

НОВАЯ МОДЕЛЬ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА И ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС

Байрашева В.К.^{1,2}, Бабенко А.Ю.^{1,2}, Дмитриев Ю.В.¹,
Байрамов А.А.¹, Чефу С.Г.^{1,2}, Шаталов И.С.³, Пчелин И. Ю.⁴,
Иванова А.Н.⁴, Гринева Е.Н.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Северо-Западный Федеральный медицинский исследовательский
центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург,
Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский
национальный исследовательский университет информационных
технологий, механики и оптики», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Байрашева Валентина Кузьминична
ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России
ул. Пархоменко, д. 15,
Санкт-Петербург, Россия, 194156.
E-mail: bayrasheva_med@mail.ru

Статья поступила в редакцию 06.10.2016
и принята к печати 13.10.2016

Резюме

Негенетические модели диабетической нефропатии у крыс наиболее часто воспроизводят с использованием стрептозотоцина. Однако, в большинстве известных стрептозотоциновых моделей развивается диабет с выраженной инсулинопенией без ожирения, дислипидемии и инсулинорезистентности, что, как правило, не характерно для сахарного диабета 2-го типа. Нами предложена модель диабетической нефропатии при сахарном диабете 2-го типа, индуцированном внутрибрюшинным введением половозрелым самцам крыс стока Wistar последовательно с интервалом в 15 минут растворов никотинамида (230 мг/кг) и стрептозотоцина (65 мг/кг). Предварительно крысам выполнялась правосторонняя нефрэктомия с назначением в дальнейшем на 5 недель высокожирового питания, содержащего говяжье сало. Согласно полученным данным, у крыс с диабетом в описываемой модели по сравнению с контрольной группой, также подвергшейся геминефрэктомии, но находившейся на стандартном лабораторном рационе без введения стрептозотоцина и никотинамида, развиваются избыточный вес, умеренные гипергликемия, инсулинорезистентность и дислипидемия. На 30-й неделе эксперимента развитие диабетической нефропатии подтверждено значимым увеличением экскреции альбумина с мочой, снижением клиренса креатинина, а также наличием характерных морфологических почечных признаков по результатам световой и электронной микроскопии, что позволяет рассматривать предложенную модель у крыс в качестве валидного инструмента для моделирования относительно ранних стадий диабетической нефропатии при диабете 2-го типа, наблюдаемых у пациентов.

Ключевые слова: крысы, негенетическая модель, сахарный диабет 2-го типа, диабетическая нефропатия.

Для цитирования: Трансляционная медицина. 2016; 3 (4): 44–55.

A NOVEL MODEL OF TYPE 2 DIABETES AND DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS

Bayrasheva V.K.^{1,2}, Babenko A.Yu.^{1,2}, Dmitriev Yu.V.¹, Bairamov A.A.¹,
 Chefu S.G.^{1,2}, Shatalov I.S.³, Pchelin I.Yu.⁴, Ivanova A.N.⁴,
 Grineva E.N.^{1,2}

Corresponding author:

Valentina K. Bayrasheva
 Federal Almazov North-West Medical
 Research Centre
 Parkhomenko str. 15, Saint Petersburg,
 Russia, 194156
 E-mail: bayrasheva_med@mail.ru

Received 06 October 2016; accepted
 13 October 2016.

¹ Federal Almazov North-West Medical Research Centre,
 Saint Petersburg, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
 Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg National Research University of Information
 Technologies, Mechanics and Optics, Saint Petersburg, Russia.

⁴ Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Non-genetic rat models of diabetic nephropathy are most commonly reproduced by using streptozotocin. However, administration of high doses of streptozotocin might have significant disadvantages such as severe hyperglycemia due to insulinopenic condition. Nevertheless, certain significant metabolic factors besides hyperglycemia, such as insulin resistance, obesity, dyslipidemia, and hypertension plays a crucial role in the onset and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus. Hereby, we have described a novel model of type 2 diabetes and nephropathy in rats that is characterized by morphofunctional changes similar to relatively early stages of human diabetic nephropathy.

Starting at 3 weeks after right-side nephrectomy, adult male Wistar rats were fed for 5 weeks the high-fat diet containing beef tallow and then successively received nicotinamide (230 mg/kg) and streptozotocin (65 mg/kg) intraperitoneally in 15-min interval. Control nondiabetic uninephrectomized rats received vehicle and were fed normal chow. With described model we observed the development of mild hyperglycemia, overweight, slight significant increase in insulin resistance, and dyslipidemia which resulted in a gradual decrease in renal function up to significant reduced creatinine clearance and elevated albuminuria, and confirmed diabetic nephropathy by validated electron and light microscopic morphological criteria at week 30 of the study.

Key words: rats, non-genetic model, type 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy.

For citation: Translyatsionnaya meditsina = Translational Medicine. 2016; 3 (4): 44–55.

Актуальность исследования

Несмотря на достигнутые успехи в разработке препаратов для лечения сахарного диабета (СД) 2-го типа, пока ещё рано говорить о значимом уменьшении распространённости одного из его наиболее тяжёлых сосудистых осложнений — диабетической нефропатии (ДН) [1]. Изучение патогенеза развития осложнения и исследования в области фармакологической нефропротекции обуславливают необходимость выбора наиболее адекватной экспериментальной модели ДН, максимально точно воспроизводящей морфофункциональные почечные изменения, наблюдаемые

у пациентов с разными стадиями диабетической болезни почек при СД 2-го типа.

В настоящее время наиболее часто моделирование СД и ДН у аутобредных крыс по целому ряду причин производят с использованием вещества стрептозотоцина (СТЗ), токсичного для β-клеток поджелудочной железы [2,3], который вводят в высоких и средних дозах. Проявляя в организме алкилирующие свойства, СТЗ нарушает синтез ДНК клеток с последующей их гибелью [4].

Модели СД у крыс, в которых применяют высокие дозы СТЗ (55–80 мг/кг), характеризуются

развитием выраженной инсулинопении вследствие массивного разрушения инсулин-секреторного аппарата поджелудочной железы. Такие модели по своим клиническим характеристикам напоминают СД 1 типа [2,3], поскольку сопровождаются возникновением стойкой выраженной гипергликемии, быстрой декомпенсацией течения заболевания и похуданием у крыс, что не позволяет планировать продолжительные хронические эксперименты на таких животных по этическим соображениям и из-за высокой летальности [3]. Кроме того, использование вышеупомянутых моделей не даёт оценить вклад таких значимых патогенетических компонентов ДН при СД 2 типа, как инсулинорезистентность, ожирение и дислипидемия [1]. Все эти недостатки ограничивают возможность переноса полученных результатов на пациентов с диабетом 2-го типа.

Одним из возможных способов снижения вероятности развития выраженной гипергликемии является использование более низких доз СТЗ, вводимого парентеральным путём однократно или многократно. Это приводит лишь к частичному нарушению секреции инсулина [3], которым, как правило, характеризуется СД 2-го типа [1]. При этом описанные выше метаболические нарушения моделируются путём перевода животных на различные по составу и длительности варианты высококалорийного питания, например, с высоким содержанием жира [5-7] или фруктозы [8]. Однако, по нашим наблюдениям, применение двукратного внутрибрюшинного введения СТЗ в дозе 30 мг/кг, согласно методике Zhang M., Lv X., Li J., et al., с 7-дневным интервалом крысам стока Wistar, получавшим высокожировое питание, не всегда позволяет добиться однородных и стабильных показателей гликемии и липидограммы [9].

Ещё одним описанным в литературе способом ослабления выраженности стрептозотоцинового СД является предварительное введение никотиамида (НА), умеренно ингибирующего фермент поли(АДФ-рибозо)-полимеразу [4]. Чрезмерная активация последнего при проникновении СТЗ в β -инсулоциты приводит к критичному для клеток дефициту НАД⁺ [10] и их гибели.

Для моделирования СД 2-го типа у крыс используют различные режимы и дозы введения комбинации СТЗ и НА. Так, Islam M. and Choi H. в 2007 г. описали модель СД 2-го типа с внутрибрюшинным введением последовательно НА в дозе 230 мг/кг и СТЗ в дозе 65 мг/кг, успешно применённую нашими соотечественниками [11, 12]. Однако специфических лабораторно-морфологических признаков ДН у крыс в этих работах не выявлено. В описанной же Khanra R., Dewanjee S., K Dua T., et

al. модели СТЗ-НА-индуцированной ДН к 28 дню эксперимента сообщается о незначительных начальных почечных нарушениях [13].

Таким образом, описанные на сегодняшний день негенетические модели СД 2 типа у крыс с применением СТЗ нельзя считать оптимальными для изучения патогенетических и фармакологических аспектов ДН.

Цель исследования: разработать модель СД у крыс с применением СТЗ с высокой воспроизводимостью метаболических, биохимических и морфологических почечных изменений, характерных для ДН при СД 2-го типа у пациентов.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями Этического комитета ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова».

Объект исследования и структура эксперимента

Исследование проводилось на половозрелых самцах крыс стока Wistar (массой 180-210 г), которых содержали в условиях 12/12-часового светового режима при свободном доступе к питьевой воде и пище.

Крысам в условиях наркоза (пентобарбитал натрия 50 мг/кг внутривенно) с использованием заднепоясничного доступа, в условиях соблюдения методов асептики и антисептики, проводили правостороннюю нефрэктомию. Для сохранения надпочечников почку перед резекцией декапсулировали.

Через 3 недели после операции животные случайным образом были разделены на 2 группы:

— крысы (n=10), получавшие до этого полноценный гранулированный корм для грызунов (ООО «Лабораторкорм», Россия, рецептура ПК-120), содержащий 5% жиров, 48% углеводов и 18% белков с общей калорийностью 310 ккал/100 г, были переведены на 5 недель на высокожировое питание посредством добавления к стандартному корму говяжьего сала (с содержанием основных питательных веществ в рационе из расчёта 20% жиров, 48% углеводов, 20% белков с общей калорийностью 450 ккал/100 г). По окончании высокожировой диеты крысам вводился НА и СТЗ (группа СД 2 (НА-СТЗ));

— контрольная группа крыс (n=10), на протяжении всего эксперимента получавшие стандартное лабораторное питание и которым вместо СТЗ и НА вводились их растворители (контроль без СД 2).

Для индукции СД геминефрэктомизированным крысам по окончании 5-недельной высокожировой диеты натошак внутривенно вводился никотинамид (Herba Nemosan, Австрия) в дозе 230 мг/

кг, растворённый в 0,9% растворе хлорида натрия, а через 15 мин производилась внутрибрюшинная инъекция стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг, растворенного в натриевом цитратном буфере. Цитратный буфер и раствор СТЗ готовился по ранее описанной методике [2] с использованием реагентов фирмы Sigma Aldrich, США.

Определяемые лабораторные показатели, подтверждающие развитие сахарного диабета 2-го типа и диабетической нефропатии

Через 7 дней после инъекции препаратами всем крысам после 8 ч голода выполнялся оральный глюкозотолерантный тест (ОГТТ) с введением 40% раствора глюкозы в дозе 3 г/кг (с измерением гликемии натошак, через 30, 60 и 120 мин после введения глюкозы через зонд). Диагностическими критериями СД 2-го типа считали измеренную гликемию натошак от 9,0 до 14,0 ммоль/л (по глюкометру OneTouch Ultra, Johnson and Johnson, США) и рассчитанную по результатам ОГТТ площадь под кривой глюкозы, в 2 раза превышающую показатель в контрольной группе без диабета [14].

На 10-й, 20-й неделе эксперимента осуществлялся забор крови из хвостовой вены. В эти же сроки и по окончании эксперимента (на 30-й неделе) перед взятием крови и ткани почки у крыс собиралась суточная моча. Для этого животные на 24 часа помещались в индивидуальные метаболические камеры. Определялся объём выделившейся мочи, концентрация альбумина (на автоматическом фотометре для микропланшет ELx800 (США) с использованием ИФА-набора Assaypro, США), рассчитывалась экскреция альбумина за 24 часа.

В крови определялись следующие показатели: гликированный гемоглобин (методом ВЭЖХ на анализаторе BioRad d10, США), глюкоза, креатинин, мочевины, холестерин, триглицериды (с использованием реактивов и анализатора Cobas Integra 400 plus Roche, Франция), а также инсулин (ИФА-набор ALPCO Diagnostics, США), с использованием умножающего коэффициента 174 для перевода «нг/мл» в «пмоль/л». После этого рассчитывали индекс инсулинорезистентности, используя математическую гомеостатическую модель для оценки резистентности к инсулину (НОМА-IR) по формуле:

НОМА-IR = (глюкоза крови натошак (ммоль/л) × инсулин натошак (пмоль/л)) / 155,

а также клиренс креатинина по формуле:

Клиренс креатинина (мл/мин/кг) = (объём мочи за 24 ч (мл) × креатинин мочи (ммоль/л)) / (1400 (мин) × ((креатинин сыворотки (мкмоль/л) × 0,001)) / (масса крысы (кг))).

Морфологические исследования

Для светооптической микроскопии кусочки паренхимы почки фиксировали в нейтральном 4% формалине в течение 24 ч и после проводки в спиртах возрастающей крепости заливали в парафин. Изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 3-4 мкм на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Австрия), проводили трихромное окрашивание по Массону и ШИК-реакцию (наборы фирмы Bio-Optica, Италия).

Окрашенные реактивом Шиффа срезы использовали для полуколичественного расчёта индексов мезангиальной экспансии и гломерулосклероза, для этого не меньше 35 клубочков в срезе подвергались индивидуальному учёту с присвоением условного балла каждому просмотренному на микроскопе Leica DMI6000 (Австрия) клубочку.

Экспансия мезангиального матрикса определялась как наличие увеличенного количества ШИК-позитивного вещества в области мезангия с наличием/без гиперклеточности. Для расчёта индекса мезангиальной экспансии каждому просмотренному клубочку в срезе присваивались баллы от «1» (экспансия мезангиального матрикса от 0 до 25%) до «4» (почти полная экспансия мезангия - 75-100%), после чего для каждого среза рассчитывался общий балл по формуле:

$$((1 \times N \text{ с баллом "1"}) + (2 \times N \text{ с баллом "2"}) + (3 \times N \text{ с баллом "3"}) + (4 \times N \text{ с баллом "4"})) / (\text{общее число просмотренных клубочков в срезе}),$$

где N — количество клубочков в срезе, получивших соответствующий балл.

Гломерулосклероз определялся как спадение и/или запустение клубочковых капилляров в сочетании с артериологипертонией. Индекс гломерулосклероза определялся аналогичным полуколичественным способом, где балл «1» означал вовлечение в патологический процесс до 25% капиллярной сети с начальными признаками экспансии мезангия, а балл «4» — почти полную (более 75%) облитерацию клубочковых капилляров.

Срезы, окрашенные трихромом по Массону, использовали для расчёта индекса тубулоинтерстициального фиброза. Для этого каждый почечный срез разделялся на 8 областей (4 — корковый слой, 4 — юкстагломерулярная область), микрофотографии которых (сделанные на увеличении ×200 на встроенной в микроскоп Leica DMI6000 цифровой камере Leica DFC495 с 8Мп CCD) были обработаны в программе ImageJ версия 1.5 (Национальный Институт здоровья), находящейся в свободном доступе на сайте <https://imagej.nih.gov/ij/>. Каждой проанализированной области был присвоен условный балл: от «1» (при фиброзе менее 25%

общей площади) до «3» - при вовлечении более 50% исследуемой области.

Для обеих экспериментальных групп были рассчитаны средние значения индексов, полученные для каждой крысы в группе.

Для проведения просвечивающей электронной микроскопии кусочки коркового слоя почки (1x1x2 мм) фиксировались в 2,5% растворе глутаральдегида, приготовленном на 0,1 М каоди-латном буфере с активной реакцией среды pH 7,2 в течение 12 ч в условиях холодильника, с последующей постфиксацией в 1,0% тетраоксиде осмия в течение 60 мин, после чего производили его дегидратацию в спиртах и ацетоне и заливали в смесь эпоксидных смол (EMbed 812, EMS, США). Ультратонкие срезы окрашивали 0,5% раствором уранил ацетата, контрастировали 3,0% цитратом свинца с последующим изучением в электронном микроскопе Libra 120 plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Документирование проводили с использованием аксиальной 2к CCD цифровой камеры TRS (Германия). Толщина гломерулярной базальной мембраны (ГБМ) определялась посредством анализа полученных на увеличении $\times 3200$ микрофотографий в программе ImageJ версия 1.5. С этой целью, после проведения калибровки в программе, как минимум в 30 выбранных точках (каждый 1 мкм длины ГБМ) были наложены прямолиней-

ные перпендикуляры от наружного листка ГБМ до внутреннего, замеряющие расстояние.

Статистическая обработка данных

Обработка полученных данных производилась с использованием стандартных непараметрических тестов сравнения в пакетах статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США) и SPSS 20.0 (SPSS Inc., США). Все данные представлены в виде «среднее значение $\pm$ стандартное отклонение». Значимыми считали различия при $P < 0,05$.

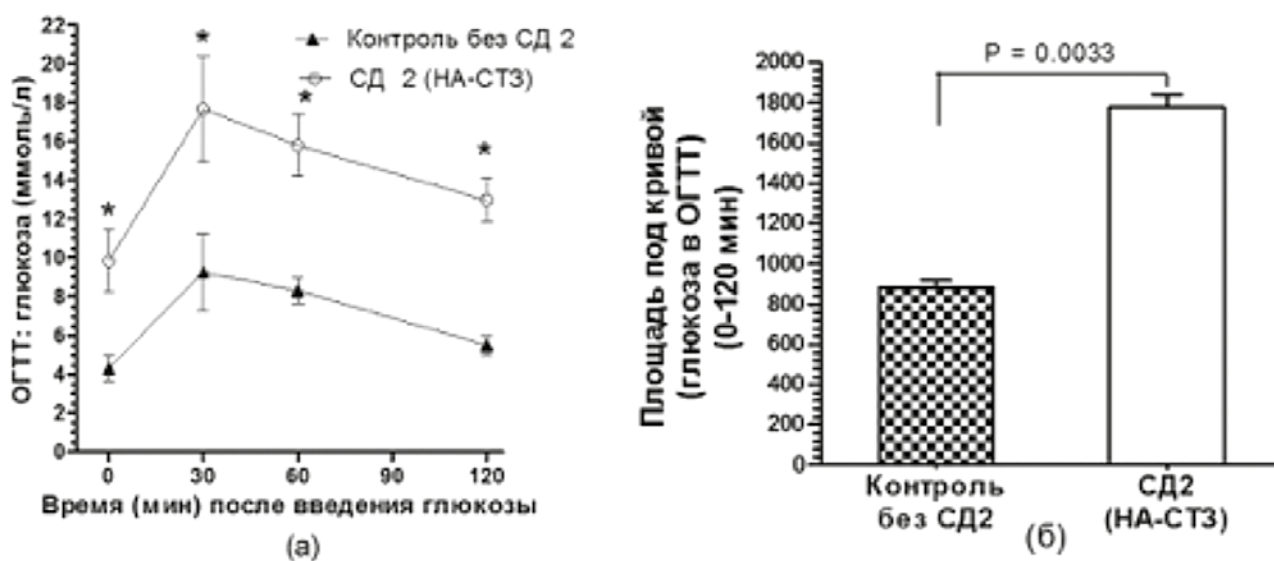
Результаты

Результаты исследования метаболических параметров и показателей углеводного обмена

После завершения скармливания животным питания с высоким содержанием жира на 8-й неделе эксперимента отмечалась значимая разница в показателях массы тела ($305,9 \pm 21,9$ г) по сравнению с контрольной группой ($268,2 \pm 19,3$ г), $P = 0,0062$. Уровень глюкозы крови натощак также повысился после 5 недель высокожировой диеты ($5,6 \pm 0,46$ ммоль/л), однако эта разница была незначимой в сравнении с крысами, получавшими стандартное питание ($4,4 \pm 0,32$ ммоль/л, $P = 0,07$).

Выполненный через 1 нед после введения НА и СТЗ ОГТТ показал развитие СД 2-го типа, согласно описанным выше критериям, у 7 крыс из 10, при этом у 2 крыс глюкоза крови натощак была ниже

Рисунок 1. Результаты проведения орального глюкозотолерантного теста в экспериментальных группах



Примечание: ОГТТ — оральный глюкозотолерантный тест. (а) Кривые глюкозы, построенные по результатам проведения ОГТТ в исследуемых группах. * — $P < 0,01$ в группе крыс с СД 2 (НА-СТЗ) в сравнении с группой крыс без СД 2 в каждой временной точке (U-критерий Манна-Уитни). (б) Построенная общая площадь под кривой по результатам ОГТТ в исследуемых группах.

Таблица 1. Суммирующая таблица, отражающая изменения основных метаболических показателей на протяжении эксперимента в сравниваемых группах

Экспериментальные группы	Контроль без СД 2			СД 2 (НА-СТЗ)		
Оцениваемый показатель в динамике (по неделям)	Среднее значение ± среднеквадратичное отклонение					
	10 нед	20 нед	30 нед	10 нед	20 нед	30 нед
Масса тела, г	285,4 20,5	336,5 29,2	372,3 29,8	328,9 22,7*	403,4 12,4*	455,6 13,0*
HbA1 c,%	3,68 0,29	3,73 0,13	3,98 0,26	5,39 0,34 *	7,02 0,29 *	6,94 0,27 *
Глюкоза крови натощак, ммоль/л	3,7 0,39	3,8 0,47	3,7 0,36	9,7 2,60*	9,2 2,14*	9,3 2,22*
Инсулин сыворотки, пмоль/л	83,5 6,81	96,6 9,18	87,8 6,24	49,6 7,34*	51,3 8,72*	50,9 8,85*
НОМА-IR	1,93 0,29	2,23 0,14	2,01 0,22	3,20 0,39*	2,87 0,22*	2,91 0,70*
Общий холестерин, ммоль/л	1,55 0,35	1,58 0,19	1,63 0,27	2,89 0,25*	2,76 0,23*	2,74 0,21*
Триглицериды, ммоль/л	0,57 0,08	0,56 0,12	0,70 0,17	1,05 0,18*	0,90 0,12*	0,89 0,19*

Примечание: * — $P < 0,05$ в сравнении с группой контроля без СД 2 (U-критерий Манна-Уитни).

6,0 ммоль/л, у 1 животного развилась выраженная гипергликемия (выше 20,0 ммоль/л), в связи с чем им ОГТТ не проводился, и они были выведены из эксперимента. Летальных исходов на протяжении эксперимента не зафиксировано. Во всех оцененных временных точках кривой глюкозы отмечалась значимая разница в показателях гликемии между двумя сравниваемыми группами с высоким уровнем значимости $P < 0,01$, что отражено на рис. 1 (а). При этом рассчитанная площадь под кривой глюкозы (AUC) также подтверждала развитие СД (рис. 1 (б)).

В табл. 1 отражены изменения основных метаболических показателей, оцененных в исследовании. Продолжительность высокожирового питания составила не более 5 недель, поскольку крысы, начиная с 3-й недели, стали неохотно употреблять предлагаемый им корм, полностью отказавшись от него к 6-й неделе эксперимента. Несмотря на это, группа НА-СТЗ, в сравнении с контрольной группой, характеризовалась достоверно более высокими показателями массы тела и параметрами липидного обмена (общий холестерин, триглицериды), сохраняющимися до завершения исследования на 30-й неделе. Кроме

того, на протяжении более чем 20 недель после введения НА и СТЗ сохранялись стабильными показатели формирования СД (гипергликемия, повышение уровня гликированного гемоглобина и умеренно сниженный уровень инсулина натощак). Индекс инсулинорезистентности НОМА также был значимо выше в основной группе во всех трёх точках измерения без тенденции к снижению к окончанию эксперимента.

Лабораторные показатели почечной функции

Лабораторные признаки развития почечной дисфункции в группе НА-СТЗ были зафиксированы на 20-й неделе эксперимента (табл. 2), что нашло отражение в почти десятикратной разнице в уровне альбуминурии ($478,4 \pm 63,3$ мкг/24 ч) и значимом повышении уровня креатинина сыворотки ($47,0 \pm 4,0$ мл/мин/кг) по сравнению с крысами без диабета ($35,7 \pm 9,9$, $P < 0,001$ и $35,8 \pm 3,6$, $P < 0,05$, соответственно). Выявленные нарушения усугубились к окончанию исследования, когда отмечалась также значимая разница в уровне мочевины крови. За 20 недель с момента первого измерения суточная альбуминурия в группе НА-СТЗ увеличилась

Таблица 2. Суммирующая таблица, отражающая изменения показателей функции почек на протяжении эксперимента в сравниваемых группах

Экспериментальные группы	Контроль без СД 2			СД 2 (НА-СТЗ)		
Оцениваемый показатель в динамике (по неделям)	Среднее значение ± среднеквадратичное отклонение					
	10 нед	20 нед	30 нед	10 нед	20 нед	30 нед
Клиренс креатинина, мл/мин/кг	1,11 0,18	1,15 0,06	1,28 0,38	1,57 0,37	1,35 0,42	0,89 0,10* 
Альбумин мочи, мкг/24 ч	30,4 11,6	35,7 9,9	71,4 26,4 	52,1 17,6	478,4 63,3* 	2263,8 394,5* 
Мочевина, ммоль/л	н/о	н/о	6,5 0,89	н/о	н/о	8,82 1,03*
Креатинин сыворотки, мкмоль/л	33,5 3,4	35,8 3,6	41,9 4,1	38,3 3,0	47,0 4,0*	69,0 4,30* 

Примечание: н/о — показатель не определялся. * — $P < 0,05$ в сравнении с группой контроля без СД 2 (U-критерий Манна-Уитни); $\bullet$ — $P < 0,05$ в сравнении со значением параметра в этой же группе на 10-й неделе эксперимента (критерий Вилкоксона).

почти на 400% (с $52,1 \pm 17,6$ мкг/24 ч на 10-й неделе до $2263,8 \pm 394,5$ мкг/24 ч к окончанию исследования, $P = 0,002$), при этом клиренс креатинина снизился более чем на треть от исходного значения (с $1,57 \pm 0,37$ мл/мин/кг до $0,89 \pm 0,10$ мл/мин/кг, $P = 0,021$). Кроме того, по окончании исследования зафиксирована значимая разница с уровнем клиренса креатинина в группе контроля ($1,28 \pm 0,38$ мл/мин/кг, $P = 0,033$). Стоит отметить, что отмеченные в группе без СД 2 в ходе эксперимента тенденция к увеличению клиренса креатинина, а также умеренное повышение за 20 недель альбуминурии могут являться следствием выполненной правосторонней нефрэктомии с последующим развитием гиперфильтрации, что не противоречит имеющимся литературным данным [15].

Результаты морфологического исследования почечной ткани

Результаты морфологического исследования почечной ткани крыс подтвердили формирование специфических признаков, характерных для ДН, в группе НА-СТЗ. Так, рассчитанные индексы мезангиальной экспансии (рис. 2 (б)) и гломерулосклероза (рис. 3 (б)) в группе НА-СТЗ более чем в 5 раз превышали соответствующие показатели в контрольной группе. Кроме того, в группе НА-СТЗ отмечалось увеличение размеров клубочков, их гиперклеточность, неравномерное утолщение стенок капилляров, а в некоторых участках — сращение капиллярных петель с боуменовыми кап-

сулой (рис. 2 (а)). Тем не менее, нами не зафиксировано развитие полного фиброза и окклюзии клубочков (баллы «3» и «4»), а также формирование узелкового гломерулосклероза, характерных, как правило, для поздних стадий ДН у пациентов с СД с формированием постоянной протеинурии [1]. В контрольной группе также выявлялись клубочки с начальными склеротическими изменениями (балл «1»), однако, они были единичными (рис. 3(а)).

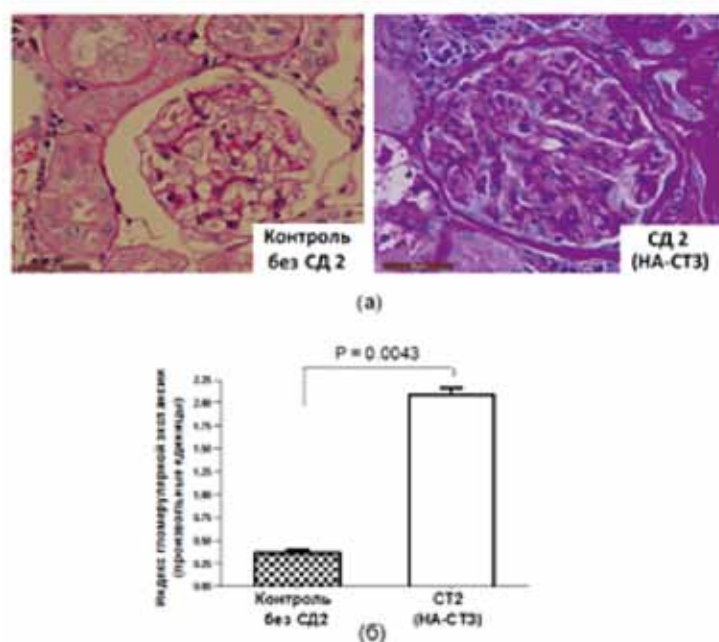
Характерные для ДН клубочковые изменения также выявлены при проведении просвечивающей электронной микроскопии (рис. 4 (а)). Так, в группе НА-СТЗ наряду с неравномерностью ГБМ отмечалась локальное утолщение и слияние подоцитов с потерей их малых отростков, а также значимое увеличение толщины ГБМ (рис. 4 (б)) по сравнению с контрольной группой ($292,1 \pm 54,1$ нм и $189,2 \pm 14,84$ нм, соответственно, $P < 0,01$).

Индекс тубулоинтерстициального фиброза также был значимо выше в группе НА-СТЗ (рис. 5 (б)), при этом у крыс с диабетом отмечалось расширение просвета канальцев с признаками частичной атрофии эпителия (рис. 5 (а)).

Обсуждение

Использование валидной модели ДН при СД 2-го типа является одним из главных условий при изучении патогенеза развития заболевания и проведении исследований в области фармакологической нефропротекции. Естественное течение ДН

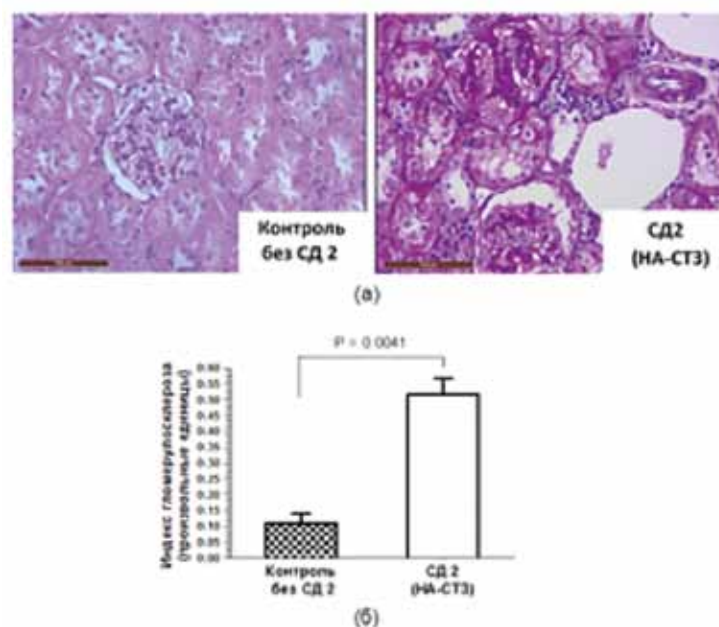
Рисунок 2. Изменения клубочков почек крыс в экспериментальных группах (экспансия гломерулярного матрикса)



(а) Микрофотографии. ШИК-окраска, увеличение $\times 640$.

(б) Рассчитанный индекс экспансии гломерулярного матрикса в двух группах.

Рисунок 3. Гломерулосклеротические изменения почечной ткани крыс в экспериментальных группах



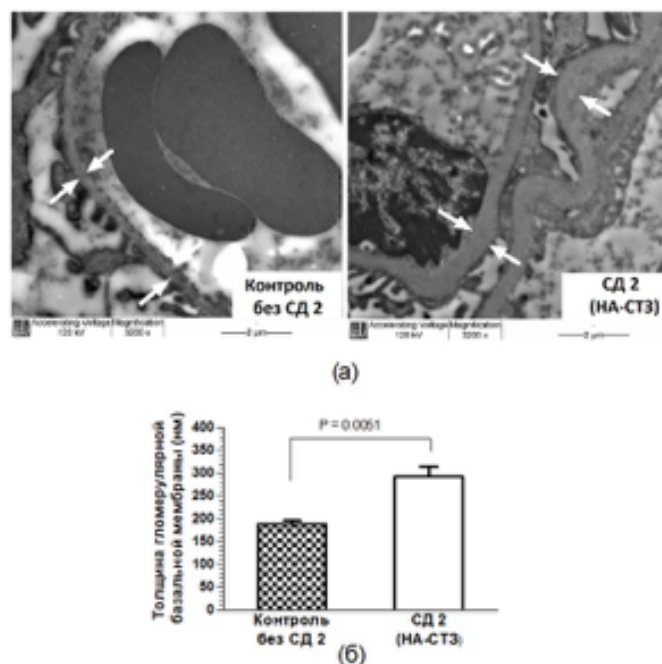
(а) Микрофотографии. ШИК-окраска, увеличение $\times 400$.

(б) Рассчитанный индекс гломерулосклероза в обеих группах.

у пациентов с СД в классическом своём развитии проходит прогрессирование от нормаальбуминурии до микроальбуминурии с последующим развитием макроальбуминурии/протеинурии и снижения СКФ [1]. На основании почечных из-

менений, выявляемых у пациентов с ДН, базирующийся в США консорциум по моделям СД и его осложнений (AMDCC, <https://diacom.org>) разработал критерии валидной модели ДН у грызунов, включающие как функциональные нарушения

Рисунок 4. Результаты трансмиссионной электронной микроскопии почечной ткани крыс в экспериментальных группах



- (а) Микрофотографии, увеличение $\times 3200$. Стрелкой обозначена толщина гломерулярной базальной мембраны.
 (б) Результаты количественной оценки толщины гломерулярной базальной мембраны в обеих группах.

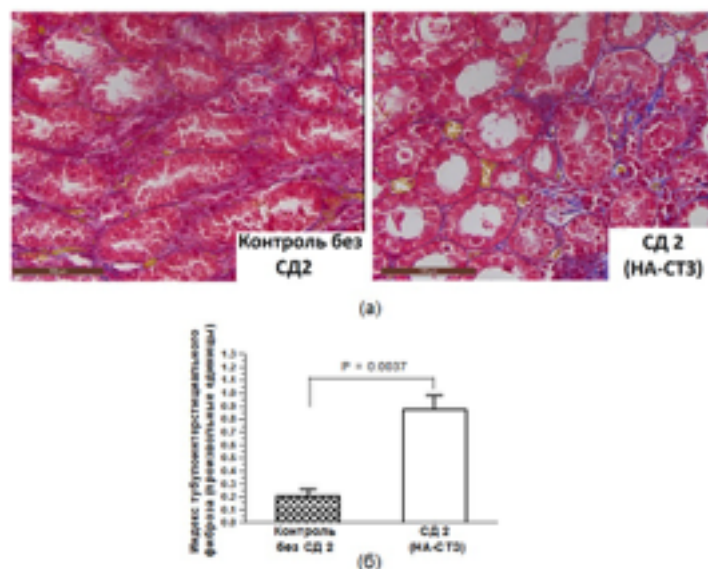
(более чем 50-кратное увеличение альбуминурии и снижение клиренса креатинина на 50% за период наблюдения), так и морфологические (двукратное увеличение толщины ГБМ по сравнению с исходным, наличие тубулоинтерстициального фиброза, мезангиального склероза и артериологиперплазии). Кроме того, при моделировании ДН при СД 2-го типа важно учитывать значительный вклад в прогрессию осложнения, помимо гипергликемии, таких метаболических факторов, как ожирение, инсулинорезистентность и дислипидемия [1], которые с высокой частотой встречаются среди пациентов с СД 2-го типа [16].

На сегодняшний день среди негенетических моделей ДН при СД 2-го типа у крыс наиболее близкой по своим морфофункциональным и метаболическим характеристикам является модель, описанная в 2006 г. Sugano M., Yamato H., Hayashi T. et al. [7]. В данном исследовании с целью формирования ожирения и инсулинорезистентности взрослых самцов крыс Sprague-Dawley кормили коммерческим высокожировым кормом на протяжении 37 недель. При этом умеренная гипергликемия, как сообщают авторы, индуцировалась однократной внутривенной инъекцией СТЗ, вводимого в дозе 40 мг/кг в начале эксперимента, а для ускорения наступления почечных изменений крысам выполнялась геминефрэктомия. В работе сообщается о значимом повышении альбуминурии и умеренном снижении клиренса креати-

нина уже к 15 неделе эксперимента, когда морфологически в почечной ткани выявлялись начальные признаки экспансии гломерулярного матрикса. Выявленные почечные нарушения усугубились к окончанию исследования (37-я неделя), что проявлялось появлением протеинурии, значимым снижением клиренса креатинина и развитием диффузного гломерулосклероза [7]. Тем не менее, в данной работе не были оценены такие важные морфологические характеристики модели ДН, как толщина ГБМ и тубулоинтерстициальные изменения.

В нашей работе мы усовершенствовали модель СД 2-го типа у крыс, описанную Islam S. and Choi H. [11], дополнив введение НА и СТЗ геминефрэктомией и высокожировым питанием продолжительностью 5 недель. Таким образом, в предложенном нами способе моделирования СД 2-го типа были инициированы основные патогенетические пусковые механизмы, запускающие процессы формирования ДН, такие как умеренная гипергликемия, инсулинорезистентность, избыточный вес, дислипидемия и альбуминурия, что ранее в моделях СТЗ-НА-индуцированного СД у крыс не было продемонстрировано. Кроме того, в описанной нами модели оценены все морфофункциональные характеристики, необходимые для валидации модели ДН. В частности, за 20 недель с момента первичной оценки функции почек выявлено повышение суточной альбуминурии более чем в 40 раз,

Рисунок 5. Тубулоинтерстициальное повреждение почечной ткани крыс в экспериментальных группах



(а) Микрофотографии. Трихромное окрашивание по Массону, увеличение $\times 200$.

(б) Рассчитанный индекс тубулоинтерстициального фиброза в обеих группах.

близкое к двукратному снижению клиренса креатинина, а также значимое утолщение ГБМ с формированием тубулоинтерстициального фиброза и начальными склеротическими процессами в клубочках на 30-й неделе эксперимента.

В описанной модели мы не наблюдали развитие выраженных гломерулосклеротических изменений и протеинурии, характерных, как правило, для поздних стадий ДН, считающихся относительно необратимыми [1]. Не исключено, что увеличение продолжительности эксперимента позволило бы смоделировать и эту клиническую ситуацию. Кроме того, в нашей работе не оценивались показатели системной гемодинамики, в частности, артериальное давление, поскольку данный показатель не является обязательным критерием, необходимым для валидации модели ДН у грызунов. Тем не менее, последовательное развитие в описанной нами модели относительно ранних и ещё обратимых стадий ДН позволило выявить нефропротективные свойства у ряда сахароснижающих препаратов, которые назначались с 20-й недели эксперимента крысам с СД [17].

Заключение

Таким образом, в усовершенствованной нами модели никотинамид-стрептозотоцинового сахарного диабета 2-го типа, дополненной геминефрэктомией и назначением 5-недельного высокожирового питания, формируется большинство клинически значимых факторов риска развития и прогрессирования диабетической нефропатии при сахарном диабете

2-го типа, таких как умеренная гипергликемия, инсулинорезистентность, избыточный вес, дислипидемия и альбуминурия. Описанную модель отличает высокая воспроизводимость компонентов метаболического синдрома при недлительном периоде питания с высоким содержанием жира, что технически упрощает проведение хронического эксперимента, отсутствие летальных случаев среди животных, а также стадийность морфофункциональных почечных изменений, максимально близко воспроизводящих естественное течение относительно ранних, обратимых стадий диабетической нефропатии при сахарном диабете 2-го типа у людей.

Благодарность/ Acknowledgments

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП «Клеточные и молекулярные технологии» БИН им. В.Л. Комарова РАН и с использованием оборудования ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ. / The research was done using the equipment of The Core Facilities Center «Cell and Molecular Technologies» at the Komarov BIN RAS (St. Petersburg, Russia) and the resource center «Molecular and cell technologies» of St. Petersburg State University.

Финансирование/ Financial support

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ N 15-04-08138. /This project was supported by the grant of Russian foundation for basic research № 15-04-08138.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Shestakova MV, Dedov II. Diabetes and chronic kidney disease. М.: Meditsinskoe informatsionnoe agenstvo, 2009. p. 200. In Russian. [Шестакова М.В., Дедов И.И. Сахарный диабет и хроническая болезнь почек. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. с. 482].
2. Bayrasheva VK. Experimental modeling of diabetes and diabetic nephropathy. *Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya* = Modern problems of science and education. 2015; 4. In Russian. [Байрашева В.К. Моделирование сахарного диабета и диабетической нефропатии в эксперименте. Современные проблемы науки и образования. 2015; 4].
3. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12(3): 261-266.
4. Yamamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*; 294:284-286.
5. Zhang M, Lv X, Li J, et al. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp. Diabetes Res.* 2008; 2008:704045.
6. Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H, et al. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2005; 68(6): 2562 - 2571.
7. Sugano M, Yamato H, Hayashi T, et al. High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2006;16(7):477-484.
8. Patel R, Shah P, Deshpande S, et al. Fructose diet and low dose streptozotocin treatment induces the development of diabetic nephropathy in rats. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 2015;15: 305.
9. Bayrasheva VK, Babenko AY, Chetu SG, et al. Nephroprotective properties of DPP-4 inhibitor in experimental model of diabetic nephropathy. *Sovremennye problemi nauki i obrazovaniya* = Modern problems of science and education, 2015; 3. In Russian. [Байрашева В.К., Бабенко А.Ю., Чету С.Г. и др. Нефропротективные свойства ингибитора ДПП-4 в условиях экспериментальной диабетической нефропатии. Современные проблемы науки и образования. 2015; 3].
10. Ghasemi A, Khalifi S, Jedi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol. Hung.* 2014; 101(4): 408-420.
11. Islam S, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study. *Pharmacology*. 2007; 79: 243-249.
12. Spasov AA, Voronkova MP, Snigur GL, et al. Experimental model of a type 2 diabetes. *Biomedicine* = *Biomedicina*. 2011; 3: 12-18. In Russian. [Спасов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г.Л. и др. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. Биомедицина. 2011; 3: 12-18].
13. Khanra R, Dewanjee S, K Dua T, et al. *Abroma augusta* L. (Malvaceae) leaf extract attenuates diabetes induced nephropathy and cardiomyopathy via inhibition of

oxidative stress and inflammatory response. *J. Transl. Med.* 2015; 13:6.

14. Peterson RG, Jackson CV, Zimmerman K, et al. Characterization of the ZDSD rat: a translational model for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes. *J. Diabetes Res.* 2015; 2015:487816.

15. Piepsz A, Collier F, Kinthaert J, et al. Effect of hyperfiltration on long-term follow-up of glomerular filtration rate in male Wistar rats. *Pediatr. Nephrol.* 1994; 8(6): 710-714.

16. Ekoé JM, Rewers M, Williams R, et al. The Epidemiology of diabetes mellitus. 2nd Ed. UK: John Wiley & Sons Ltd, 2008. p. 720.

17. Bayrasheva VK, Grineva EN, Babenko AY, et al. Metformin and vildagliptin: from blood glucose lowering to nephroprotection. *Eur. Heart J.* 2015; 36 (suppl 1): P 436.

Информация об авторах:

Байрашева Валентина Кузьминична — научный сотрудник НИЛ метаболического синдрома, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России; ассистент кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

Бабенко Алина Юрьевна — доктор медицинских наук, заведующая НИЛ диабетологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; доцент кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

Дмитриев Юрий Валерьевич — младший научный сотрудник НИЛ нанотехнологий ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрамов Алекбер Азизович — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ клинической эндокринологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Чету Светлана Григорьевна — кандидат биологических наук, заведующая НИЛ экспериментальных исследований Центра лазерной медицины ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России; старший научный сотрудник НИЛ микроциркуляции, ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России;

Шатаров Иван Сергеевич — аспирант, научный сотрудник НИИ «Биоинженерия» ФГБОУ ВПО «СПбНИУ ИТМО»;

Пчелин Иван Юрьевич — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВПО «СПбГУ»;

Иванова Александра Николаевна — сотрудник ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» ФГБОУ ВПО «СПбГУ»;

Гринева Елена Николаевна — доктор медицинских наук, профессор, директор Института эндокринологии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; профессор кафедры терапии факультетской с курсом эндокринологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России.

Author information:

Valentina K. Bayrasheva, MD, researcher at Scientific laboratory of metabolic syndrome, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; assistant at the Department

for pathophysiology, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg;

Alina Yu. Babenko, MD, Dr. Med. Sci., head of the Scientific laboratory of diabetology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; associate professor at the Department of Faculty therapy, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg;

Yuri V. Dmitriev, MD, senior researcher at Scientific laboratory of nanotechnology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Alekber A. Bairamov, MD, Dr. Med. Sci., leading researcher at Clinical endocrinology laboratory, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Svetlana G. Chefu, PhD, PhD, head of the Scientific laboratory of experimental studies at Laser medicine center, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg; senior researcher at Laboratory of microcirculation, Federal Almazov North-West Medical Research Centre;

Ivan S. Shatalov, postgraduate student, researcher at Bioengineering laboratory, Saint Petersburg national research University of Information, Technologies, Mechanics and Optics;

Ivan Yu. Pchelin, MD, PhD, assistant at the Department of Faculty therapy, Saint Petersburg State University;

Alexandra N. Ivanova, researcher at the resource center «Molecular and cell technologies», Saint Petersburg State University;

Elena N. Grineva, MD, Dr. Med. Sci., Professor, director of the Endocrinology institute, Federal Almazov North-West Medical Research Centre; professor at the Department of Faculty therapy, First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg.