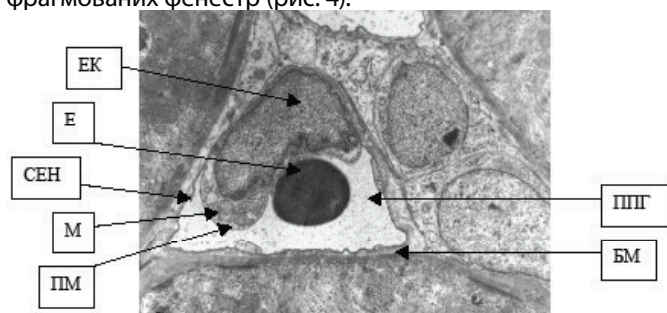


Рис. 4. Ультраструктура ендотеліальної клітини, субендотеліального шару та базальної мембрани стінки перитубулярного гемокапіляра щура зі стрептозотциновим діабетом через один місяць лікування вітаміном С. 36. 10 000.

Цитоплазма ендотеліальних клітин у ділянках, прилеглих до діафрагмованих фенестр, мала значну електронну щільність. Між тонкою базальною мембраною перитубулярних гемокапілярів і базальною плазматичною мембраною ендотеліальних клітин виявлявся вузький субендотеліальний прошарок, який не завжди мав однакову товщину. До базальних мембран гемокапілярів прилягала основна речовина сполучної тканини, наповнена невеликими за розмірами електронно-світлимими клітинами. Дані клітини мали велике ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Їх ядро було заповнено в основному еухроматином, а цитоплазма — дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами, полісомами та профілями ендоплазматичного ретикулулу гранулярного типу, що перебував на етапах формування, дрібними мітохондріями. Такі клітини знаходились у тісному взаємозв'язку між собою та з базальними мембранами каналців нефронів. Також відзначено, що ті частини стінок перитубулярних гемокапілярів, до складу яких входили діафрагмовані фенестри, були у безпосередній близькості до базальних мембран тих або інших частин каналців нефрона. Прилеглі до вищеписаних перитубулярних гемокапілярів ті або інші частини каналців нефронів було представлено оптимально розвинутими базальною мембраною, субендотеліальним шаром, епітеліальними клітинами та дещо розширеними просвітами.

Нами також виявлено, що цитоплазма окремих епітеліальних клітин каналців проксимального відділу нефрона була наповнена значною кількістю аутофаголізосом, цистерн і мікроміхурців комплексу Гольджі, залишковими тільцями, оточеними дрібнозернистою гіалоплазмою, рибосомами, полісомами, мітохондріями з добре розвинутими кристами та матриксом. Ядра даних клітин мали яйцеподібну форму і містили в основному еухроматин та оптимально розвинуте ядрце.

Основну ж масу епітеліальних клітин як проксимального, так і, надто, дистального відділу каналців нефрона було представлено клітинами з середньою електронною

щільністю. Плазматична мембрана таких клітин утворювала спеціалізовані дуплікатури складок у базальній частині цитоплазми, а також апікальній, у клітинах проксимального відділу каналців нефрона утворювала облямівку з тісно прилеглих одна до одної мікрворсинок (рис. 5).

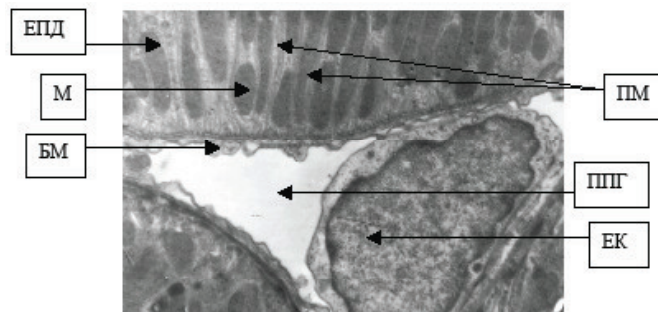


Рис. 5. Ультраструктура базальної частини цитоплазми каналця дистальної частини нефрона щура зі стрептозотциновим діабетом із великою кількістю дуплікатур плазматичної мембрани та мітохондрій через один місяць лікування вітаміном С. 36. 10 000.

ВИСНОВКИ

Отже, отримані нами дані свідчать про можливість використання антиоксидантного препарату — вітаміну С — як ефективного додаткового компонента комплексної антидіабетичної терапії, спрямованої на блокування основних патогенетичних процесів (оксидативного стресу та неферментативного глікування), що дозволить істотно знизити частоту і тяжкість діабетичної нефропатії.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Александрова Е.А.* Состояние мембран тромбоцитов у больных СД 1-го типа в зависимости от стадии диабетической нефропатии: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.14 / Е.А. Александрова. — ГУ «ЭНЦ РАМН». — М., 2003. — 20 с. Издано в Москве.
2. *Алексевич Я.І.* Роль субфракцій тетанотоксину в пошкодженні ультраструктур нирок / Я.І. Алексевич, В.І. Ковалишин, Д.Л. Плахтін // Актуальні проблеми медицини, біології, ветеринарії і сільського господарства. — Львів, 1996. — С. 3–6.
3. *Бурлак М.І.* Динамічна реносцинтиграфія в діагностиці уражень нирок у хворих на цукровий діабет / М.І. Бурлак, В.М. Славнов, В.В. Марков // Ендокринологія. — 1997. — № 1. — С. 30–35.
4. *Брагарник М.М.* Ультраструктурні особливості ЮГА та деякі показники функції нирок у щурів з експериментальним цукровим діабетом 1-го типу / М.М. Брагарник // Ендокринологія. — 1997. — № 2. — С. 18–27.
5. *Брагарник М. М.* Вплив препарату ізодибут на ультраструктуру нирок щурів з тривалим перебігом цукрового діабету 1-го типу / М.М. Брагарник, Т.І. Богданова, І.М. Мельник // Ендокринологія. — 2000. — Т. 5, № 1. — С. 64–70.
6. *Зверев Я.Ф.* Сосудисто-тканевые реакции почек в условиях экспериментальной патологии / Я.Ф. Зверев, С.В. Талалаев,

- В.М.Брюханов // Нефрология. — 2000. — Т. 4, № 3. — С. 82–84.
7. Викулова О.К. Клинико-лабораторные и генетические факторы развития и прогрессирования диабетической нефропатии у больных СД 1-го типа: автореф. дис. на здобуття наук ступеня канд. мед. наук: спец. 14.01.14 / О.К. Викулова. — ГУ «ЭНЦ РАМН». — М., 2003. — 19 с.
 8. Добронравов В.А. Диабетическая нефропатия / В.А. Добронравов // Нефрология. — 2000. — Т.4, № 2. — С. 81–82.
 9. Ефимов А.С. Диабетические ангиопатии / А.С.Ефимов — М.: Медицина, 1989. — 288 с.
 10. Кривко Ю.Я. Стан ультраструктур сідничного нерва та його супровідної артерії у білих щурів при експериментальному цукровому діабеті / Ю.Я. Кривко // Укр. мед. альманах — 2001. — Т.4, № 3. — С. 204–209.
 11. Кривко Ю.Я. Зміни ультраструктури синапсів і рухових нейронів передніх рогів спинного мозку у щурів з стрептозотоциновим індукованим діабетом / Ю.Я. Кривко // Практична медицина. — 2003. — Т.9, №5. — С. 91–95.
 12. Перцева Н.О. Діабетична нефропатія / Н.О. Перцева // Урологія. — 2000. — Т.4, № 1. — С. 104–109.
 13. Пиріг Л.А. Цукровий діабет і патологія нирок / Л.А. Пиріг // Doctor. — № 5. — С. 32–34.
 14. Сергієнко О.О. Патогенетичне лікування діабетичної нейропатії / О.О. Сергієнко, А.М. Урбанович, Ю.Я. Кривко // Експериментальна та клінічна ендокринологія. — 2001. — № 1. — С. 105–114.
 15. Серов В.В. Иммунокомплексная болезнь / В.В. Серов // Арх. патол. — 1981. — № 5. — С. 8–9.
 16. Зурнаджи Ю.Н. Субмикроскопические перестройки в клубочковом отделе нефрона крыс при стрептозотоциновом диабете и возможность их медикаментозной коррекции / Ю.Н. Зурнаджи, А.С. Ефимов, Т.И. Богданова [и др.] // Probl. эндокринол. — 1987.— Т. 33, № 3. — С. 54–59.
 17. Зербино Д.Д. Ультраструктура микроциркуляторных путей в патологии / Д.Д. Зербино // Материалы республиканской конференции. — Львов. — 1974. — С. 174–175.
 18. Ильин А.П. Особенности течения хронической почечной недостаточности у больных сахарным диабетом, находившихся на гемодиализе / А.П. Ильин, В.Ф. Богоявленский, Е.Е. Смурякова // Проблемы эндокринології. — 2004. — № 1. — С. 13–18.
 19. Glauert A. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. In: Practical methods in electron microscopy. Ed by Glauert A.M. North-Holland (American Elsevier). — 1975. — 207 p.
 20. Monastyrskiy V. Discovery of the trombin-plastem as one of the major regulatory systems et the organism // Експериментальна фізіол. та біохім. — 2005. — № 4 — С. 47–65.
 21. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as sn electronopague stain in electron microscopy // J. Cell Biol. — 1963. — 17. — P. 208–212.
 22. Stempac J.G., Ward R.T. An improved staining method for electron microscopy // J. Cell Biol. — 1964. — 22. — P. 697–701.

РЕЗЮМЕ

Влияние витамина С на ультраструктурные изменения гемокapилляров почек у белых крыс со стрептозотоциновым диабетом

М.Р. Красный, В.А. Сергиенко, В.И. Ковалишин, А.А. Сергиенко

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии исследованы изменения ультраструктуры гемокapилляров почечной коры у белых крыс на восьмой неделе моделирования стрептозотоцинового диабета и после антиоксидантного лечения витамином С. Полученные данные демонстрируют возможность использования витамина С в качестве эффективного вспомогательного компонента комплексной антидиабетической терапии, направленной на блокирование главных патогенетических процессов (оксидативного стресса и неферментативного гликирования), что позволит существенно снизить частоту и тяжесть диабетической нефропатии.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет, кора почек, гемокapилляры клубочков, перитубулярные гемокapилляры, электронная микроскопия, витамин С.

SUMMARY

Influence of vitamin C on ultrastructural changes of renal cortex in rat streptozotocin-induced diabetes

M. Krasny, V. Serhiyenko, V. Kovalishin, A. Serhiyenko

The results of electron transmission microscopy showed changes of ultrastructure of blood haemocapillars of rat renal cortex on the eight weeks of experimental streptozotocin-induced diabetes and after antioxidant administration of vitamin C. The obtained data indicate the possibility of using the antioxidant vitamin C as an effective additional constituent of complex anti-diabetic therapy intended to prevent the main pathogenic processes (oxidative stress and non-fermentative glycolization). This will enable to reduce the rate and severity of diabetic nephropathy considerably.

Key words: streptozotocin-induced diabetes, renal cortex, haemocapillars, renal cortex peritubular capillars, electron microscopy, vitamin C.

Дата надходження до редакції 04.01.2010 р.