

OLENOVYCH, Olha & ZUKOW, Walery. Osmotic concentration of urine in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes. *Journal of Education, Health and Sport*. 2022;12(10):389-400. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.12775/JEHS.2022.12.10.045>  
<https://apcz.umk.pl/JEHS/article/view/42555>  
<https://zenodo.org/record/7632534>

The journal has had 40 points in Ministry of Education and Science of Poland parametric evaluation. Annex to the announcement of the Minister of Education and Science of December 21, 2021. No. 32343. Has a Journal's Unique Identifier: 201159. Scientific disciplines assigned: Physical Culture Sciences (Field of Medical sciences and health sciences); Health Sciences (Field of Medical Sciences and Health Sciences). Punkty Ministerialne z 2019 - aktualny rok 40 punktów. Załącznik do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 21 grudnia 2021 r. Lp. 32343. Posiada Unikatowy Identyfikator Czasopisma: 201159. Przynależność dyscypliny naukowej: Nauki o kulturze fizycznej (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu); Nauki o zdrowiu (Dziedzina nauk medycznych i nauk o zdrowiu).

© The Authors 2022.

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Nicolaus Copernicus University in Torun, Poland

Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author (s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non commercial license Share alike.

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 10.09.2022. Revised: 02.10.2022. Accepted: 30.10.2022.

UDC 616.379-008.64-092.9:612.466.21

## OSMOTIC CONCENTRATION OF URINE IN THE DYNAMICS OF THE DEVELOPMENT OF ALLOXAN-INDUCED EXPERIMENTAL DIABETES

**Olenovych Olha**, PhD, MD – Associate Professor of the Department of Clinical Immunology, Allergology and Endocrinology, Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine.

<https://orcid.org/0000-0002-9824-8885>

E-mail: [olenovych.olga@bsmu.edu.ua](mailto:olenovych.olga@bsmu.edu.ua)

**Zukow Walery**

Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

<https://orcid.org/0000-0002-7675-6117>

E-mail: [w.zukow@wp.pl](mailto:w.zukow@wp.pl)

### Abstract

In order to clarify the peculiarities of the osmotic concentration of urine in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes mellitus (EDM), the experiments were carried out on 54 white non-linear mature male rats after modeling of diabetes by intraperitoneal administration of alloxan (Alloxan monohydrate, «Acros Organics», Belgium) at a dose of 160 mg/kg of body weight after a previous 12-hour food deprivation with preserved access to water. 10, 25, and 45 days after the administration of the diabetogenic substance, 24 alloxan-diabetic rats, as well as 30 control (intact) animals, were loading with water in a volume of 5% of body weight, urine was collected for 2 hours, euthanasia was performed by decapitation under light ether anesthesia. In blood samples, the level of glucose and creatinine was determined, in urine samples, after the assessment of water-induced 2-hour diuresis (in ml/100 g of body weight in 2 hours), the concentration of creatinine was determined, the clearance of endogenous creatinine, the clearance of osmotically free water, as well as relative (tubular) reabsorption of water were calculated, the content of glucose, urea, its excretion were determined, including standardized by 100  $\mu$ l of glomerular filtrate, as well as urine osmolality.

The results of the study allow the statement that as the duration of experimental diabetes mellitus increases, the pathogenetic significance of hyperfiltration, which determines the speed of fluid movement along the tubule and the intensity of its absorption, weakens in relation to the processes of osmotic concentration of urine, yielding to other factors, such as the osmolality of the renal medulla, as well as the presence of substances in the fluid of the distal segment and collecting tubes, whose reabsorption can change their concentration in the collecting tubes as urine moves. In diabetes, in addition to glucose, such substances include urea. Attempts to analyze the renal excretion of urea revealed that changes in its urinary concentration are definitely correlated with the dynamics of changes in urine osmolality. Moreover, it can be assumed that urea transport disorders in the diabetic kidney occur earlier than the ability to excrete osmotically active substances in general. A combined investigation of the processes of renal transport of urea and urine osmolality can serve as an early verifier of tubulointerstitial damage. Nevertheless, to improve the reliability of the interpretation of the features of the osmotic urine concentration in diabetes, we consider it necessary to study the character of the renal transport of electrolytes (sodium, potassium, calcium, and ammonium).

**Key words:** experimental diabetes, alloxan, urine osmolality, urea, osmotic concentration of urine.

### INTRODUCTION

In modern nephrological and endocrinological literature, a lot of attention is paid to the pathogenesis, clinical manifestations and treatment of diabetic kidney disease – a complication of diabetes, which directly determines the prognosis and life expectancy of patients. In most studies, the main focus is on glomerular damage and the development of the pathogenetic mechanism of hyperfiltration and intraglomerular hypertension. At the same time, data from recent years indicate the role of tubular damage in the development of diabetic nephropathy [1]. The functional and hemodynamic consequences of such damage need to be studied and detailed, since the inability of the tubular apparatus of the kidneys to effectively

homeostasis the internal environment of the body, ensuring adequate removal of water, ions and osmotically active substances, will certainly have not only organ-specific, but also systemic consequences.

Therefore, **the purpose of our study** was to find out the peculiarities of the osmotic concentration of urine in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes mellitus (DM).

#### MATERIALS AND METHODS RESEARCH

The research was conducted on 54 sexually mature non-linear male white rats, weighing 0.18–0.20 kg, which were kept under identical standard vivarium conditions. The influence of different duration hyperglycemia on the processes of osmotic concentration of urine was studied under the conditions of experimental diabetes mellitus (EDM), which was simulated by intraperitoneal administration of alloxan solution (Alloxan monohydrate, «Acros Organics», Belgium) at a dose of 160 mg/kg of body weight after the preceding 12-hour food deprivation with preserved access to water. 10, 25, and 45 days after the administration of the diabetogenic substance, 24 alloxan-diabetic rats (8 animals in each subgroup), as well as 30 control (intact) animals (10 each at each stage of the experiment), were loaded with water in a volume of 5% of body weight, urine was collected for 2 hours, euthanasia was performed by decapitation under light ether anesthesia.

The level of glucose in blood plasma samples was determined using a One Touch Ultra portable glucometer (LifeScan, USA) with further consideration of findings from rats with permanent hyperglycemia exceeding 7,0 mmol/L. The glucose content in urine samples was determined by a colorimetric enzymatic method using a standard diagnostic kit of Liquick Cor-GLUCOSE reagents (Poland).

Further analysis of urine samples, as well as blood plasma, enabled the evaluation of kidney functional state by the clearance method [2, 3]. After the assessment of water induced 2-hour diuresis (in ml/100 g of body weight per 2 hours), the concentration of creatinine in the urine (in the reaction with picric acid in urine according to the Folin's method) and in blood plasma (according to the Merson's method) was determined [3], endogenous creatinine clearance [2, 3], clearance of osmotically free water, as well as relative (tubular) reabsorption of water [4] were calculated.

The level of urea in urine samples was determined by the photometric method using standard diagnostic kits of Liquick reagents Cor-UREA (Poland) with registration of results at a wavelength of 340 nm. The rate of urea excretion was correlated with a unit of functioning nephron (absolute values were calculated per 100  $\mu$ l of glomerular filtrate (GF)) [4]. Urine osmolality was determined using an Osmomat 030 osmometer (GONOTEC GmbH, Germany) according to the standard method.

Statistical processing of the obtained data was carried out with the establishment of mean value and standard errors. The non-parametric Mann-Whitney rank test (for samples with a non-normal distribution of values) and paired Student's t-test (for comparing quantitative indices with a normal distribution) were used to assess the probability of a difference between the studied groups [5].

The research was carried out in compliance with the provisions of the EU Directive No. 609 (1986) and the Order of the Ministry of Health of Ukraine No. 690 of 09/23/2009 «On Measures for Further Improvement of the Organizational Standards of the Use of Experimental Animals».

#### RESULTS AND DISCUSSIONS

As we noted earlier [6], the increase in the clearance of endogenous creatinine as the duration of EDM was extended was accompanied by an increase in the hyperosmolality of urine (Fig. 1) and a persistent tendency to decrease the level of glycosuria (Fig. 2) disproportionately to the glycemic indicators during the corresponding periods of the experiment (Fig. 3).

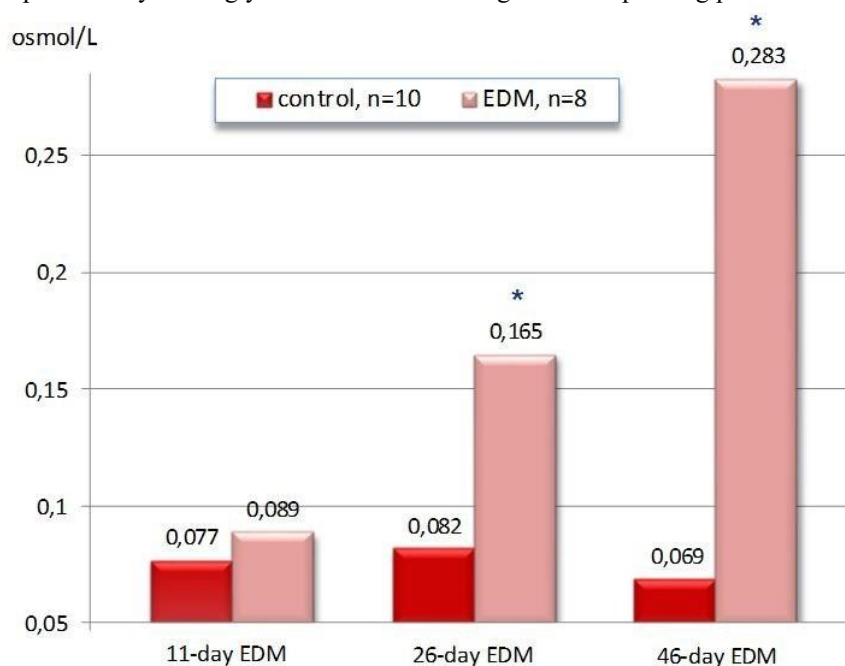
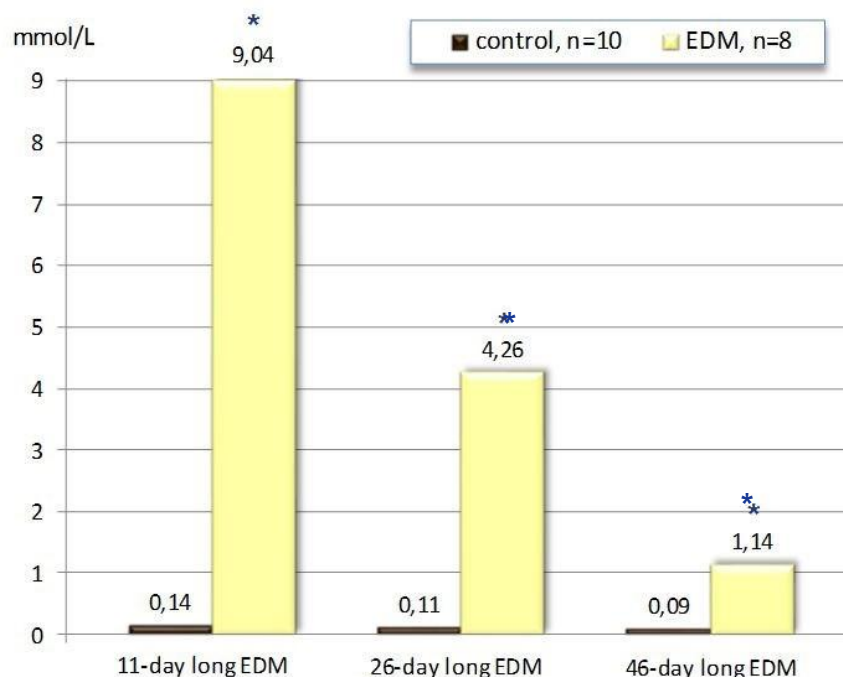


Fig. 1. Urine osmolality of rats in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes

\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the Student's paired criterion.

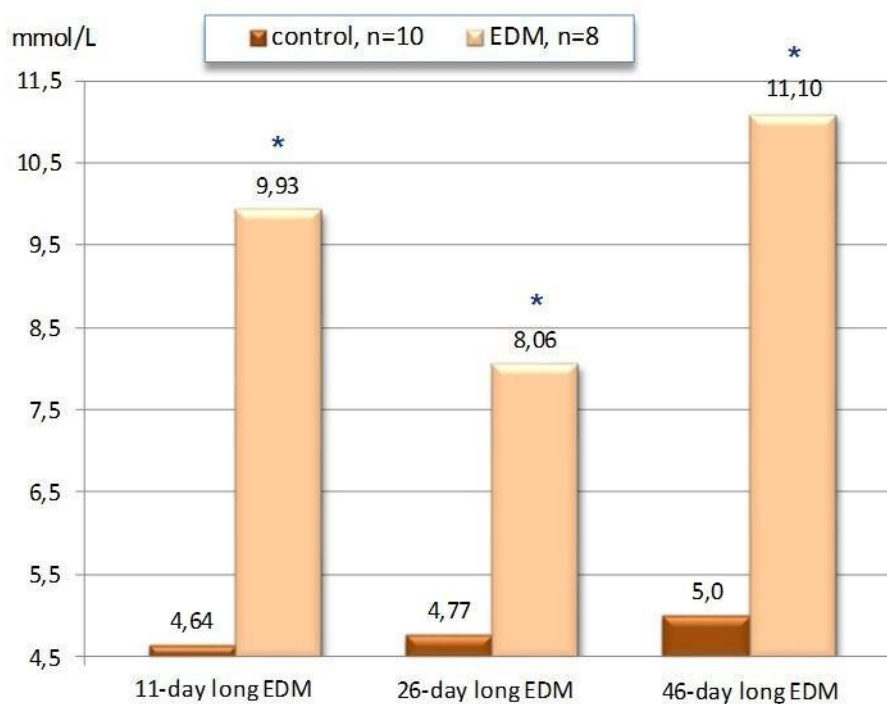
Thus, on the 11th day of the experiment, the excretion of glucose with urine increased significantly, probably not only due to its suprathreshold content in the blood, but also due to a significant limitation of its reabsorption, which may be associated with the functional inability of the proximal tubules to adequately absorb glucose through the effect of overloading the system of its transporter proteins [6, 7].



**Fig. 2. Glucose concentration in the urine of rats in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes**

\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

The presence of a significant amount of osmotically active glucose in the lumen of the proximal tubules can prevent the obligatory reabsorption of water in the descending part of Henle’s loop – the relative reabsorption of water during the 11-day EDM non-reliably increases by only 1.2% (Fig. 4).



**Fig. 3. Glucose concentration in the blood of rats in the dynamics of the development of alloxan-induced experimental diabetes**

\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

Therefore, the osmolarity of the fluid in the proximal tubules exceeds the osmolarity of the interstitium of the outer renal medulla, restraining the movement of water along the osmotic gradient and preventing the primary concentration of urine by the renal recirculation system [8]. Equilibration of the osmolar concentration of the interstitium of renal medulla, which is known to increase in the direction from the cortical zone to the papilla of the kidneys [9], probably also does not occur, which potentiates blood hyperosmosis in the early stages of the development of EDM. The latter, in turn, provokes an ADH-dependent reaction of the distal parts of the nephron.

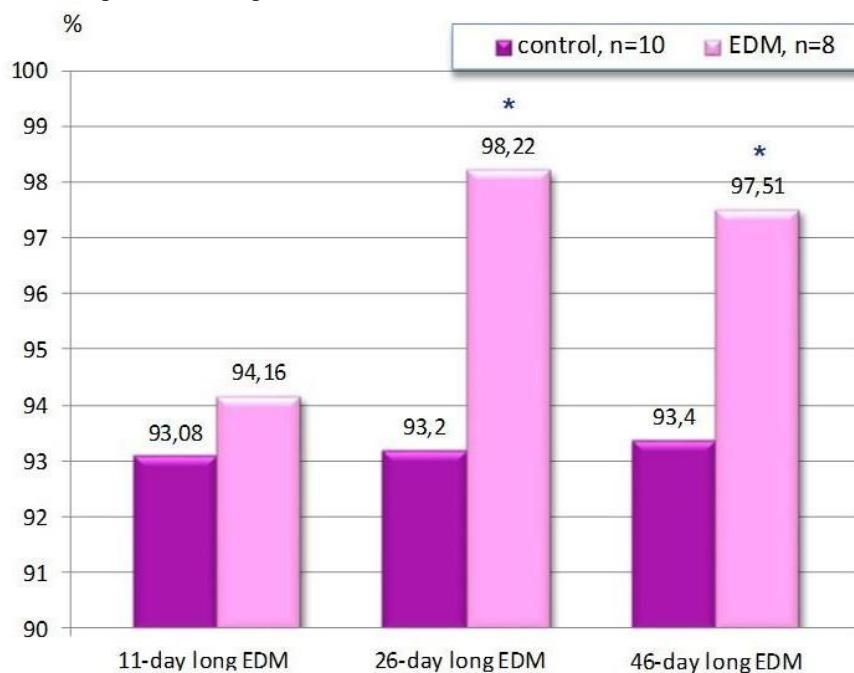


Fig. 4. **Relative water reabsorption in rats with alloxan-induced experimental diabetes of different durations**

\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

Osmotic diuresis under the conditions of vasopressin secretion should be accompanied by intensification of reverse absorption of osmotically free water [10], however, as our studies have shown, the clearance of osmotically free water in 11-day long EDM reliably increases by 13.4% (Fig. 5).

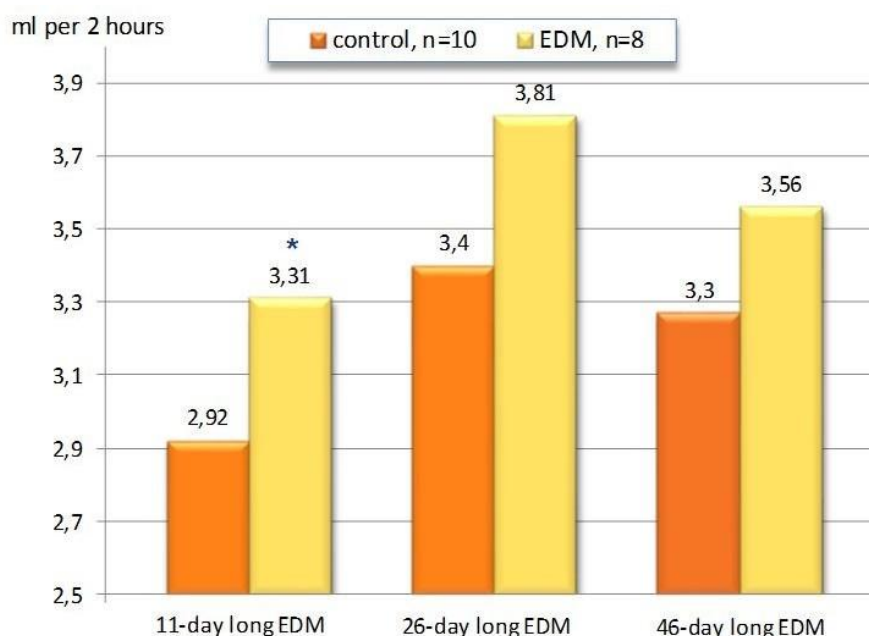


Fig. 5. **Clearance of osmotically free water in rats with alloxan-induced experimental diabetes of different durations**

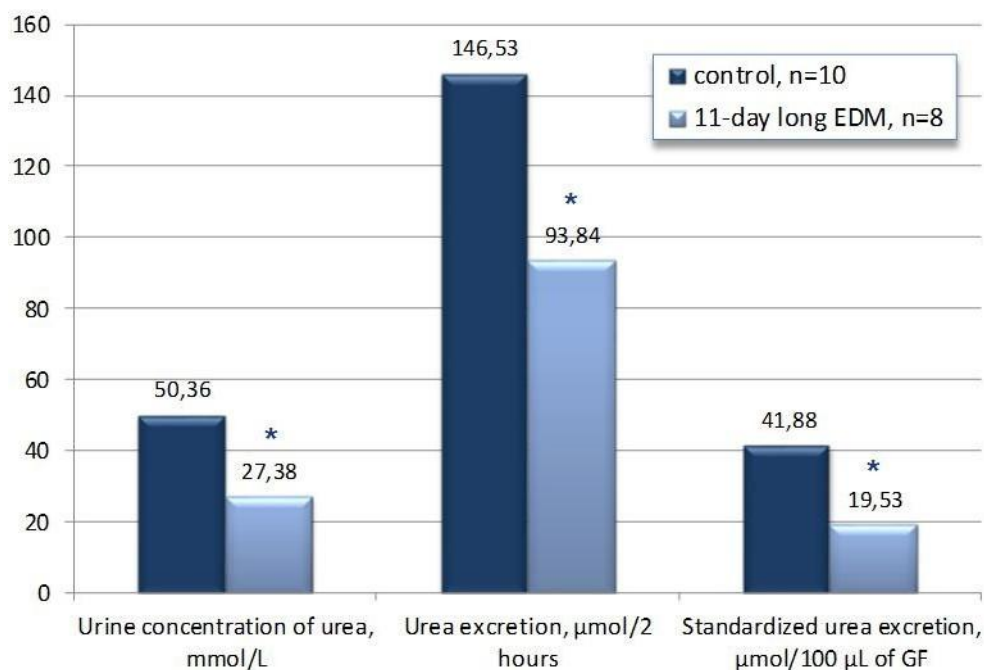
\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

Bearing in mind that our studies were conducted under conditions of water-induced diuresis, which is characterized by a decrease in the reabsorption of osmotically free water in the collecting tubes [10], one should not ignore the fact that the latter depends not only on the vasopressin-regulated permeability of the tubular wall to water, but also on a number of factors.

Among them there are the speed of fluid movement along the tubule and the corresponding intensity of its absorption, the osmolality of the renal medulla, which determines the size of the osmotic gradient between the interstitium of the renal medulla and the lumen of the collecting tubules, as well as the presence of substances in the fluid of the distal segment and collecting tubules, the reabsorption of which can change their concentration in the collection tubes as the urine progresses [10].

Analyzing the possibility of the influence of the above factors on the processes of osmotic concentration of urine under the conditions of experimental alloxan-induced hyperglycemia, one should start with the importance of hyperfiltration in the genesis of osmoregulation disorders in diabetes. As it was shown by our studies [6], the intensification of urination in the dynamics of the development of EDM is accompanied by an increase in the osmolality of urine along with an increase in the clearance of osmotically free water. And if in 11-day EDM hyperfiltration itself can be considered responsible for the limited intensity of glucose absorption during movement through the tubules, then the gradual decline of glucose content in the urine of rats with developing EDM, despite the limitation of its relative reabsorption [6], suggests the idea of a determining role of other factors in the osmotic concentration of urine, such as tubulointerstitial disorders due to the redistribution of other osmotically active substances between the ultrafiltrate and the interstitium of renal medulla. Since it is known that the most active osmolates of Henle's loop are sodium and urea, and only urea – in the collecting tube [9], we analyzed the changes in the excretion of the latter by the diabetic kidney.

The urinary concentration of urea in 11-day long EDM significantly decreased (by 1.8 times) as compared to the rate of intact animals, whereas its excretion was 1.6 times lower, including standardized by the volume of GF – 2.1 times – than the corresponding control indices (Fig. 6). Such results, on one hand, allow to state the preserved reabsorption of urea in the proximal convoluted tubule, on the other hand, they are not consistent with the assumption regarding the participation of urea in the formation of the concentration gradient in the kidney interstitium, since the reabsorption of water from the collecting tubules in 11-day long EDM decreases, and its clearance – raises significantly. Thus, summing up, hyperhydration due to the induction of water diuresis limits the endogenous production of ADH and proves the predominance of water diuresis over osmotic diuresis on the 11th day of the experiment.



**Fig. 6. Urinary excretion of urea in rats with 11-day alloxan-induced experimental diabetes**  
 \* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

Analyzing the features of the osmotic concentration of urine in 26-day long alloxan-induced EDM, we found slightly different regularities. Against the background of the maximal level of hyperfiltration at all the investigated periods of the experiment, hyperglycemia was accompanied by a reliable limitation of the relative reabsorption of glucose by the proximal tubules and, accordingly, significant glucosuria, although less intensive as compared to the 11-day long EDM. The fact of a significant elevation of the relative water reabsorption in 26-day long alloxan-induced hyperglycemia is noteworthy, creating the prerequisites for the assumption of an increase in the osmotic concentration of the interstitium of renal medulla. At the same time, the concentration of urea in the urine of animals with 26-day long EDM demonstrated an upward trend and was 21.0% higher than the corresponding index in the group of intact animals (Fig. 7). Its excretion raised by 37.4%, however, calculated per unit volume of GF, it was 3.2 times lower than the rate of intact animals, indicating a probable violation of urea reabsorption in the proximal convoluted tubule. Therefore, it is the excretory fraction of urea that probably determines the increase in the osmolality of the urine of rats of this experimental group to a greater extent than the glucose content in it.



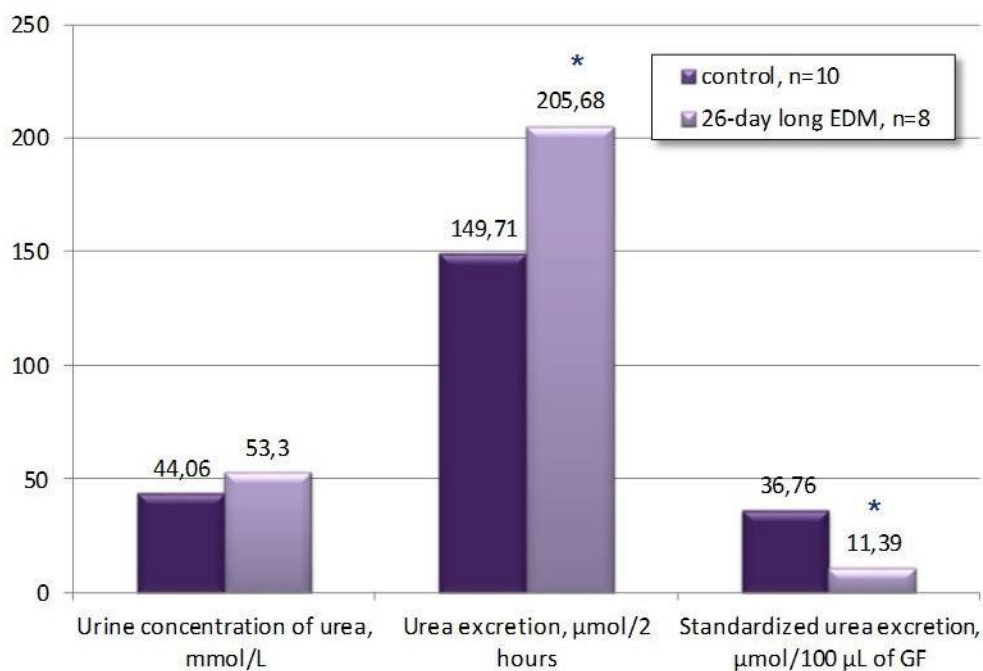


Fig. 7. **Urinary excretion of urea in rats with 26-day alloxan-induced experimental diabetes**  
 \* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

It can be assumed that urea transport disorders in the diabetic kidney occur earlier than the ability to excrete osmotically active substances in general. At the same time, the higher level of clearance of osmotically free water in rats with 26-day EDM indicates a limitation of vasopressin effect on the permeability of the medullary parts of the collecting tubules, relatively small concentrations of urea in the interstitium of the inner medulla, and possibly significant tubulointerstitial disorders.

These trends persisted on the 46th day after the administration of the diabetogenic substance. Despite the highest level of glycemia for all periods of the experiment, the concentration of glucose in the urine was the lowest in comparison with the indices in 11- and 26-day long EDM, although the relative reabsorption of glucose was markedly reduced. A significant elevation of the relative tubular water reabsorption (by 4.4%) testifies to an increase in the osmolar concentration of renal medulla and the formation of an osmotic gradient for the movement of water to the peritubular space.

The intensification of urea excretion in animals with 46-day long alloxan diabetes should be noted: urinary concentration of urea increased by 61.0% and its excretion by – 75.7% in comparison with the controls (Fig. 8). However, standardization of the excretory fraction of urea by the volume of GF revealed its reliable decline by 38.4%. The augmentation of the excretory fraction of urea against the background of hyperfiltration prevents its reabsorption from the collecting duct to the interstitium and probably contributes to a fairly high clearance of osmotically free water. Despite this, on the 46th day of the experiment, the maximal level of urine osmolality was established, which may be indicative of a limitation in the sensitivity of the collecting tubes to the action of vasopressin and may serve the signs of kidney damage and serious violations of the tubulointerstitial compartment [6].

Thereby, the level of glycemia, the intensity of glucose reabsorption determine the very possibility of osmotic diuresis, but the subsequent reaction of the distal segment of the nephron to these changes depends on the degree of tubulopathy and tubulointerstitial disorders in a diabetic kidney. Disturbance of osmoregulation in diabetic nephropathy requires a clear distinction between the concepts of violation of the osmotic concentration of urine by the kidney and the development of cellular resistance to vasopressin, which is reported by some authors [11]. The data we obtained indicate a positive correlation between the rate of urination and the reabsorption of osmotically free water [6]. As the duration of the experiment increases, the influence of hyperfiltration on the processes of osmoregulation weakens, as well as the osmolality of urine in the dynamics of EDM. There is an assumption that the defect in osmotic concentration is not as much related to the reaction of cells on vasopressin as to the difficulty of implementation of its effect in the kidney due to structural changes of the tubulointerstitial compartment, in particular. It is believed that in diabetes it is hyperglycemia that is responsible for hyperosmosis, which regulates the secretion of vasopressin and the intensity of reabsorption of osmotically free water, processes of osmotic concentration of urine. At the same time, chronic kidney disease can be accompanied by hyperosmia due to the accumulation of urea in the blood plasma, which also induces the reaction of osmoreceptors and the osmoregulation system. Moreover, it is known that osmoreceptor cells, which regulate the release of ADH into the bloodstream, are more sensitive to the concentration of urea than to glucose [11]. A possible conflict of osmoregulation systems arises due to the necessity to respond simultaneously to blood osmolality and its volume. The search for a «compromise» between osmoregulation systems is probably not limited by reabsorption of osmotically free water under conditions of hypervolemia or transtubular redistribution of fluid. In our opinion, a comprehensive interpretation of osmoregulation features and the kidneys' ability to concentrate urine in diabetic nephropathy requires an assessment of the transcellular transport of cations, in particular,

sodium, potassium, calcium, and ammonium, and determination of their role in the processes of osmoregulation and volumeregulation.

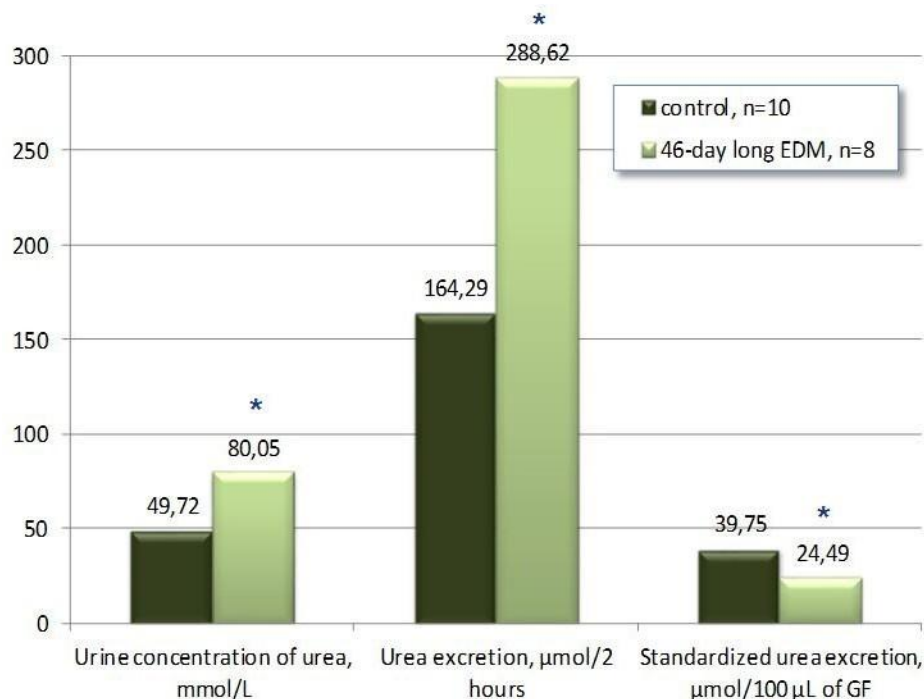


Fig. 8. **Urinary excretion of urea in rats with 46-day alloxan-induced experimental diabetes**  
\* – significant difference in comparison with control group  $p < 0.05$ ; assessment of intergroup differences was carried out using the non-parametric Mann-Whitney criterion.

**Conclusion.** The obtained data is indicative of a very complex genesis of violations of the mechanisms of osmotic concentration of urine against the background of experimental alloxan-induced diabetes. Many components of this process require further study. Interpretation of the data is complicated by the combination of hyperfiltration under the conditions of water-induced diuresis with elements of osmotic diuresis, typical for diabetes and associated with hyperglycemia and glycosuria. At the same time, the analysis of the obtained data allows the statement that as the duration of experimental diabetes mellitus increases, the pathogenetic significance of hyperfiltration, which determines the speed of fluid movement along the tubule and the intensity of its absorption, weakens in relation to the processes of osmotic concentration of urine, yielding to other factors, such as the osmolality of the renal medulla, as well as the presence of substances in the fluid of the distal segment and collecting tubes, whose reabsorption can change their concentration in the collecting tubes as urine moves. In diabetes, in addition to glucose, such substances include urea. Attempts to analyze the renal excretion of urea revealed that changes in its urinary concentration are definitely correlated with the dynamics of changes in urine osmolality. Moreover, it can be assumed that urea transport disorders in the diabetic kidney occur earlier than the ability to excrete osmotically active substances in general. A combined investigation of the processes of renal transport of urea and urine osmolality can serve as an early verifier of tubulointerstitial damage. Nevertheless, to improve the reliability of the interpretation of the features of the osmotic urine concentration in diabetes, we consider it necessary to study the character of the renal transport of electrolytes (sodium, potassium, calcium, and ammonium).

## References

1. Khakimova DM, Maksudova AN, Salikhov IG. Renal functional reserve and tubular function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes mellitus*. 2011; 2:82-5. (in Russian).
2. Modern methods of experimental and clinical studies of the central research laboratory of the Bukovinian State Medical Academy. Chernivtsi: Medical Academy, 2001. 42p. (in Ukrainian).
3. Berkhin EB, Ivanov YI. Methods of experimental studies of kidneys and water-salt metabolism. Barnaul, 1972. 199 p. (in Russian).
4. Schuck Oh. Examination of kidney function. Prague: Avicenum, 1981. 344 p. (in Russian).
5. Rebrova OYu. Statistics analysis of medical data. Application of the STATISTICS software package. Moscow : MediaSfera; 2002. 312 p. (in Russian).
6. Olenovych OA, Gozhenko AI, Nikitenko OP. Peculiarities of osmoregulatory function of kidneys in the dynamics of experimental diabetes mellitus development. *Herald of marine medicine*. 2020; 4(89):102-11. doi: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4430780>.
7. Savin IA, Goryachev AS. Water-electrolyte disturbances in neuroresuscitation. Second edition, Moscow, 2016. 332 p. (in Russian).
8. Natochin YuV, Kutina AV. Novel approach to integrative renal functional characteristics in various types of diuresis. *Nephrology* 2009; 13(3):19-23. (in Russian).

9. Natchin YuV. Fundamentals of Kidney Physiology. L.: Meditsina, 1982. 208 p. [in Russian].
10. Bogolepova AE, Natchin YuV. Physiological analysis of kidney functions in different types of diuresis. Nephrology 2005; 9(2):9-15. (in Russian).
11. Natchin YuV. Clearance of solute free and sodium free water: clinical significance. Nephrology 2012; 16(2):9-15. (in Russian).

УДК 616.379-008.64-092.9:612.466.21

## ОСМОТИЧНЕ КОНЦЕНТРУВАННЯ СЕЧІ В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ АЛОКСАН-ІНДУКОВАНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

**Оленович Ольга**

Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

**Zukow Walery**

Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland

**Резюме.** З метою з'ясування особливостей осмотичного концентрування сечі в динаміці розвитку алоксан-індукованого експериментального цукрового діабету (ЕЦД), проведені дослідження на 54 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів, у яких ЕЦД моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення 10-м тваринам розчину алоксану (Alloxan monohydrate, «Acros Organics», Бельгія) в дозі 160 мг/кг маси тіла після попередньої 12-годинної депривації їжі при збереженому доступі до води. Через 10, 25 та 45 діб після уведення діабетогенної речовини 24-м алоксан-діабетичним щурам, а також 30-ти контрольним (інтактним) тваринам, проводили навантаження водогінною водою в об'ємі 5% маси тіла, сечу збирали упродовж 2 годин, здійснювали евтаназію шляхом декапітації під легким ефірним знеболенням. У пробах крові визначали рівень глюкози та креатиніну, у пробах сечі, після оцінки водного індукованого 2-годинного діурезу (в мл/100 г маси тіла за 2 години), визначали концентрацію креатиніну, розраховували кліренс ендogenous креатиніну, кліренс осмотично вільної води, а також відносної (тубулярної) реабсорбції води, визначали вміст глюкози, сечовини, її екскрецію, в т.ч. у перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату, а також осмолярність сечі.

Результати дослідження дозволяють констатувати, що по мірі подовження термінів експериментального цукрового діабету патогенетична значущість гіперфільтрації, що визначає швидкість руху рідини вздовж канальця й інтенсивність її всмоктування, слабшає щодо процесів осмотичного концентрування сечі, поступаючись іншим факторам, як-от осмолярність мозкової речовини нирок, а також наявність у рідині дистального сегмента і збиральних трубок речовин, реабсорбція котрих здатна змінювати їх концентрацію у збиральних трубках по мірі просування сечі. За цукрового діабету, окрім глюкози, до таких речовин належить сечовина. Спроби аналізу ниркової екскреції сечовини виявили те, що зміни її сечової концентрації, безумовно, співвідносяться з динамікою змін осмолярності сечі. Більше того, можна припустити, що порушення транспорту сечовини у діабетичній нирці виникають раніше, ніж здатність до екскреції осмотично активних речовин в цілому. Спільне дослідження процесів ниркового транспорту сечовини та осмолярності сечі може слугувати раннім верифікатором тубулоінтерстиційних пошкоджень. Тим не менш для збільшення надійності трактування особливостей осмотичного концентрування сечі за цукрового діабету вважаємо необхідним вивчення характеру ниркового транспорту електролітів (натрію, калію, кальцію та амонію).

**Ключові слова:** експериментальний цукровий діабет, алоксан, осмолярність сечі, сечовина, осмотичне концентрування сечі.

### ВСТУП

У сучасній нефрологічній та ендокринологічній літературі приділяється багато уваги патогенезу, клінічним проявам та лікуванню діабетичної хвороби нирок – ускладнення цукрового діабету, що безпосередньо визначає прогноз та тривалість життя хворих. У більшості досліджень основна увага зосереджена на гломерулярних ушкодженнях і розвитку патогенетичного механізму гіперфільтрації та внутрішньоклубочкової гіпертензії. Водночас, дані останніх років вказують на роль канальцевих пошкоджень у розвитку діабетичної нефропатії [1]. Функціонально-гемодинамічні наслідки таких пошкоджень потребують вивчення і деталізації, оскільки неспроможність канальцевого апарату нирок ефективно гомеостазувати внутрішнє середовище організму, забезпечуючи адекватне виведення води, іонів та осмотично активних речовин, безумовно, матиме не лише органоспецифічні, а й системні наслідки.

Відтак, **метою** нашого дослідження було з'ясувати особливості осмотичного концентрування сечі в динаміці розвитку алоксан-індукованого експериментального цукрового діабету (ЕЦД).

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на 54 статевозрілих нелінійних самцях білих щурів, масою 0,18–0,20 кг, яких утримували за ідентичних стандартних умов виварію. Вплив гіперглікемії різної тривалості на процеси осмотичного концентрування сечі вивчали за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД), котрий моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення 10-м тваринам розчину алоксану (Alloxan monohydrate, «Acros Organics», Бельгія) в дозі 160 мг/кг маси тіла після попередньої 12-годинної депривації їжі при збереженому доступі до води. Через 10, 25 та 45 діб після уведення діабетогенної речовини 24-м алоксан-діабетичним щурам (по 8 тварин у кожній підгрупі), а також 30-ти контрольним (інтактним) тваринам (по 10 у кожній на кожній стадії експерименту), проводили навантаження водогінною водою в об'ємі 5% маси тіла, сечу збирали упродовж 2 годин, здійснювали евтаназію шляхом декапітації під легким ефірним знеболенням.

У пробах крові визначали рівень глюкози за допомогою портативного глюкометра One Touch Ultra (LifeScan, США) та враховували в подальшому лише показники щурів зі стійкою гіперглікемією, що сягала понад 7,0 ммоль/л. У пробах сечі визначали вміст глюкози колориметричним ензиматичним методом за допомогою стандартного діагностичного набору реактивів Liqueck Cor-GLUCOSE (Польща).

Подальший аналіз проб сечі та плазми крові дозволили оцінити діяльність судинно-клубочкового апарату нирок кліренс-методом [2, 3]. Після оцінки водного індукованого 2-годинного діурезу (в мл/100 г маси тіла за 2 години) визначали концентрацію креатиніну в сечі (в реакції з пікриновою кислотою за методикою Фоліна) та в плазмі крові (згідно методики Мерзон А.К.) [3], розраховували кліренс ендogenous креатиніну [2, 3], кліренс осмотично вільної води, а також відносної (тубулярної) реабсорбції води [4].

Рівень сечовини у пробах сечі визначали фотометричним методом за допомогою стандартних діагностичних наборів реактивів Liqueck Cor-UREA (Польща) з реєстрацією результатів на при довжині хвилі 340 нм. Показник екскреції сечовини співвідносили з одиницею діючого нефрону (абсолютні її величини перераховували на 100 мкл клубочкового фільтрату (КФ)) [4]. Осмолярність сечі визначали за допомогою осмометра Osmomat 030 (GONOTEC GmbH, Німеччина) за стандартною методикою.

Статистична обробка отриманих даних здійснювалась із визначенням середньої величини, стандартних відхилень. Для оцінки вірогідності різниці між досліджуваними групами застосовували непараметричний ранговий критерій Манна-Уїтні (для вибірок з розподілом величин, відмінним від нормального) та парний t-критерій Ст'юдента (для порівняння кількісних показників з нормальним розподілом) [5].

Дослідження проводилися із дотриманням положень Директиви ЄС №609 (1986) та наказу МОЗ України



### РЕЗУЛЬТАТИ Ї ОБГОВОРЕННЯ

Як зазначалося нами раніше [6], зростання кліренсу ендogenous креатиніну по мірі подовження термінів ЕЦД супроводжувалося наростанням гіперосмолярності сечі (рис.1) та стійкою тенденцією до зменшення рівня глюкозурії (рис.2) диспропорційно показникам глікемії у відповідні терміни експерименту (рис.3).

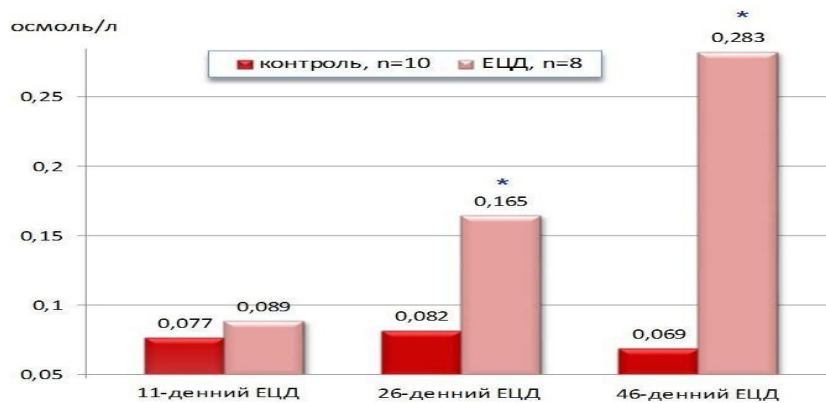


Рис. 1. Осмолярність сечі щурів в динаміці розвитку алоксан-індукованого експериментального діабету

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою парного критерію Стьюдента.

Так, на 11-й день експерименту екскреція глюкози з сечею істотно зростала, ймовірно, не лише через її надпороговий вміст у крові, а й через достовірне обмеження її реабсорбції, що може бути пов'язане з функціональною неспроможністю проксимальних каналців до адекватного всмоктування глюкози через ефект перевантаження системи її білків-транспортів [6, 7].

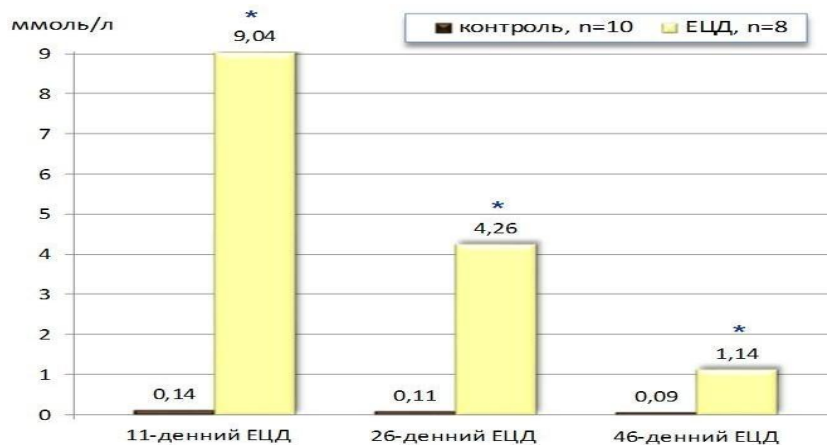


Рис. 2. Концентрація глюкози в сечі щурів у динаміці розвитку алоксан-індукованого експериментального діабету

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Перебування значної кількості осмотично активної глюкози у просвіті проксимальних каналців здатне перешкоджати облігатній реабсорбції води у нисхідному відділі петлі Генле – відносна реабсорбція води за 11-денного ЕЦ Д недостовірно зростає лише на 1,2% (рис.4).

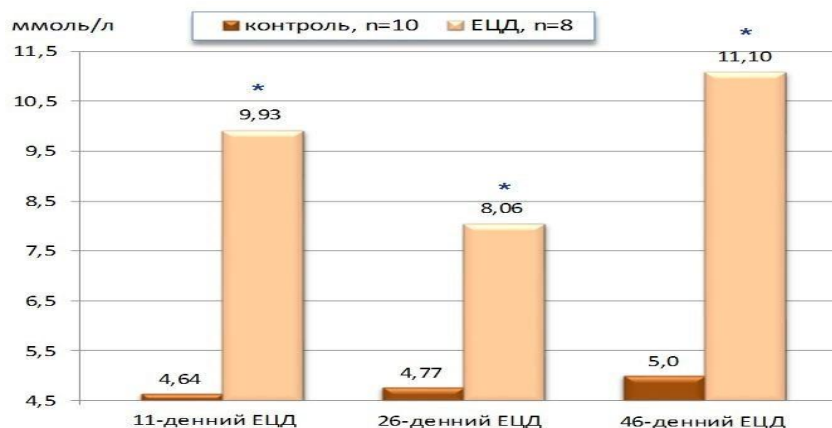


Рис. 3. Концентрація глюкози в крові щурів у динаміці розвитку алоксан-індукованого експериментального діабету

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Отже, осмолярна концентрація рідини проксимальних каналців перевищує осмолярність інтерстицію зовнішньої мозкової речовини нирки, стримуючи рух води за осмотичним градієнтом і запобігаючи первинному концентруванню сечі повороттно-множильною системою нирок [8]. Врівноваження осмолярної концентрації інтерстицію мозкового шару нирок, котра, як відомо, зростає у напрямку від кіркової зони до сосочка нирок [9], ймовірно, також не відбувається, що потенціє гіперосмію крові на ранніх етапах розвитку ЕЦД. Остання, в свою чергу, провокує АДГ-залежну реакцію дистальних відділів нефрону.



Рис. 4. Відносна реабсорбція води у щурів з алоксан-індукованим експериментальним діабетом різної тривалості

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

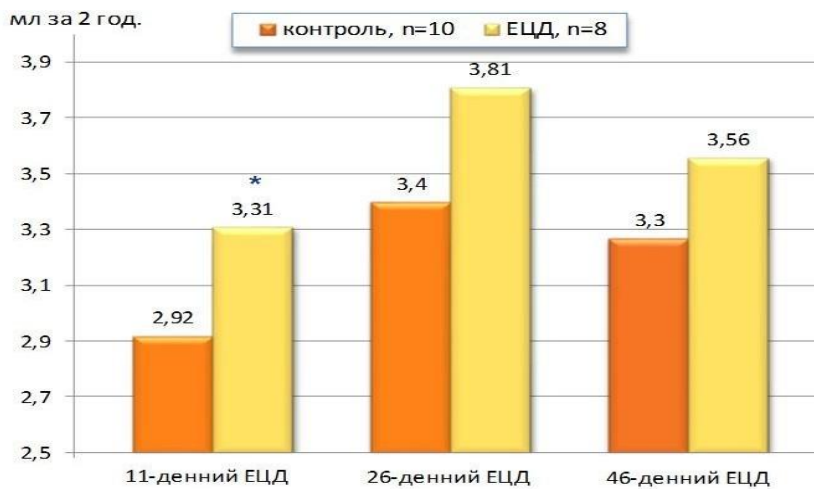


Рис. 5. Кліренс осмотично вільної води у щурів з алоксан-індукованим експериментальним діабетом різної тривалості

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Осмотичний діурез в умовах секреції вазопресину повинен би супроводжуватися інтенсифікацією зворотнього всмоктування осмотично вільної води [10], однак, як продемонстрували наші дослідження, кліренс осмотично вільної води за 11-денного ЕЦД достовірно зростає на 13,4% (рис.5).

Пам'ятаючи про те, що наші дослідження проводились за умов індукованого водного діурезу, якому властиве зниження реабсорбції осмотично вільної води у збиральних трубках [10], не слід залишати без уваги той факт, що остання залежить не лише від регульованої вазопресином проникливості каналцевої стінки для води, а ще й від низки факторів. Серед них – швидкість руху рідини вздовж каналця і відповідна інтенсивність її всмоктування, осмолярність мозкової речовини нирок, котра визначає величину осмотичного градієнта між інтерстицієм мозкової речовини нирок та просвітом збиральних трубок, а також наявність у рідині дистального сегмента і збиральних трубок речовин, реабсорбція котрих здатна змінювати їх концентрацію у збиральних трубках по мірі просування сечі [10].

Аналізуючи можливість впливу наведених факторів на процеси осмотичного концентрування сечі за умов експериментальної алоксан-індукованої гіперглікемії, слід розпочати зі значення гіперфільтрації у генезі розладів осморегуляції за ЦД. Як показали наші дослідження [6], інтенсифікація сечовиділення в динаміці розвитку ЕЦД супроводжується зростанням осмолярності сечі поряд зі зростанням кліренсу осмотично вільної води. Та якщо за 11- денного ЕЦД саме гіперфільтрацію можна вважати відповідальною за обмежену інтенсивність всмоктування глюкози під час руху каналцями, то поступове зменшення вмісту глюкози в сечі щурів по мірі прогресування ЕЦД, незважаючи на обмеження її відносно реабсорбції [6], нашою думкою про визначальну роль інших факторів осмотичного концентрування сечі, як-от тубулоінтерстиційні порушення через перерозподіл інших осмотично активних речовин між ультрафільтратом та інтерстицієм мозкової речовини нирок. Оскільки відомо, що найактивнішими осмолями петлі Генле є натрій та сечовина, а збиральної трубки – лише сечовина [9], ми проаналізували зміни виділення останньої діабетичною ниркою.

Сечова концентрація сечовини за 11-денного ЕЦД достовірно зменшувалася (у 1,8 раза) порівняно з показником інтактних тварин, причому її екскреція виявилася у 1,6 раза меншою, в т.ч. стандартизована за об'ємом КФ – у 2,1 раза – за відповідні показники контролю (рис.6). Такі результати, з одного боку, дозволяють констатувати збережену реабсорбцію сечовини у проксимальному звивистому каналці, з іншого – не узгоджуються з припущенням щодо участі сечовини у формуванні градієнта концентрації в інтерстиції нирок, оскільки реабсорбція води зі збиральних трубочок за 11-денного ЕЦД знижується, а її кліренс – достовірно зростає. Таким чином у підсумку – гіпергідратації внаслідок індукції водного діурезу обмежує ендогенну продукцію АДГ та засвідчує переважання водного діурезу над осмотичним на 11-й день експерименту.

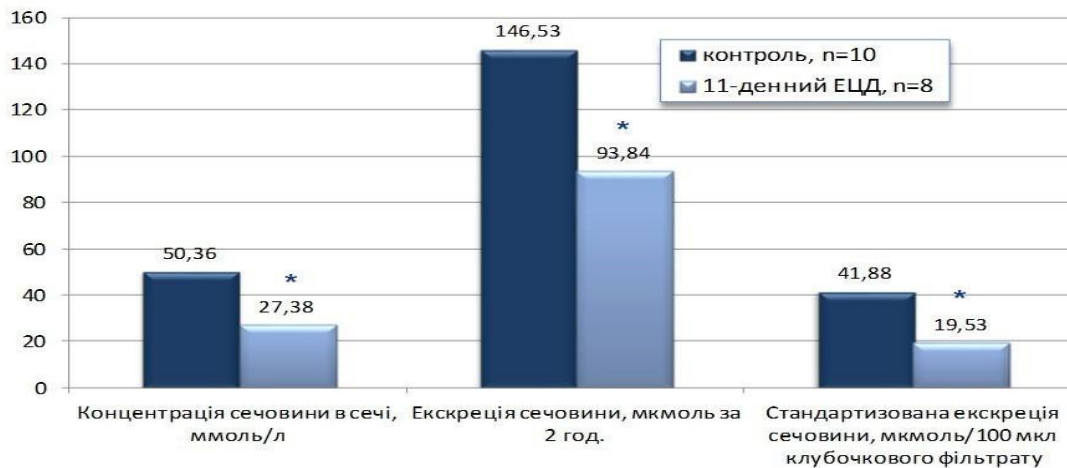


Рис. 6. Виділення сечовини з сечю у щурів з 11-денним алоксан-індукованим експериментальним діабетом

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Аналізуючи особливості осмотичного концентрування сечі за 26-денного алоксан-індукованого ЕЦД, нами виявлені дещо інші закономірності. На тлі максимального рівня гіперфільтрації за всі досліджені терміни експерименту, гіперглікемія супроводжувалася достовірним обмеженням відносно реабсорбції глюкози проксимальними канальцями і, відповідно, значною глюкозурією, хоча й менш інтенсивною у порівнянні з 11-денним ЕЦД. Звертає на себе факт істотного підвищення відносно реабсорбції води за 26-денної алоксан-індукованої гіперглікемії, що створює передумови для припущення про підвищення осмотичної концентрації інтерстицію мозкової речовини нирок. При цьому концентрація сечовини у сечі тварин з ЕЦД 26-денної тривалості виявила тенденцію до зростання і на 21,0% перевищувала відповідний показник у групі інтактних тварин (рис.7). Її екскреція зростала на 37,4%, однак, перерахована на одиницю об'єму КФ вона виявилася у 3,2 раза меншою за показник інтактних тварин, вказуючи на вірогідне порушення реабсорбції сечовини у проксимальному звивистому каналці. Відтак, саме екскреторна фракція сечовини, ймовірно, визначає зростання осмолярності сечі щурів цієї експериментальної групи більшою мірою, ніж вміст глюкози в ній. Можна припустити, що порушення транспорту сечовини у діабетичній нирці виникають раніше, ніж здатність до екскреції осмотично активних речовин в цілому. Водночас, навищий рівень кліренсу осмотично вільної води у щурів з 26-денним ЕЦД свідчить про обмеження впливу вазопресину на проникливість медулярних відділів збиральних трубок, відносно невеликі концентрації сечовини у інтерстиції внутрішньої мозкової речовини, та, можливо, істотні тубулоінтерстиційні порушення.

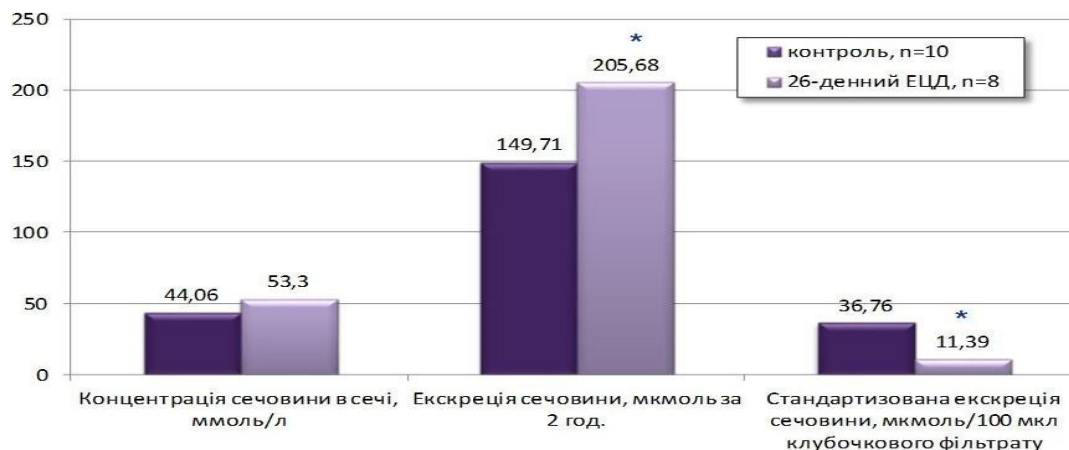


Рис. 7. Виділення сечовини з сечю у щурів з 26-денним алоксан-індукованим експериментальним діабетом

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Зазначені тенденції зберігалися і на 46-й день після введення діабетогенної речовини. Незважаючи на найвищий рівень глікемії за усі терміни експерименту, концентрація глюкози у сечі була найнижчою у порівнянні з показником 11-денного та 26-денного ЕЦД, хоча відносна реабсорбція глюкози достовірно зменшувалася. Достовірне зростання відносно тубулярної реабсорбції води (на 4,4%) засвідчує підвищення осмолярної концентрації мозкової речовини нирок і створення осмотичного градієнта для руху води до перитубулярного простору.

Слід відмітити інтенсифікацію виділення сечовини у тварин з 46-денним алоксановим діабетом: сечова концентрація сечовини збільшувалася на 61,0% відносно її рівня у інтактних щурів, а її екскреція – на 75,7% (рис.8). Проте, стандартизація екскреторної фракції сечовини за об'ємом КФ виявила достовірне її зменшення на 38,4%. Зростання екскреторної фракції сечовини на тлі гіперфільтрації запобігає її реабсорбції зі збиральної протоки до інтерстицію і, ймовірно, долучається до досить високого кліренсу осмотично вільної води. Та незважаючи на це, на 46-день експерименту встановлено максимальний рівень осмолярності сечі, що може вказувати на зменшення чутливості збиральних трубок до дії вазопресину та слугувати ознаками ушкодження нирок, серйозних порушень тубулоінтерстиційного компартменту [6].

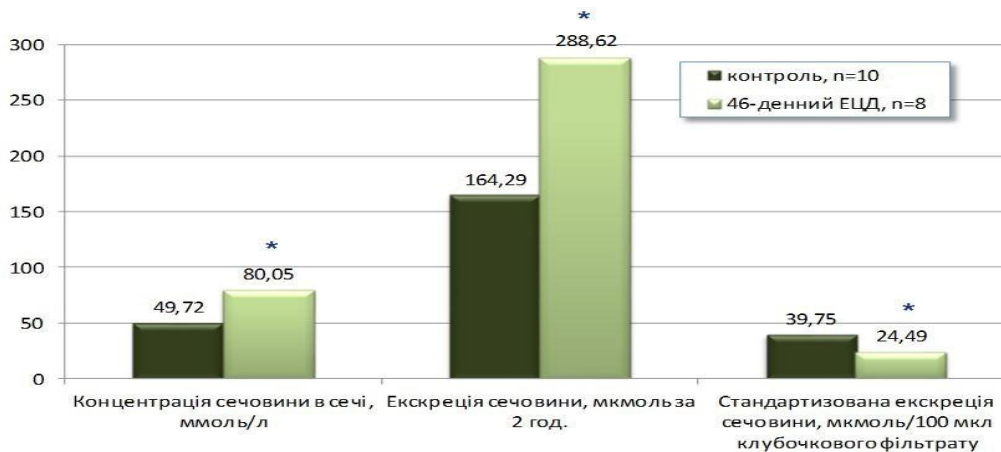


Рис. 8. Виділення сечовини з сечею у щурів з 46-денним алоксан-індукованим експериментальним діабетом

\* – вірогідність розбіжності показників відносно контролю  $p < 0,05$ ; оцінку міжгрупових відмінностей здійснювали за допомогою непараметричного критерію Мана-Уїтні.

Отже, рівень глікемії, швидкість реабсорбції глюкози зумовлюють саму можливість виникнення осмотичного діурезу, проте наступна реакція дистального сегмента нефрону на ці зміни залежить від ступеня тубулопатії та тубулоінтерстиціальних порушень на тлі діабетичної нирки. Порушення осморегуляції на тлі діабетичної ренопатії потребує чіткого розмежування понять порушення осмотичного концентрування сечі ниркою та розвитку клітинної резистентності до вазопресину, про яку повідомляють деякі автори [11]. Отримані нами дані вказують на позитивну кореляцію між швидкістю сечовиділення та реабсорбцією осмотично вільної води [6]. По мірі збільшення термінів експерименту вплив гіперфільтрації на процеси осморегуляції слабшає, як змінюється й осмолярність сечі у динаміці ЕЦД. Виникає припущення, що дефект осмотичного концентрування пов'язаний не стільки з реакцією клітин на вазопресин, скільки з утрудненням реалізації його ефекту в нирці через структурні зміни, зокрема, тубулоінтерстиційного компартменту. Вважають, що за ЦД саме гіперглікемія відповідальна за гіперосмію, котра регулює екскрецію вазопресину та інтенсивність реабсорбції осмотично вільної води, процеси осмотичного концентрування сечі. Разом з тим, хронічна хвороба нирок може супроводжуватися гіперосмією через накопичення в плазмі крові сечовини, що також індукує реакцію осморцепторів та системи осморегуляції. Більше того, відомо, що осморцепторні клітини, що регулюють вивільнення АДГ у кровоплин, більш чутливі до концентрації сечовини, ніж глюкози [11]. Можливий конфлікт систем осморегуляції виникає через необхідність реагувати одночасно на осмолярність крові та її об'єм. Пошук «компромісу» між системами осморегуляції, вірогідно, не обмежується лише реабсорбцією осмотично вільної води за умов гіперволемії чи транстубулярного перерозподілу рідини. Повноцінна інтерпретація особливостей осморегуляції та здатності нирок до концентрування сечі за діабетичної ренопатії, на нашу думку, потребує оцінки трансцелюлярного транспорту катіонів, зокрема, натрію, калію, кальцію та амонію, визначення їх ролі у процесах осмо- та волюморегуляції.

**Висновок.** Отримані дані свідчать про велими складний генез порушень механізмів осмотичного концентрування сечі на тлі експериментального алоксан-індукованого цукрового діабету. Багато складових цього процесу потребують подальшого вивчення. Інтерпретація даних ускладнюється сполученням гіперфільтрації за умов водного індукованого діурезу з елементами осмотичного діурезу, властивого цукровому діабету та пов'язаного з гіперглікемією та глікозурією. Разом з тим, аналіз отриманих даних дозволяє констатувати, що по мірі подовження термінів експериментального цукрового діабету патогенетична значущість гіперфільтрації, що визначає швидкість руху рідини вздовж каналця й інтенсивність її всмоктування, слабшає щодо процесів осмотичного концентрування сечі, поступаючись іншим факторам, як-от осмолярність мозкової речовини нирок, а також наявність у рідині дистального сегмента і збиральних трубок речовин, реабсорбція котрих здатна змінювати їх концентрацію у збиральних трубках по мірі просування сечі. За цукрового діабету, окрім глюкози, до таких речовин належить сечовина. Спроби аналізу ниркової екскреції сечовини виявили те, що зміни її сечової концентрації, безумовно, співвідносяться з динамікою змін осмолярності сечі. Більше того, можна припустити, що порушення транспорту сечовини у діабетичній нирці виникають раніше, ніж здатність до екскреції осмотично активних речовин в цілому. Спільне дослідження процесів ниркового транспорту сечовини та осмолярності сечі може слугувати раннім верифікатором тубулоінтерстиціальних пошкоджень. Тим не менш для збільшення надійності трактування особливостей осмотичного концентрування сечі за цукрового діабету вважаємо необхідним вивчення характеру ниркового транспорту електролітів (натрію, калію, кальцію та амонію).

#### Перелік використаної літератури:

1. Хакимова ДМ, Максудова АН, Салихов ИГ. Функциональный почечный резерв и канальцевые функции почек у больных сахарным диабетом 2 типа. Сахарный диабет. 2011; 2:82-5.
2. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії. – Навчально-методичний посібник. – Чернівці: Буковинська державна медична академія, 2001. – 42с.
3. Берхин Е.Б., Иванов Ю.И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. – Барнаул, 1972. – 200 с.
4. Шюк О. Функциональное исследование почек. – Прага: Авиценум, 1981. – 344с.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М., МедиаСфера, 2002. – 312с.
6. Оленович ОА, Гоженко АІ, Никитенко ОП. Особливості осморегулювальної функції нирок в динаміці розвитку експериментального цукрового діабету. Вісник морської медицини. 2020; 4(89):101-11. doi: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.4430780>.
7. Савин И.А., Горячев А.С. Водно-электролитные нарушения в нейрорениамии. Издание второе, Москва, 2016. – 332с.
8. Наточин ЮВ, Кутина АВ. Новый подход к интегративной функциональной характеристике почек при разных типах диуреза // Нефрология. 2009; 13(3):19-23.
9. Наточин ЮВ. Основы физиологии почки. Л.: Медицина, 1982. 208с.
10. Боголепова АЕ, Наточин ЮВ. Физиологический анализ функций почки при различных типах диуреза // Нефрология. 2005; 9(2):9-15.
11. Наточин ЮВ. Клиренс осмотически свободной и свободной от натрия воды: клиническое значение // Нефрология. 2012; 16(2): 9-15.