

незначительная их выраженность могут служить индикатором скрытой неудовлетворенности пациента проводимым лечением даже в том случае, если жалобы с его стороны на данный момент отсутствуют. Детальный анализ анкеты в сочетании с дополнительным обследованием пациента в данной ситуации помогает выявить «проблемную зону» ортодонтического лечения и скорректировать его тактику до снятия брекет-системы, уменьшив таким образом риск возникновения осложнений, а также претензий со стороны пациента после его окончания.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мансур Ю. П., Казанцева И. А. Качество жизни взрослых пациентов с аномалиями окклюзии в ходе ортодонтического лечения // Современные проблемы науки и образования. — 2014. — № 4; URL: <http://www.science-education.ru/118-14062> (дата обращения: 23.07.2014).

2. Хорошилкина Ф. Я. Ортодонтия. Дефекты зубов, зубных рядов, аномалии прикуса, морфофункциональные нарушения в челюстно-лицевой области и их комплексное лечение / Ф. Я. Хорошилкина. — М.: Мед. информ. агентство, 2006. — 544 с.

3. Kenealy P. M., Kingdon A., Richmond S., Shaw W. C. The Cardiff dental study: a 20-year critical evaluation of the psychological health gain from orthodontic treatment // Br J Health Psychol. — 2007. — Vol. 12. — P. 17—49.

4. Kressin N., Spiro A., Bosse R., Garcia R., Kazis L. Assessing oral health-related quality of life: founding from the normative aging study. — Medical Care. — 1996. — Vol. 34. — P. 416—427.

## Контактная информация

**Мансур Юлия Петровна** — ассистент курса стоматологии общей практики кафедры стоматологии ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: [juliam75-1@yandex.ru](mailto:juliam75-1@yandex.ru)

УДК 615.015:616.379-008.64:616-092.9

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС

**А. А. Спасов, А. В. Смирнов, О. А. Соловьева, В. А. Кузнецова,  
Н. Г. Паньшин, А. И. Мацевич**

*Волгоградский государственный медицинский университет,  
Волгоградский медицинский научный центр, НИИ фармакологии,  
кафедра фармакологии, кафедра патологической анатомии*

В настоящей работе представлены результаты, свидетельствующие о развитии ранних проявлений диабетической нефропатии при стрептозотоциновой интоксикации у крыс (повышение клиренса креатинина, микроальбуминурия, гипертрофия почек), что подтверждается данными морфологического и иммуногистохимического исследования ткани почек.

*Ключевые слова:* диабетическая нефропатия, стрептозотозин, неферментативное гликозилирование.

## EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS

**A. A. Spasov, A. V. Smirnov, O. A. Solovyova, V. A. Kuznetsova,  
N. G. Panshin, A. I. Matsevich**

This study provides the findings of the study of the development of the early symptoms of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced models of diabetes mellitus in rats (increased creatinine clearance, microalbuminuria, renal hypertrophy) confirmed by morphological and immunohistochemical studies of kidney tissue.

*Key words:* diabetic nephropathy, streptozotocin, non-enzymatic glycation.

Ведущим метаболическим фактором, запускающим каскад патологических изменений в клетках клубочков и канальцев почек при сахарном диабете (СД), является гипергликемия. Она индуцирует неферментативное гликозилирование (гликирование) белков, окислительный стресс, активирует протеинкиназу С, митоген-активирующую протеинкиназу, действие факторов роста, цитокинов, вызывающих повреждение почек на уровне клетки [1, 4]. Гликирование белков базальной мембраны почечных клубочков (коллаген IV типа, ламинин, гепарансульфат и др.) приводит к изменению их

структуры и свойств, утолщению базальной мембраны сосудов клубочка, расширению мезангиального матрикса, снижению уровня гломерулярной фильтрации, что предшествует таким необратимым процессам, как гломерулосклероз и тубулоинтерстициальный фиброз, которые характеризуют финальные стадии развития нефропатии [9].

В настоящее время в клинической практике нет препаратов, способных ингибировать образование конечных продуктов гликирования в организме, поэтому экспериментальное изучение веществ, которые могут

оказывать патогенетическое действие на течение осложнений СД, является актуальным.

В настоящее время разработано достаточно большое количество экспериментальных моделей СД, которые могут быть индуцированы химическими диабетогенными веществами, диетическими или хирургическими манипуляциями или сочетанием этих способов, а также генетически обусловленными [7].

Для воспроизведения СД чаще всего используются модели на взрослых крысах, индуцированные химическими цитотоксическими диабетогенными веществами — стрептозотоцином, аллоксаном, дексаметазоном и др., а также нарушением характера питания (например, содержание животных на рационе с высоким содержанием жиров), либо сочетанным воздействием химических и диетических факторов: стрептозотоциновый диабет с одновременным или предварительным введением никотинамида; стрептозотоциновые модели на фоне высокожировой диеты и т. д. [3, 6].

Для скрининга и детального изучения веществ, оказывающих патогенетическое действие на течение осложнений сахарного диабета наиболее подходящей является модель стрептозотоцин-индуцированного диабета [2, 5], вследствие способности стрептозотоцина накапливаться в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, что приводит к стойкой гипергликемии, необходимой для формирования диабетической нефропатии [10].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Воспроизведение экспериментальной модели диабетической нефропатии у крыс при длительной гипергликемии, вызванной стрептозотоциновой интоксикацией.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 50 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 200—230 г, которых содержали в условиях вивария ВолгГМУ с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных, согласно ГОСТ Р50258-92. Исследования были одобрены Этическим комитетом ВолгГМУ (протокол № 191-2014 от 25 февраля 2014 г.).

Экспериментальный сахарный диабет моделировали путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина («Sigma», США), растворенного в 0,1 М цитратном буфере с pH 4,5 в дозе 45 мг/кг [2]. Количественное определение глюкозы в крови проводили на 3-и сутки после введения цитотоксина и далее ежедневно, в утреннее время, натощак, в течение всего срока эксперимента длительностью 12 недель, с использованием глюкометра «Глюкокард» (Россия). В эксперимент брали животных с уровнем глюкозы натощак более 17 ммоль/л.

В случае превышения значения гликемии натощак уровня 20 ммоль/л животным вводили инсулин длительного действия «ЛантусСолоСтар», Франция (подкожно).

В ходе исследования оценивали массу тела всех экспериментальных животных — исходно и далее ежедневно. Каждые 4 недели крыс помещали на 24 часа в метаболические камеры для сбора мочи с целью исследования суточной экскреции альбумина (колориметрическим методом с бромфеноловым синим «Vital Diagnostics», (Россия). Креатинин сыворотки крови (с последующим расчетом клиренса креатинина) определяли методом Яффе с использованием набора «Pliva-Lachema» (Чехия); уровень гликированного гемоглобина определяли с использованием набора «Фосфорсorb», (Россия).

Для проведения гистологического исследования материала, полученный из почек, фиксировали в течение 24 часов в 10%-м растворе нейтрального забуференного формалина (pH 7,4), обезвоживали и заливали в парафин по общепринятой гистологической методике. На роторном микротоме изготавливали срезы толщиной 3—5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и по Массону.

Для проведения иммуногистохимического исследования (ИГХ) использовали моноклональные антитела к фибронектину (GeneTex, F14) и карбоксиметилизину (Abcam, CMS-10). Процедуры депарафинизации, демаскировки антигенов, визуализации, окрашивания гематоксилином проводили в соответствии с протоколами фирм производителей антител с последующим анализом иммунофенотипа.

Гистологические препараты фотографировали цифровой камерой AxioCam 105 color (Карл Цейс, Германия, 5 мегапикселей) на базе микроскопа AxioCam plus (Карл Цейс, Германия) с использованием объектива x10; x40 и окуляра x10. При морфологическом исследовании оценивали наличие изменений в почечных тельцах (капсула, капилляры, мезангий), изменений соединительной ткани, наличие воспалительной инфильтрации. С помощью морфометрического метода исследования (с использованием программы «ZEN Pro 2012», (Карл Цейс, Германия) определяли площадь почечного тельца (мкм<sup>2</sup>), площадь соединительной ткани сосудистого клубочка в почечном тельце (мкм<sup>2</sup>) и относительную площадь соединительной ткани сосудистого клубочка в почечном тельце.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием табличного редактора Microsoft Excel 2007, программы «GraphPad Prism 5.0», программы STATISTICA 5.0 фирмы StatSoft, Inc., (США) для Windows.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень глюкозы в крови у крыс с СД на 3-й день после введения стрептозотоцина достоверно превос-

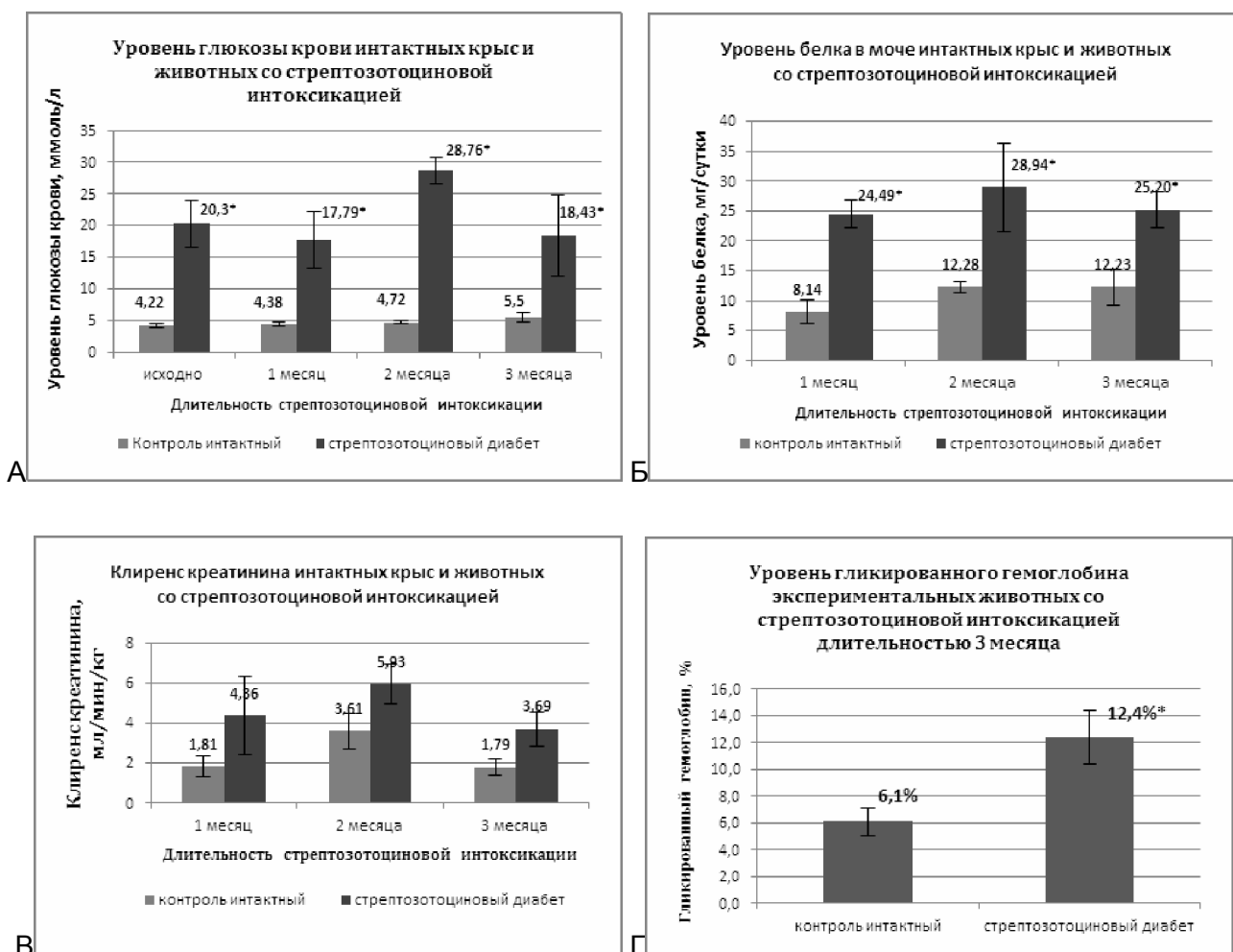
ходил в 4,8 раза таковой у интактных животных. Развитие диабета сопровождалось полидипсией, полиурией, животные были вялы и апатичны.

На протяжении всего эксперимента уровень сахара в крови у крыс с диабетом оставался достоверно высоким, превосходя значения интактной группы животных (в 4 раза — 1-й месяц, в 6 раз — 2-й месяц, в 3,35 раза — 3-й месяц,  $p < 0,05$ ) (рис. 1А). Полученные результаты подтверждались статистически значимым увеличением уровня гликированного гемоглобина у крыс со стрептозотоциновой интоксикацией длительностью 3 месяца относительно интактных (в 2 раза,  $p < 0,05$ , рис. 1Г). У крыс с патологией к концу исследования отмечали снижение массы тела на 20 % по сравнению с исходной.

Каждые 4 недели регистрировали достоверное повышение уровня белка в моче у животных с диабетом по сравнению со значениями интактной группы крыс (в 3 раза — 1-й месяц, в 2,36 раза — 2-й месяц, в 2 ра-

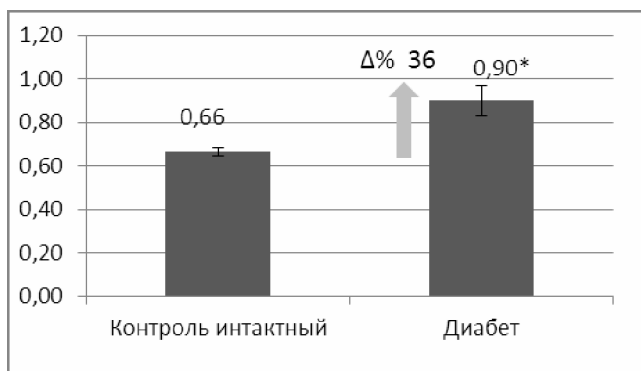
за — 3-й месяц,  $p < 0,05$ ) (рис. 1Б), что может быть связано с потерей отрицательной заряженности мембраны почечных клубочков вследствие нарушенного синтеза протеогликанов, входящих в структуру базальной мембраны капилляров [1]. Клиренс креатинина у крыс с сахарным диабетом недостоверно, но увеличивался по сравнению с таковым у интактных животных (в 2,4 раза — 1-й месяц, в 1,64 раза — 2-й месяц, в 2,06 раза — 3-й месяц) (рис. 1В), что может происходить в результате гиперфилтрации креатинина и свидетельствовать о развитии ранней стадии диабетической нефропатии.

Данное предположение подтверждается увеличением отношения массы почек к массе тела у животных со стрептозотоциновой интоксикацией длительностью 3 месяца на 36 %, по сравнению с интактными животными (рис. 2), что говорит о сопутствующей гипертрофии почек, имеющей место в ранней фазе диабетической нефропатии [8].



\*Данные достоверны по отношению к интактному контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Рис. 1. Данные биохимических исследований крови и мочи интактных крыс и животных со стрептозотоциновой интоксикацией



\*Данные достоверны по отношению к интактному контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Рис. 2. Отношение массы почек к массе тела интактных крыс и у животных со стрептозотоциновой интоксикацией длительностью 3 месяца

Морфологическое исследование показало, что в группе животных с сахарным диабетом, по сравнению

с контрольной группой, определялось уменьшение размеров почечных телец с дистрофически измененными клетками наружной и внутренней стенок капсулы клубочка, отмечалось очаговое утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, расширение мезангия. При проведении морфометрического исследования определялось достоверное уменьшение площади почечных телец на 39 % по сравнению с контрольной группой. Площадь соединительной ткани сосудистого клубочка в почечном телеце достоверно уменьшается на 31 % пропорционально уменьшению площади почечного тельца. Относительная площадь соединительной ткани сосудистого клубочка у животных с сахарным диабетом достоверно увеличилась на 6 % (табл. 1).

При морфометрическом исследовании иммуногистохимических препаратов животных с сахарным диабетом было выявлено увеличение доли фибронектина и карбоксиметиллизина в почечных клубочках (рис. 3, 4) на 33,5 и 14 % соответственно по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2).

Таблица 1

### Морфометрические показатели почечных клубочков

Группы	Показатели		
	площадь почечного тельца, мкм <sup>2</sup>	площадь соединительной ткани сосудистого клубочка в почечном тельце, мкм <sup>2</sup>	относительная площадь соединительной ткани сосудистого клубочка
Контрольные животные	6267,4 ± 217,3	2979,7 ± 123,8*	47,5
Животные с сахарным диабетом	3842,7 ± 144,0	2055,364 ± 79,700*	53,5**

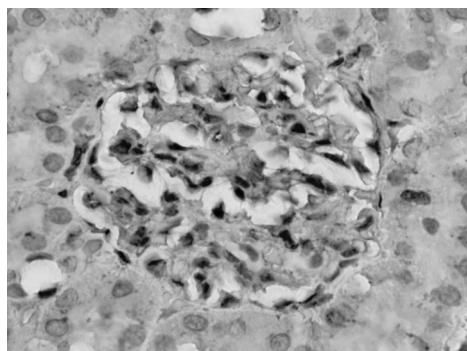
\*Данные достоверны по отношению к интактному контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,001$ ); \*\*данные достоверны по отношению к интактному контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,01$ ).

Таблица 2

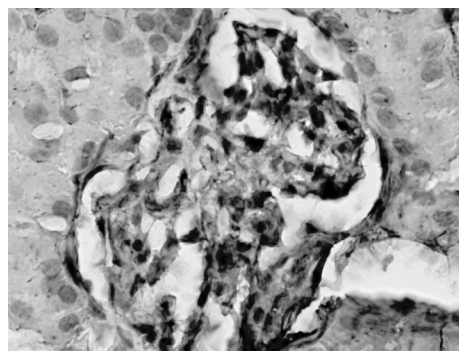
### Морфометрические показатели почечных клубочков при иммуногистохимическом исследовании

Группы	Показатели, мкм <sup>2</sup>	
	площадь иммунореактивного материала в почечном тельце контрольных животных	площадь иммунореактивного материала в почечном тельце животных с сахарным диабетом
Фибронектин	1251,8 ± 95,6	1879,8 ± 145,1*
Карбоксиметиллизин	791,4 ± 171,4	916,7 ± 157,1

\*Данные достоверны по отношению к интактному контролю, критерий Манна-Уитни ( $p < 0,001$ ).

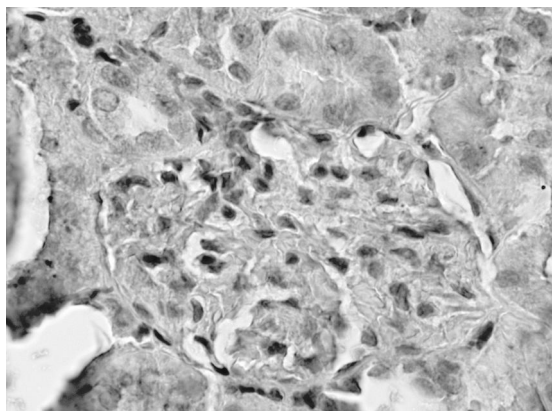


Контрольная группа

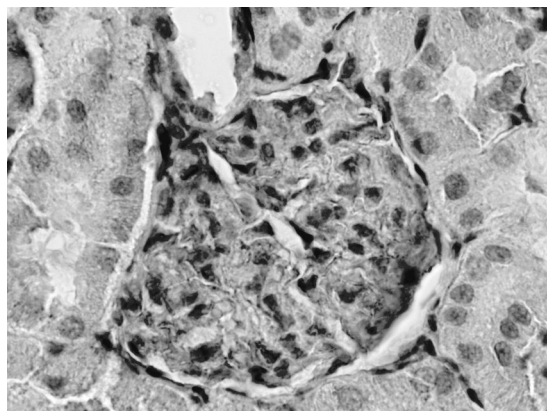


Группа с сахарным диабетом

Рис. 3. Экспрессия иммунореактивного материала с антителами к фибронектину, окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 400



Контрольная группа



Группа с сахарным диабетом

Рис. 4. Экспрессия иммунореактивного материала с антителами к карбоксиметиллизину, окраска гематоксилин-эозином. Ув. x 400

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при длительном течении стрептозотоциновой интоксикации у крыс формируются ранние проявления диабетической нефропатии. Воспроизведенная экспериментальная модель может быть использована для углубленного фармакологического изучения потенциальных средств профилактики диабетической нефропатии\*.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И. И., Шестакова М. В. и др. Сахарный диабет. Острые и хронические осложнения / Под ред. академика РАН и РАМН И. И. Дедова, профессора М. В. Шестаковой. — М.: «МИА», 2011. — 480 с.
2. Сласов А. А. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Часть первая, под ред. А. Н. Миронова. — М., 2012. — С. 670—684.
3. Сласов А. А., Воронкова М. П., Снигур Г. Л. и др. // Биомедицина. — 2011. — № 3. — С. 12—18.

4. Chilelli N. C., Burlina S., Lapolla A. // Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. — 2013. — Vol. 23 (10). — P. 913—910.
5. Etuk E. U. // Agric Biol J N Am. — 2010. — Vol. 1 (2). — P. 130—134.
6. Islam M. S., Wilson R. D. // Methods Mol Biol. — 2012. — Vol. 933. — P. 161—174.
7. Kumar S., Singh R., Vasudeva N., et al. // Cardiovascular Diabetology. — 2012. — Jun. — Vol. 19. — P. 11—19.
8. Vallon V. and Komers R. // Comprehensive Physiology — 2011. — Jul. — Vol. 1(3). — P. 1175—1232.
9. Vallon V., Thomson S. C. // Annu Rev Physiol. — 2012. — Vol. 74. — P. 351—375.
10. Ventura-Sobrevilla J., Boone-Villa V. D., Aguilar C. N., et al. // Proc West Pharmacol Soc. — 2011. — Vol. 54. — P. 5—9.

## Контактная информация

**Кузнецова Валентина Андреевна** — к. м. н., ассистент кафедры фармакологии, научный сотрудник лаборатории лекарственной безопасности НИИ фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: sysoeva\_va@mail.ru

\*Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00139).