

Grytsuik M. I. Histoenzymic determination of activity of alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase in the renal tissue of rats at the early stage of formation of experimental diabetes mellitus. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017;7(7):776-786. eISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.843547>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/4701>

The journal has had 7 points in Ministry of Science and Higher Education parametric evaluation. Part B item 1223 (26.01.2017).
1223 Journal of Education, Health and Sport eISSN 2391-8306 7

© The Authors 2017;

This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/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: 01.07.2017. Revised: 02.07.2017. Accepted: 31.07.2017.

HISTOENZYMIC DETERMINATION OF ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE AND SUCCINATE DEHYDROGENASE IN THE RENAL TISSUE OF RATS AT THE EARLY STAGE OF FORMATION OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

M. I. Grytsuik

**Higher State Educational Establishment of Ukraine “Bukovinian State Medical
University”, Chernivtsy**

Abstract

The article presents data on the activity of some enzymes of rats' renal tissue in experimental diabetes mellitus in the early period of its formation. It was found that at 11 days of the experiment, the activity of enzymes alkaline phosphatase and succinate dehydrogenase, both in streptotrozine-induced diabetes mellitus and in the introduction of NADP, did not change much, suggesting that the registered changes are adaptive in their nature.

Key words: diabetes mellitus, streptosotocin, alkaline phosphatase, succinate dehydrogenase.

**ГИСТОФЕРМЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ
ФОСФАТАЗЫ И СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПОЧЕЧНОЙ ТКАНИ КРЫС
НА РАННЕМ ЭТАПЕ ФОРМИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
САХАРНОГО ДИАБЕТА**

М. И. Грицюк

**Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский
государственный медицинский университет»**

Резюме

В статье приведены данные касающиеся активности отдельных ферментов почечной ткани крыс при экспериментальном сахарном диабете на раннем этапе его формирования. Выявлено, что на 11 сутки эксперимента активность ферментов щелочной фосфатазы и сукцинатдегидрогеназы как при стрептозотоцин-индуцированном сахарном диабете, так и при введении НАДФ мало изменяется, что дает основания предполагать, что зарегистрированные изменения носят приспособительный характер.

Ключевые слова: сахарный диабет, стрептозотоцин, щелочная фосфатаза, сукцинатдегидрогеназа.

ГІСТОФЕРМЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛУЖНОЇ ФОСФАТАЗИ ТА СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ У НИРКОВІЙ ТКАНИНІ ЩУРІВ НА РАНЬОМУ ЕТАПІ ФОРМУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

М. І. Грицюк

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»

Резюме

У статті наведено дані щодо активності окремих ферментів ниркової тканини при експериментальному цукровому діабеті у ранньому терміні його формування. Виявлено, що на 11 добу експерименту активність ферментів лужної фосфатази та сукцинатдегідрогенази як при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті, так і при уведенні НАДФ мало змінюється, що дає підстави вважати, що зареєстровані зміни носять пристосувальний характер.

Ключові слова: цукровий діабет, стрептозотоцин, лужна фосфатаза, сукцинатдегідрогеназа.

Вступ. Цукровий діабет (ЦД) належить до однієї з найпоширеніших недуг сьогодення. Його ускладнення різноманітні та проявляються доволі рано, але порушення з боку нирок з формуванням таких специфічних пошкоджень як діабетична нефропатія (ДН) розвиваються пізніше за інші і є частим компонентом ЦД, особливо першого типу. До найпоширеніших ускладнень ЦД належать ретинопатія, ангіопатія, полінейропатія, діабетична стопа, діабетична енцефало- та нефропатії [5, 7, 8, 9, 12].

Прогресуючий розвиток ДН закономірно веде до формування хронічної хвороби нирок (ХХН) з переходом до хронічної ниркової недостатності (ХНН), що є важливою причиною втрати працездатності та летальності таких пацієнтів. Хоча вищезгадані ускладнення добре відомі, але все ж основні показники порушення діяльності нирок фіксуються в клініці на етапі розвинутих форм хвороби [6, 10, 11]. Мало відомо про початкові стадії порушення діяльності нирок. Проте, добре відомо, що згідно класичних уявлень патофізіології першою відповіддю на дію патогенного чинника є захисні або пристосувальні реакції організму, які пізніше призводять до подальшого

розвитку патології [14]. Однак, в клінічних умовах прослідкувати за початковими проявами ДН при ЦД немає можливості, тому актуальним є вивчення механізму розвитку ЦД та його ускладнень в експерименті.

Для вивчення функціонального стану клітин ниркової тканини часто використовують дослідження відповідних ферментів. І хоча перші згадки про присутність у сечі активних ферментів з'явилися понад 100 років тому, однак інтерес дослідників зріс за останні кілька десятиліть у зв'язку з накопиченням достатньо великої кількості експериментального матеріалу. На теперішній час у сечі виявлено близько 70 ферментів та ізоферментів, більшість з них ниркового походження [1, 13, 15].

Інтенсивність екскреції з сечею ферментів, які виробляються клітинами ниркового епітелію можна розглядати у якості функціональної характеристики цілісності мембранних структур і перш за все поверхневої плазматичної мембрани. Діагностичне значення активності ферментів у сечі визначають їх молекулярна маса, селективність їх реабсорбції у проксимальних канальцях та локалізація у структурах нефрону.

Найширше в клініці та експерименті застосовують біохімічні методи вивчення ферментів у біологічних рідинах організму, але застосовують також і гістохімічне дослідження ферментів у біологічних тканинах [1, 2].

Мета дослідження: визначення активності ферментів ЛФ та СДГ у криостатних зрізах тканини нирок дослідних тварин з модельованим цукровим діабетом для встановлення глибини пошкодження структурно-функціональних елементів нирок на 11 добу експерименту.

Матеріал та методи дослідження. Упродовж 1 місяця до початку та під час експерименту тварин утримували у віварії за умов сталої температури (20-210 С) і вологості повітря (52-55 %) в окремих клітках з вільним доступом до води та їжі, за умов природнього чергування світла та темряви із 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 поділяли на наступні групи. Перша (I) – контрольна група (n=7), яка перебувала на стандартному режимі годування, освітлення та утримання.

Дослідним групам тварин (II – n=8, III – n=9) одноразово внутрішньоочеревинно вводили стрептозотцин (Sigma, США) у дозі 70 мг/кг [3]. У другій групі тварин забій

та відповідні дослідження проводили через 11 діб після уведення стрептозотоцину. У третій дослідній групі дослідження проводили після забою на 11 добу при моделюванні стрептозотоцин-індукованого ЦД та уведенні щурам інтраперитонеально розчину нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату (НАДФ) у дозі 30 мг/кг маси тіла тварини на ізотонічному розчині хлориду натрію.

Для дослідження основних показників функцій нирок забий тварин проводили під легким ефірним знеболенням. Кріостатні зрізи нефіксованої тканини використовували для гістоферментного визначення методом азосполучення активності лужної фосфатази, визначення активності сукцинатдегідрогенази тетразолієвим методом за Z.Lojsda [4].

З метою об'єктивізації кількісних досліджень проводили комп'ютерну мікроденситометрію специфічно забарвлених об'єктів у гістоензимологічних препаратах. Для цього спочатку отримували цифрові копії оптичного зображення ділянок мікроскопічних препаратів за допомогою цифрового фотоапарата Olympus C-740UZ при використанні мікроскопа ЛЮМАМ - Р8. Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії (GPL-ліцензія) комп'ютерної програми GIMP – версія 2.0.4 (S.Kimball&P.Mattis). Зокрема, вимірювали оптичну щільність мікроскопічних об'єктів у одиницях оптичної щільності.

Результати та їх обговорення. Проводилось дослідження активності лужної фосфатази (ЛФ) методом азосполучення у цитоплазмі епітелію проксимальних каналців при експериментальному цукровому діабеті на початковому етапі його формування. ЛФ контролює процеси трансмембранного транспорту і, розміщуючись у плазматичній мембрані глибше за інші ферменти щиткової облямівки, може екскретуватися з сечею при більш виражених ушкодженнях каналців.

Лужна фосфатаза (ЛФ) – це маркерний фермент щиткової облямівки. Перші ознаки змін з боку її активності на 11 добу експериментального цукрового діабету майже не виявляються. Ми реєстрували $0,422 \pm 0,0019$ в.од.опт.густ. у контрольній групі тварин, $0,419 \pm 0,0018$ – у тварин на 11 добу моделювання цукрового діабету (таб.1), при чому при уведенні НАДФ показники практично не змінювалися.

Відсутність суттєвих змін активності вказаного ферменту має неабияке значення, адже, беручи до уваги об'єм транспорту натрію в проксимальному каналці дослідних тварин (а він зростав понад удвічі), а також величину реабсорбції білка, можемо стверджувати, що у цей період спостереження функціональні процеси в нирках

носять адаптивний характер і виражених пошкоджень щиткової облямівки каналців ще не спостерігається (рис.1).

Таблиця 1

Оптична густина забарвлення при визначенні активності лужної фосфатази методом азосполучення у цитоплазмі епітелію проксимальних каналців при експериментальному цукровому діабеті на 11 добу експерименту та з уведенням НАДФ ($X \pm s_x$)

Назва групи	Оптична густина забарвлення (в.од.опт.густ.)	Вірогідність розбіжності (P) з інтактними тваринами та в динаміці
Контрольна група (n=7)	0,422±0,0019	
1. Дослідна група (11 доба після уведення стрептозоцину) (n=8)	0,419±0,0018	P*>0,05
2. Дослідна група (тварини, яким уводили НАДФ) (n=9)	0,420±0,0019	P*>0,05 P**>0,05

Примітка. P* – вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин, P** - вірогідність розбіжності з групою на 11 добу без уведення НАДФ (за критерієм Mann-Whitney).

Що стосується сукцинатдегідрогенази (СДГ) – тут слід пам'ятати, що біологічна роль цього ферменту теж дуже велика, оскільки він каталізує одну з основних реакцій циклу трикарбонових кислот, в якій безпосереднім акцептором електронів від відновленої СДГ є Ко-Q10. Роботами О.Г. Гинецинського та Ю.В.Наточина показано, що СДГ є однією з складових частин системи, яка в аеробних умовах забезпечує трансмембранний перенос іонів Na^+ в нирках та інших осморегулювальних органах.

Визначення рівня СДГ у сечі здебільшого використовується для діагностики порушення енергетичного балансу тубулярного епітелію ниркових каналців. Встановлено, що в клітинах організму СДГ міститься лише у мітохондріях і локалізована у їхній внутрішній мембрані.

Ми вивчали оптичну густина забарвлення (у в.од.опт.густ.) при визначенні активності сукцинатдегідрогенази тетразолієвим методом у цитоплазмі епітелію звивистих каналців при експериментальному цукровому діабеті на 11 добу експерименту та з уведенням НАДФ (таб.2).

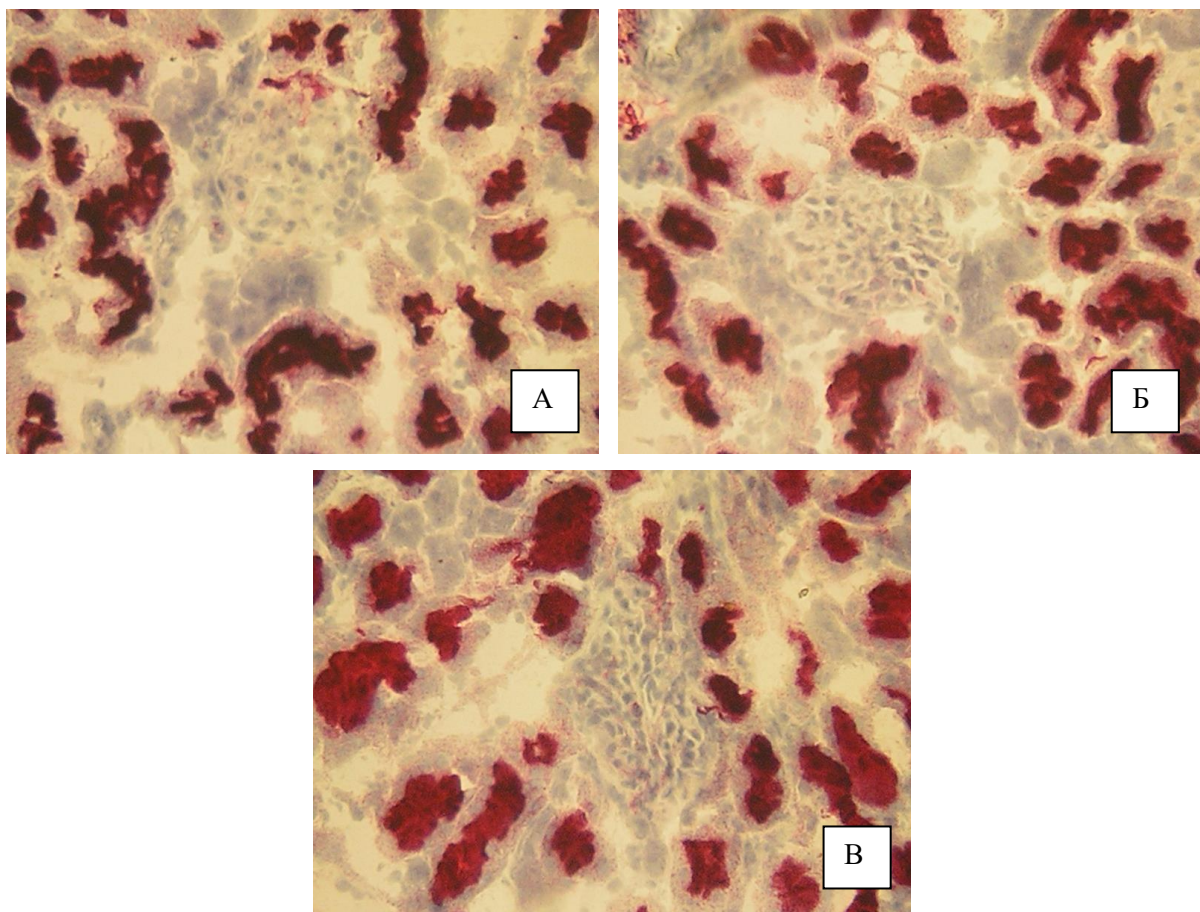


Рис. 1. Проксимальні каналці нирки та нирковий клубочок при експериментальному цукровому діабеті на 11 добу спостереження.

А) Інтактна тварина;

Б) Експериментальний цукровий діабет - 11 доба;

В) Експериментальний цукровий діабет (11 доба) після уведення НАДФ.

Гістохімічне визначення активності лужної фосфатази методом азосполучення. Дофарбовування гематоксиліном Грота. Об.40х. Ок.10х.

Хоча інсулінова недостатність є не постійною, а частково компенсованою, ефекти інсуліну спричинюють порушення обміну глюкози у клітинах інсулінозалежних органів, в першу чергу м'язової тканини, викликаючи порушення їх функціонування. В свою чергу нирки, перебуваючи у функціонально активованому стані, видаляють велику кількість цих продуктів.

У зв'язку з цим ми використали нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ), уведення якого блокує процеси ушкодження мітохондріального окиснення за рахунок блокади розпаду піридиннуклеотидів.

При дослідженні показника активності СДГ, то і тут суттєвих змін на 11 добу виявлено не було (таб.2). Отримані дані узгоджуються з тим, що зміни каналіцевих функцій також з'являються у більш пізні терміни спостереження. Окрім того, відомо, що СДГ має чітко виражений оптимум дії – між рН 7,0 та 8,0 од. А у випадку нашого дослідження, ми реєстрували зниження рН сечі до $6,25 \pm 0,10$ од.

Отримані дані щодо активності СДГ, як ферменту, який міститься і в клітинах проксимального, так і особливо дистального, відділу нефрону, де енергозатрати більші, корелюють з тим, що саме у цей термін в дистальному відділі нефрону дещо зменшується реабсорбція натрію (на 45,9%).

Таблиця 2.

Оптична густина забарвлення (у в.од.опт.густ.) при визначенні активності сукцинатдегідрогенази тетразолієвим методом у цитоплазмі епітелію звивистих каналців при експериментальному цукровому діабеті на 11 добу експерименту ($X \pm s_x$)

Назва групи	Оптична густина забарвлення (в.од.опт.густ.)	Вірогідність розбіжності (P) з інтактними тваринами та в динаміці
Контрольна група (n=7)	$0,244 \pm 0,0025$	
1. Дослідна група (11 доба після уведення стрептозотоцину) (n=8)	$0,239 \pm 0,0024$	$P^* > 0,05$
2. Дослідна група (тварини, яким вводили НАДФ) (n=9)	$0,243 \pm 0,0024$	$P^* > 0,05$ $P^{**} > 0,05$

Примітка. P^* – вірогідність розбіжності з групою інтактних тварин, P^{**} - вірогідність розбіжності з групою на 11 добу без уведення НАДФ (за критерієм Mann-Whitney).

За результатами проведених досліджень видно, що активність сукцинатдегідрогенази на 11 добу експерименту лише на 2,1% менше, ніж у контрольній групі тварин, а при уведенні НАДФ практично повертається до показників контролю (рис.2).

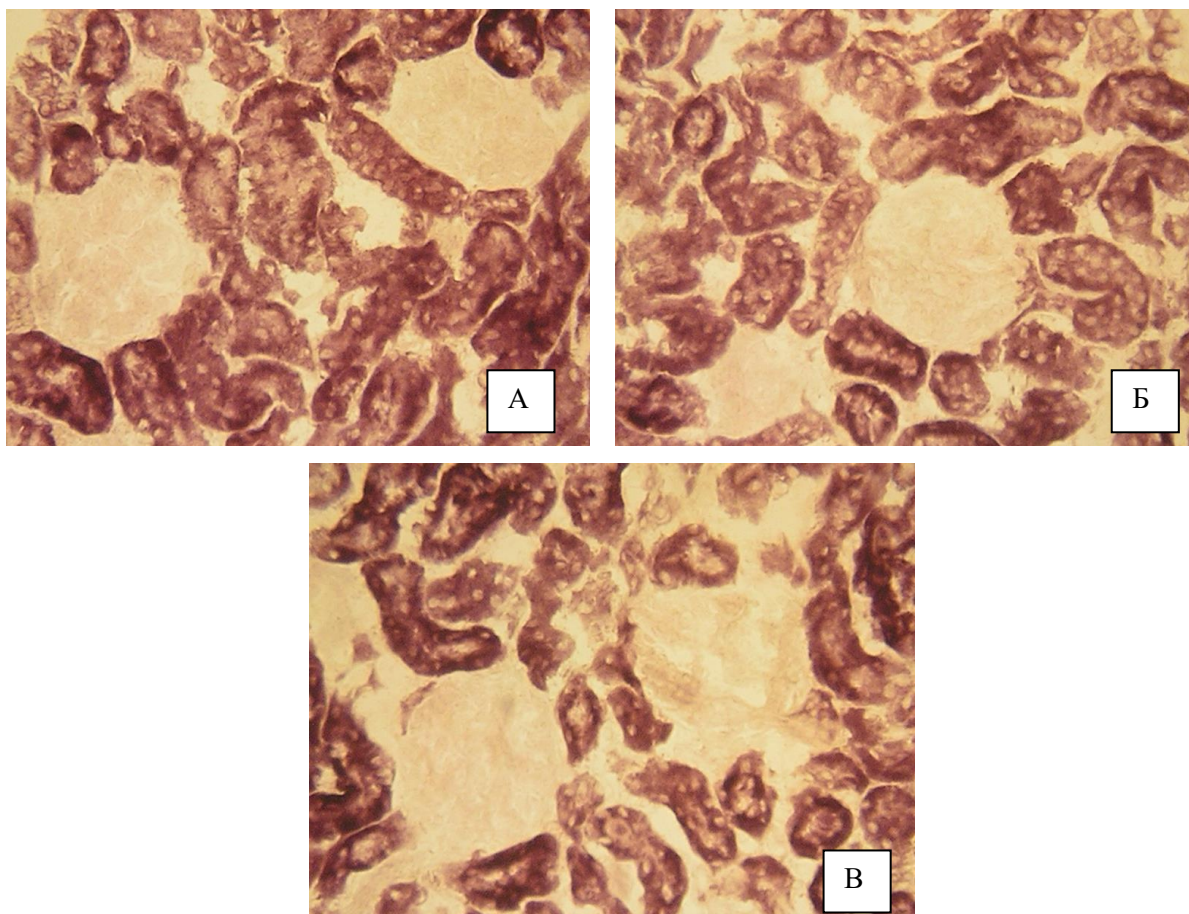


Рис.2. Звивисті каналці нирки та нирковий клубочок при експериментальному цукровому діабеті на 11 добу спостереження. Гістохімічне визначення активності сукцинатдегідрогенази тетразолієвим методом. Об.40х. Ок.10х.

- А) Інтактна тварина;
- Б) Експериментальний цукровий діабет - 11 доба;
- В) Експериментальний цукровий діабет (11 доба) після уведення НАДФ.

Висновок. Загальний висновок з отриманих результатів дослідів наступний – у цей період експериментального ЦД з’являються ознаки цього захворювання у тварин, але вони ще не супроводжуються суттєвим порушенням морфо-функціонального стану нирок. Беручи до уваги отримані дані можемо стверджувати, що зміни показників ниркових функцій у цей період спостереження ймовірно носять адаптивний транзиторний характер.

References

1. Afanas'ev S.A. Comparative study of changes in energy metabolism in rat cardiomyocytes in postinfarction cardiosclerosis and diabetes mellitus / S.A Afanas'ev, D.S. Kondrat'eva, M.V. Egorova, S.V. Popov // *Bull Exp Biol Med.* – 2013. – №156(V.2). – P. 185-187.
2. Gavaleshko V.P. Histological changes in kidneys at diabetes mellitus, complicated by partial global ischemia-reperfusion / V.P. Gavaleshko // *Clinical Anatomy and Operative Surgery* – 2012. – V.11, №3. – P. 62-65.
3. Galenova T.I. The modeling of experimental streptozotocin-induced II type diabetes in rats / T.I. Galenova, V.V. Konopelniuk, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko // *Physics of Alive.* – 2010. – V.18, №3. – P. 50-54.
4. Davydenko I.S. Histochemical peculiarities of oxidative modification of proteins in glomeruli cells at acute postinfectious glomerulonephritis / I.S. Davydenko, O.M. Davydenko // *Bukovinian Medical Journal.* – 2012. – V.16, №3 (63). – Part 2. – P. 106-108.
5. Loboda O.M. Mechanism of development and progression of diabetic nephropathy / O.M. Loboda, I.O. Dudar, V.V. Alekseeva // *Clinical Immunology. Allergology. Infectology.* – 2010. – №9-10 (38-39). – P. 46-50.
6. Maidannyk V.G. Molecular mechanisms of kidneys' damage at diabetes mellitus in children (review article) / V.G. Maidannyk, Ye.A. Burlaka // *Pediatrics, Obstetrics and Gynecology.* – 2010. – №3. – P. 34-47.
7. Rebrov B.A. Kidneys' damage at diabetes mellitus / B.A. Rebrov // *International Endocrinology Journal.* – 2011. – № 2(34). – P. 51-55.
8. Scrobonska N.A. Diabetic nephropathy: some untraditional factors of pathogenesis, main ways of diagnostics and treatment (review article and personal results) / N.A. Scrobonska, T.S. Tcymbal // *Family Medicine.* – 2011. – №4. – P. 18-22.
9. Bodnar I.A. Role of glomeruli cells dysfunction in the development of diabetic nephropathy / I.A. Bodnar, V.V. Klymontov // *Problems of Endocrinology.* – 2006. – V.52, №4. – P. 45-49.
10. Hutorska L.A. Prevalence, absolute and relative risk of the development of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus / L.A. Hutorska // *Bukovinian Medical Journal.* – 2012. – V.16, №4(64). – P. 170-174.
11. Shularenko L.V. Chronical diabetic renal disease: modern view on the problem / L.V. Shularenko // *Endocrinology.* – 2013. – Vol. 18, No 1. – P. 73-82.

12. The Attenuation of Moutan Cortex on Oxidative Stress for Renal Injury in AGEs-Induced Mesangial Cell Dysfunction and Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats / Mingua Zhang, Liang Feng, JunfeiGu [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – Vol.18.– P. 1-13.
13. Dranovalli S. The Pathogenesis of Diabetic Nephropathy / S. Dranovalli, I. Duka, G.L. Bakris // *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* – 2008. – N.2. – P. 444-452.
14. Gohzenko A.I. Osnovy postroyeniya teorii bolezni [The basis of the theory of the disease] Monografiya. – Odessa. «Feniks». – 2015. – 84 s. (in Russian)
15. Kolesnik M.O. Diabetychna nefropatiya: up to date (Chastyna 1) [Diabetic Nephropathy: up to date (Part 1)] *Therapia*. – 2015. - №12(104). – S. 13-17. (in Ukrainian)