

Патоморфологическая картина диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете

Светлана Олеговна Филинова¹, Александр Юрьевич Жариков^{1*},
Игорь Петрович Бобров², Олеся Николаевна Мазко²,
Олеся Геннадьевна Макарова²

¹Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул, Россия;

²Лаборатория биомедицины Центра медико-биологических исследований Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

Реферат

Цель. Провести морфологическое исследование почечного клубочка при экспериментальном сахарном диабете и изучить патоморфологические особенности развития диабетической нефропатии.

Методы. Исследование проведено на 25 самцах крыс сток Вистар. Моделирование сахарного диабета осуществляли посредством внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг. Для более селективного моделирования сахарного диабета 2-го типа крысам контрольной группы вводили предварительно внутрибрюшинно раствор цитофлавина из расчёта дозировки никотинамида 115 мг/кг. В группе сравнения аналогичным способом вводили 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. На 28-й день эксперимента животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом, извлекали почки, очищали и промывали изотоническим раствором натрия хлорида. Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. При помощи морфометрического метода исследования измеряли площадь почечных клубочков и площадь просветов капилляров, а после специальной компьютерной обработки цифровых фотографий оценивали суммарную площадь сосудистого русла в клубочке и площадь мезангия в почечном клубочке.

Результаты. После 4 нед эксперимента у крыс с сахарным диабетом развивались характерные изменения морфофункционального состояния почечных тканей: увеличение площади почечных клубочков, утолщение базальной мембраны капилляров клубочков, увеличение размеров подоцитов с уменьшением их количества, очаги нефросклероза.

Вывод. По итогам исследования зафиксированы характерные патоморфологические явления в почках крыс с экспериментальным сахарным диабетом, которые свидетельствуют о развитии диабетической нефропатии.

Ключевые слова: почки, диабетическая нефропатия, сахарный диабет, подоциты.

Для цитирования: Филинова С.О., Жариков А.Ю., Бобров И.П. и др. Патоморфологическая картина диабетической нефропатии при экспериментальном сахарном диабете. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (1): 147–152. DOI: 10.17816/KMJ2019-147.

Pathomorphological picture of diabetic nephropathy in experimental diabetes mellitus

S.O. Filinova¹, A.Yu. Zharikov¹, I.P. Bobrov², O.N. Mazko², O.G. Makarova²

¹Altai State Medical University, Barnaul, Russia;

²Laboratory of Biomedicine of the Centre of Biomedical Research of Altai State Medical University, Barnaul, Russia

Abstract

Aim. To conduct a morphological study of the renal glomerulus in experimental diabetes mellitus and to study the pathomorphological features of the development of diabetic nephropathy.

Methods. The study was carried out on 25 male Wistar rats. Modeling of diabetes mellitus was carried out by intraperitoneal injection of streptozotocin at a dose of 65 mg/kg. For more selective modeling of type 2 diabetes, the rats of the control group were intraperitoneally administered a solution of cytoflavin, calculated by the dosage of nicotinamide 115 mg/kg. In the comparison group 1 ml of physiological solution was administered in a similar manner. On day 28 of the experiment, the animals were euthanized under ether anesthesia, the kidneys were

extracted, purified and washed with physiological saline. The material was fixed in a 10% neutral formalin solution. Using the morphometric method, the area of the renal glomeruli and the area of the capillary lumens were measured, and after special computer processing of digital photographs, the total area of the vascular bed in the glomerulus and the area of mesangium in the renal glomerulus were estimated.

Results. After four weeks of experiment on rats with diabetes mellitus, some characteristic changes in the morphofunctional state of renal tissues developed: an increase of the area of renal glomeruli, thickening of the basement membrane of glomerular capillaries, an increase in the size of podocytes with a decrease of their number, and foci of nephrosclerosis.

Conclusion. Based on the results of the study, characteristic pathomorphological phenomena in the kidneys of rats with experimental diabetes mellitus were recorded, which indicate the development of diabetic nephropathy.

Keywords: kidneys, diabetic nephropathy, diabetes, podocytes.

For citation: Filinova S.O., Zharikov A.Yu., Bobrov I.P. et al. Pathomorphological picture of diabetic nephropathy in experimental diabetes mellitus. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (1): 147–152. DOI: 10.17816/KMJ2019-147.

Сахарный диабет (СД) — одно из наиболее распространённых системных заболеваний человека. [1]. Наибольшая опасность СД связана с его осложнениями, в частности с диабетической нефропатией (ДН), которая развивается приблизительно у 20,1% пациентов с СД 1-го типа и 6,3% пациентов с СД 2-го типа. По статистике ДН занимает 3-е место в ряду потенциально летальных осложнений СД [2, 3]. В этой связи высокую актуальность сохраняет вопрос поиска методов коррекции ДН, включая фармакологические подходы.

Традиционно для разработки целевых методов лекарственной коррекции патологии большое значение имеет выявление особенностей её патогенеза. На этом базируется поиск мишеней для фармакологической коррекции. Кроме того, это позволяет проводить оценку эффективности того или иного подхода к лечению ДН.

Сегодня установлено, что в патогенезе ДН ключевую роль играют гипергликемия и гиперглюкозурия, которые обуславливают ряд последовательных биохимических нарушений, приводящих к повреждению сосудистой стенки, гипертрофии почечных клубочков и развитию ДН [4].

В то же время особенности тканевых и клеточных процессов, происходящих непосредственно в почечных клубочках при ДН, изучены недостаточно полно, в связи с чем представляют значительный интерес. Подробное изучение и описание патоморфологической картины ДН позволит продвинуться в понимании особенностей протекания патологии, а также поспособствует повышению эффективности оценки новых разрабатываемых способов коррекции ДН.

Цель настоящего исследования — провести морфологическое исследование почечного клубочка при экспериментальном СД и изучить патоморфологические особенности развития ДН.

Эксперименты проведены на 25 самцах крыс сток Вистар в возрасте 2–3 мес с массой тела 270–300 г, которые на протяжении периода исследований находились в индивидуальных метаболических клетках, приспособленных для сбора мочи, в условиях свободного потребления воды и пищи. Исследования выполняли согласно принципам гуманности в соответствии с утверждёнными правилами лабораторной практики [5].

Животные были разделены на две группы: группу сравнения и контрольную группу по 12 и 13 особей соответственно. В исследование были включены животные, у которых уровень диуреза находился в диапазоне 2–10 мл [6]. В контрольной группе для моделирования СД крысам внутрибрюшинно однократно вводили 1 мл раствора стрептозотоцина в цитратном буфере из расчёта дозы 65 мг/кг. В соответствии с современными представлениями об особенностях моделирования СД при помощи стрептозотоцина для более селективного моделирования СД 2-го типа крысам контрольной группы вводили предварительно внутрибрюшинно раствор цитофлавина из расчёта дозировки никотинамида 115 мг/кг [7]. В группе сравнения аналогичным способом вводили 1 мл изотонического раствора натрия хлорида.

В день введения стрептозотоцина, а затем на 3-й, 7-й, 14-й, 21-й и 28-й дни эксперимента в обеих группах производили сбор суточного объёма мочи, в которой определяли концентрацию глюкозы, белка и креатинина. С учётом суточного объёма диуреза рассчитывали экскрецию глюкозы, белка и креатинина. Концентрацию глюкозы, белка и креатинина определяли на автоматическом биохимическом анализаторе DIRUICS-T240.

Концентрацию глюкозы оценивали методом ферментативного окисления глюкозы в присутствии глюкозооксидазы, который основан

на измерении оптической плотности окрашенного соединения хинонимина.

Для определения концентрации белка использовали биуретовый метод, основанный на образовании комплекса сине-фиолетового цвета с ионами меди, оптическая плотность которого прямо пропорциональна концентрации белка.

Концентрацию креатинина определяли кинетическим методом без депротеинизации, основанным на реакции Яффе образования красно-оранжевого окрашенного комплекса.

На 28-й день эксперимента животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом, извлекали почки, очищали и промывали изотоническим раствором натрия хлорида.

Материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Проводку материала осуществляли по изопропиловому спирту с помощью автомата проводки карусельного типа TISSUE-TEK VIPTM6 (Sakkura, Япония). Заливали материал в парафин при помощи станции парафиновой заливки TISSUE-TEK TEC 5 (Sakkura, Япония). Гистологические срезы толщиной 2–4 мкм получали с использованием полуавтоматического роторного микротомы Accu-Cut SRM (Sakkura, Япония).

В каждом препарате оценивали 20–25 клубочков. У каждого животного справа и слева забирали 3–4 препарата. Все препараты фотографировали цифровым фотоаппаратом при различных увеличениях, что позволяло достаточно полно визуализировать, на каком уровне расположены клубочки. Работали с клубочками, которые располагались на одном уровне и приближались к форме круга, с вытянутыми или деформированными клубочками не работали. Не работали также с клубочками, которые были порезаны поверхностно и имели слишком маленький размер, чтобы избежать влияния уровня среза.

Окрашивали гематоксилином и эозином в автомате для автоматической окраски микропрепаратов TISSUE-TEK Prisma (Sakkura, Япония). Также осуществляли гистохимические окраски на нейтральные гликозаминогликаны Шифф-реактивом по Мак-Манусу и на кислые гликозаминогликаны 1% раствором альцианового синего на 3% уксусной кислоте (pH=2,5) по Стивдену. Закрывали препараты под плёнку в аппарате для автоматического заключения микропрепаратов TISSUE-TEK Film (Sakkura, Япония).

Морфометрические исследования проводили с использованием специально созданной системы компьютерного анализа изображений,

состоящей из микроскопа Leica DME (Германия), цифровой камеры Leica EC3 (Leica Microsystems AG, Германия), персонального компьютера и программного обеспечения Видеотест-Морфология 5.2. При помощи морфометрического метода исследования измеряли площадь почечных клубочков и площадь просветов капилляров, а после специальной компьютерной обработки цифровых фотографий оценивали суммарную площадь сосудистого русла в клубочке и площадь мезангия в почечном клубочке.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием компьютерной программы Statistica 12.0. Результаты биохимических исследований мочи представлены медианой (M) и интерквартильным размахом (25%, 75%). Результаты морфометрических исследований представлены в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего (m). Статистические сравнения между группами проводили с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни, сравнения внутри группы относительно исходного уровня осуществляли с использованием непараметрического критерия Уилкоксона. Результаты признавали достоверными при значении показателя достоверности $p < 0,05$ [8].

Проведённые эксперименты показали, что после 4 нед моделирования экспериментального СД у крыс развивались характерные изменения морфофункционального состояния почечных тканей по сравнению с интактными животными.

Оказалось, что площадь почечных клубочков у крыс контрольной группы в 1,3 раза превышала показатель крыс группы сравнения: $7918,9 \pm 367,5$ против $6174,7 \pm 257,5$ мкм² ($p=0,0003$). При этом на фоне развивающегося СД в почечных клубочках было выявлено очаговое расширение межкапиллярного пространства за счёт накопления ШИК-положительного материала мезангия и незначительного увеличения количества мезангиальных клеток (рис. 1). Площадь мезангия в клубочках у крыс группы контроля возрастала в 1,4 раза и в среднем составляла $6823,45 \pm 225,75$ мкм², в то время как у интактных животных величина данного показателя была $4762,3 \pm 23,3$ мкм² ($p=0,01$).

Параллельно фиксировалось уменьшение в 1,9 раза средней суммарной площади сосудистого русла в клубочке у крыс с экспериментальным СД по сравнению с интактными животными: $2200,4 \pm 699,8$ мкм² у здоровых крыс против $1150,9 \pm 774,6$ мкм² в контроле заболевания ($p=0,045$; рис. 2). Средняя площадь

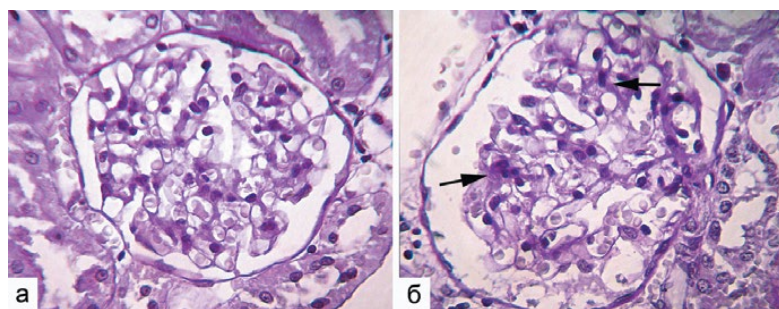


Рис. 1. Состояние мезангиума клубочков почки: а — intactные животные; б — животные контрольной группы: расширение межкапиллярного пространства за счёт накопления ШИК-положительного материала мезангия и сужение просвета капилляров (показано стрелками). Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу. Увеличение $\times 1200$

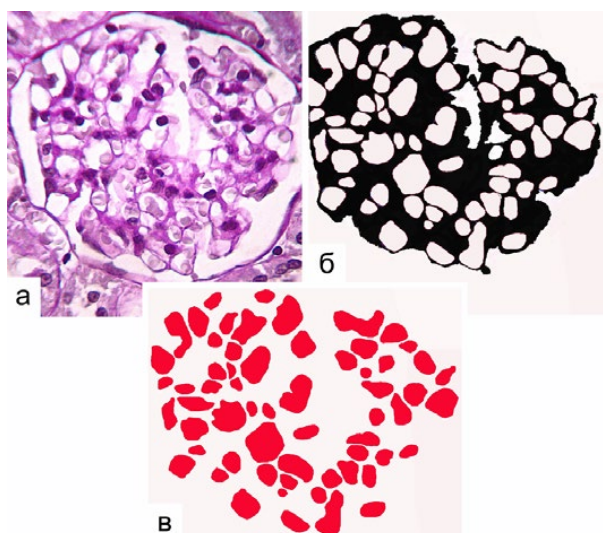


Рис. 2. Компьютерный анализ площади мезангиума и сосудов клубочка почки intactных крыс: а — клубочек почки; б — мезангиум клубочка почки intactных крыс; в — капилляры клубочка почки. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка. Увеличение $\times 1200$

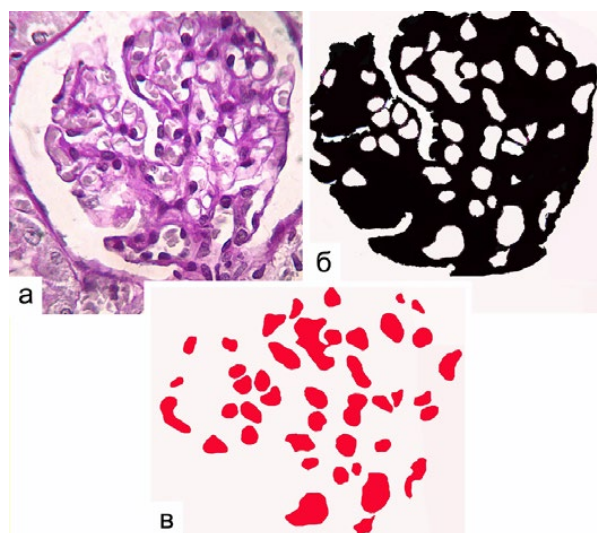


Рис. 3. Компьютерный анализ площади мезангиума и сосудов клубочка почки при экспериментальном сахарном диабете: а — клубочек почки; б — увеличение площади мезангиума клубочка; в — уменьшение площади просветов капилляров клубочка почки. Окраска ШИК-реактивом по Мак-Манусу и компьютерная обработка. Увеличение $\times 1200$

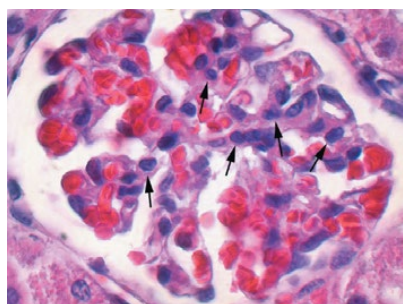


Рис. 4. В клубочках почек intactных животных подоциты небольшого размера и располагаются под эндотелием капилляров (отмечены стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1600$

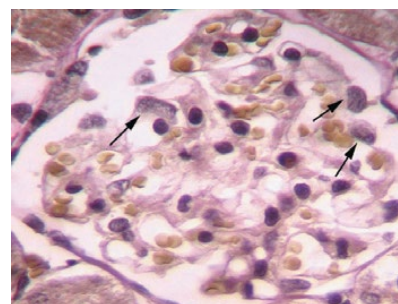


Рис. 5. В клубочках почек экспериментальных животных на фоне склеротических изменений количество подоцитов уменьшено, они большого размера с крупными ядрами (отмечены стрелками). Окраска по Ван-Гизону. Увеличение $\times 1600$

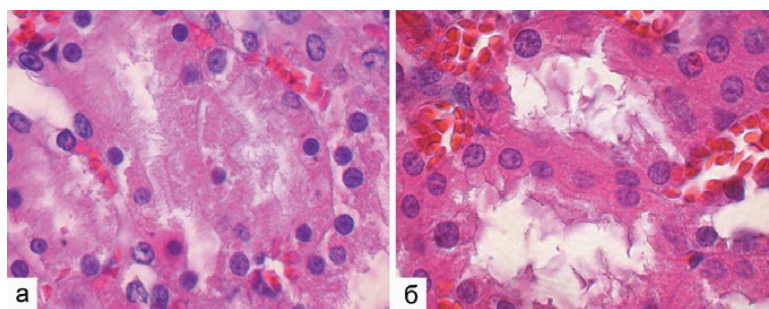


Рис. 6. Нефроциты канальцев почки: а — сохранение щёточной каёмки у интактных животных; б — разрушение щёточной каёмки нефроцитов, явления гиалиново-капельной дистрофии и выход белка в просвет канальцев у животных экспериментальной группы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1000$

1 капилляра в клубочке при экспериментальном СД (рис. 3) также уступала уровню интактных крыс на 18,5%, составляя $33,8 \pm 3,7$ мкм² ($p=0,05$).

Базальные мембраны капилляров клубочков были утолщены, просвет капилляров сужен. Капсула клубочков почки выглядела утолщённой. Присутствовали синехии между париетальным листком капсулы и капиллярными петлями. Подоциты были увеличены в размерах, набухшие, с увеличенными ядрами, количество подоцитов при экспериментальном СД уменьшалось в 2,1 раза (рис. 4 и 5). В контрольной группе среднее число подоцитов в клубочке составило $4,9 \pm 0,4$, а в группе сравнения — $10,2 \pm 0,2$ ($p=0,00002$).

В интерстиции почки крыс контрольной группы встречались очаги нефросклероза, где были видны утолщённые тубулярные базальные мембраны. В этих участках нефроциты канальцев были уплощены, просвет канальцев расширен. Большинство нефроцитов находилось в состоянии гиалиново-капельной дистрофии. Определялись участки деструкции щёточной каёмки (рис. 6).

Результаты биохимических исследований мочи крыс показали, что в контрольной группе величина диуреза у крыс увеличилась к концу 4-й недели эксперимента относительно исходного уровня в 2,0 раза с 7,4 (5,4; 8,5) до 15,0 (8,0; 18,0) мл/сут ($p=0,0097$), что было в 2,7 раза больше, чем в группе сравнения: 5,5 (2,3; 7,5) мл/сут ($p=0,0021$). При этом уровень диуреза в группе сравнения в течение 4 нед оставался стабильным.

Уровень экскреции глюкозы с мочой в контрольной группе к моменту завершения опыта превышал исходные значения в 4,8 раза: 8,7 (4,7; 20,9) и 1,8 (1,6; 2,0) мкмоль/сут соответственно ($p=0,00187$). По сравнению с интактными

крысами величина глюкозурии на 28-й день была больше в 3,2 раза: 8,7 (4,7; 20,9) и 2,7 (1,6; 3,4) мкмоль/сут соответственно ($p=0,00055$).

Экскреция белка в контрольной группе также увеличилась в 1,6 раза относительно исходного уровня к моменту окончания эксперимента: с 11,5 (10,3; 13,4) до 18,0 (13,3; 31,2) мг/сут, превышая уровень крыс группы сравнения [12,3 (8,1; 14,2) мг/сут] в 1,5 раза ($p=0,024$).

Таким образом, результаты биохимических исследований мочи подтверждают развитие глюкозурии и протеинурии, что свидетельствует о развитии экспериментального СД и повреждении почечного клубочка.

В результате проведённых экспериментов получена чёткая патоморфологическая картина повреждения почек при СД. По современным представлениям, важную роль в развитии нефропатии играет нарушение структуры и функций подоцитов [9–11]. Как известно, эти клетки определяют нормальное функционирование фильтрационного барьера в клубочке. Их «ножки» покрывают капилляры, оставляя поры, через которые фильтруется плазма крови, но не проходят белки и форменные элементы крови. В нашем исследовании было зафиксировано 2-кратное снижение количества подоцитов при сопутствующем увеличении их размера. Вероятно, это могло привести к существенному увеличению проницаемости фильтрационного барьера для белков и других крупномолекулярных соединений.

На этом фоне увеличение площади мезангия и снижение площади сосудистого русла указывают на ослабление кровотока в клубочке. Однако в то же время увеличение площади почечных клубочков свидетельствовало о повышении общей скорости клубочковой фильтрации.

Дополняют картину патологических изменений в почках при экспериментальном СД

явления нефросклероза, гиалиново-капельной дистрофии нефроцитов и очаговой деструкции щёточной каёмки нефроцитов, которые сопровождались выходом белка в просвет канальца, зафиксированного в ходе эксперимента.

Суммируя вышеизложенное, отметим, что по итогам исследования зафиксированы характерные патоморфологические явления в почках крыс с экспериментальным СД, которые свидетельствуют о развитии ДН.

ВЫВОД

При экспериментальном сахарном диабете у крыс появляются характерные морфологические признаки развития диабетической нефропатии: увеличение размера почечных клубочков, уменьшение количества подоцитов, расширение межклубочкового пространства и мезангия, уменьшение количества, площади просветов и средней суммарной площади капилляров в клубочках.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Ogurtsova K., da Rocha Fernandes J.D., Huang Y. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2017; (128): 40–50. DOI: 10.1016/j.diabres.2017.03.024.
- Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К. Эпидемиология сахарного диабета в Российской Федерации: клинико-статистический анализ по данным федерального регистра сахарного диабета. *Сахарный диабет.* 2017; 20 (1): 13–41. [Dedov I.I., Shestakova M.V., Vikulova O.K. Epidemiology of diabetes mellitus in Russian Federation: clinical and statistical report according to the federal diabetes registry. *Sakharnyy diabet.* 2017; 20 (1): 13–41. (In Russ.)] DOI: 10.14341/DM8664.
- Fouli G.E., Gnudi L. The future: Experimental therapies for renal disease in diabetes. *Nephron.* 2018; (26): 1–5. DOI: 10.1159/000492825.
- Diamond J. Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis. *Kidney Int.* 1988; (33): 917–924. DOI: 10.1038/ki.1988.87.
- Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. №708н «Об утверждении правил лабораторной практики». <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12079613/> (дата обращения: 28.09.2018). [Order of the Ministry of Healthcare RF issued on August, 23, 2010 №708n «About the introduction of the rules of laboratory practice». <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/12079613/> (access date: 28.09.2018). (In Russ.)]
- Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Лампатов В.В., Жариков А.Ю. Методические подходы к изучению функции почек в эксперименте на животных. *Нефрология.* 2009; 13 (3): 52–62. [Bryukhanov V.M., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Zharikov A.Yu. Methodical approaches to the study of kidney function in an animal experiment. *Nephrology.* 2009; 13 (3): 52–62. (In Russ.)] DOI: 10.24884/1561-6274-2009-13-3-52-62.
- Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л. и др. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. *Биомедицина.* 2011; (3): 12–18. [Spasov A.A., Voronkova M.P., Snigur G.L. et al. Experimental model of type 2 diabetes mellitus. *Biomeditsina.* 2011; (3): 12–18. (In Russ.)]
- Хафизьянова Р.Х., Бурыкин И.М., Алеева Г.Н. *Математическая статистика в экспериментальной и клинической фармакологии.* Казань: Медицина. 2006: 374 с. [Khafizyanova R.Kh., Burikin I.M., Aleeva G.N. *Matematicheskaya statistika v eksperimental'noy i klinicheskoy farmakologii.* (Mathematical statistics in experimental and clinical pharmacology.) Kazan: Meditsina. 2006: 374 p. (In Russ.)]
- Бобкова И.Н., Шестакова М.В., Щукина А.А. Диабетическая нефропатия — фокус на повреждение подоцитов. *Нефрология.* 2015; 19 (2): 33–43. [Bobkova I.N., Shestakova M.V., Shchukina A.A. Diabetic nephropathy — focus on podocytes damage. *Nefrologiya.* 2015; 19 (2): 33–43. (In Russ.)]
- Fiorina P., Vergani A., Bassi R. et al. Role of podocyte B7-1 in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2014; 25 (7): 1415–1429. DOI: 10.1681/ASN.2013050518.
- Kim N.H. Podocyte hypertrophy in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton).* 2005; (10): 14–16. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2005.00450.x.