

ВЛИЯНИЕ КРАТКОСРОЧНОЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ИНСУЛИНОТЕРАПИИ НА КОНЦЕНТРАЦИЮ VEGF-A ФАКТОРА ВО ВНУТРИГЛАЗНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ АЛЛОКСАНОВОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА У КРЫС*

**Н.П. Паштаев^{1,2,3}, Н.А. Поздеева^{1,2}, И.В. Мадьянов², Г.С. Школьник¹,
Б.В. Гаглоев¹, Д.С. Крестов², А.А. Максимов²**

¹Чебоксарский филиал ФГАУ НМИЦ МНТК «Микрохирургия глаза им. акад. С.Н. Федорова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации;

²ГАУ ЧР «Институт усовершенствования врачей»;

³ФГБУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова»

Исследование проведено на 80 беспородных крысах, которым вызывали диабет инъекцией аллоксана моногидрата. Экспериментальных животных разделили на 2 группы. В основной группе была начата заместительная инсулино-терапия, в контрольной группе животные не получали специфической терапии. После трехдневной инсулинотерапии экспериментальные животные из обеих групп были выведены из исследования для получения внутриглазных жидкостей, в которых была определена концентрация VEGF-A. Мы не выявили достоверного снижения концентрации VEGF-A во внутриглазной жидкости между группами.

Ключевые слова: модель сахарного диабета, аллоксан, диабетическая ретинопатия, VEGF-A, гипергликемия, инсулин.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-4(68)-25-27

INFLUENCE OF SHORT-TERM INSULIN THERAPY ON CONCENTRATION OF VEGF-A FACTOR IN INTRAOCULAR LIQUID IN CASE OF DIABETES ALLOXAN MODEL IN RATS

**N.P. Pashtaev^{1, 2, 3}, N.A. Pozdeyeva^{1, 2}, I.V. Madyanov², G.S. Shkolnik¹,
B.V. Gagloev¹, D.S. Krestov², A.A. Maksimov²**

¹Cheboksary Branch of FSAI NMRC ISTC «Eye Microsurgery named after academician S.N. Fedorov»
of Public Health Ministry of the Russian Federation;

²SAI CR «Institute of improvement of doctors»;

³FSBI HPE «The Chuvash State University named after I. N. Ulianov»

Experiment was carried out on 80 mongrel rats in which diabetes was called forth by alloxan monohydrate injection. Experimental animals were divided into 2 groups. In the main group substitutional insulin therapy was begun, in control group animals didn't receive special therapy. In 3 days of insulin therapy experimental animals of both the groups were excluded from investigation for intraocular liquids to be taken in which VEGF-A concentration was determined. We didn't reveal reliable decrease of VEGF-A concentration in intraocular liquid between the groups.

Key words: diabetes model, alloxan, daibetic retinopathy, VEGF-A, hyperglycemia, insulin.

В настоящее время сахарный диабет занимает третье место среди непосредственных причин смерти. По прогнозам Международной диабетической федерации (IDF), к 2030 г. численность больных сахарным диабетом превысит 550 млн. [5]. В Российской Федерации, по данным Государственного регистра на 2013 год, насчитывается около 4 млн человек, страдающих сахарным диабетом.

Главная роль в патогенезе диабетической ретинопатии отводится гипергликемии. Экспериментальные работы показали, что глюкоза в высоких концентрациях оказывает патологическое воздействие на микроциркуляторное русло органов-мишеней, приводя к ишемии [4]. В ряде исследований было доказано, что коррекция ги-

пергликемии и достижение целевых значений гликозилированного гемоглобина приводят к значительному снижению риска развития микрососудистых осложнений [6].

Одним из органов-мишеней сахарного диабета является сетчатка. Диабетическая ретинопатия является одной из ведущих причин слепоты среди лиц трудоспособного возраста. В основе патогенеза диабетической ретинопатии лежит ишемия, развивающаяся из-за окклюзии микрососудистого русла сетчатки. Увеличение площади ишемии повышает выработку VEGF выше критического уровня, что приводит к развитию основных клинических проявлений диабетической ретинопатии – макулярного отека и неоваскуляризации [3].

*Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-315-00029\18.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить влияние краткосрочной инсулинотерапии на концентрацию VEGF-A во внутриглазной жидкости при сахарном диабете

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского общества и Хельсинкской декларации, в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Для моделирования сахарного диабета были использованы 80 беспородных крыс со средней массой тела ($204 \pm 78,67$) г. Животных содержали в индивидуальных клетках на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде в условиях вивария. Всем 80 крысам диабет вызывали однократным внутрибрюшинным введением аллоксана гидрата (La Chema, Чехия) в дозе 170 мг/кг в 0,4 мл раствора цитратного буфера. Выбор внутрибрюшинного способа введения аллоксана основывался на легкости выполнения процедуры и малой травматичности для животных. При планировании эксперимента также учитывали, что диабетогенное действие аллоксана более активно проявляется у животных, находящихся на предварительной диете, поэтому все животные в течение 24 часов до начала эксперимента не получали пищу, но имели доступ к воде.

Аллоксановая модель сахарного диабета является одной из самых распространенных и изученных. Она активно применяется исследователями по всему миру. Аллоксан является структурным аналогом глюкозы, за счет чего он накапливается в В-клетках поджелудочной железы и приводит к их гибели с последующим развитием диабета. Поражению В-клеток сопутствуют дегенеративные изменения в почках и печени, что обуславливает высокую смертность лабораторных животных в первые сутки после введения аллоксана [1].

Через 3 дня после введения аллоксана моногидрата погибло 19 крыс. В исследовании осталось 61 экспериментальное животное. Для установления диабетического статуса осуществляли контроль концентрации глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены через хвостовой разрез.

При планировании дизайна эксперимента мы учитывали трехфазную реакцию организма на введение подопытным животным аллоксана моногидрата. Она заключается в первоначальном повышении уровня сахара крови, достигающем максимума через 2–4 часа после введения препарата, которая сменяется фазой гипогликемии продолжительностью 15–20 часов. Установление диабетического статуса и старт инсулинотерапии проводили через 72 часа после внутрибрюшинного введения аллоксана моногидрата.

Далее экспериментальных животных разделили на 2 группы. В основной группе крысам ($n = 30$) было начато ежедневное однократное внутрибрюшинное введение инсулина продленного действия в терапевтичес-

кой дозе 0,9 Ед/кг массы тела. В контрольной группе ($n = 31$) животные не получали специфической терапии. После трехдневной инсулинотерапии экспериментальные животные из обеих групп были выведены из исследования путем декапитации.

Из обоих глаз каждого животного были получены внутриглазные жидкости, в которых методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы «ELISA Kit for Vascular Endothelial Growth Factor A» (Cloud-Clone Corp, США) в лабораторных условиях была определена концентрация VEGF-A.

Статистическую обработку полученных цифровых данных и выявление их статистической значимости проводили в программе Statistica 10 параметрическим методом при помощи t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе ($n = 14$) концентрация VEGF-A во внутриглазной жидкости составила ($90,79 \pm 10,83$) мкг (71–110 мкг), в основной группе – ($87,0 \pm 10,63$) мкг (62–100 мкг) (рис.). Различия между средними значениями концентраций VEGF-A между группами статистически недостоверно ($p = 0,33$).

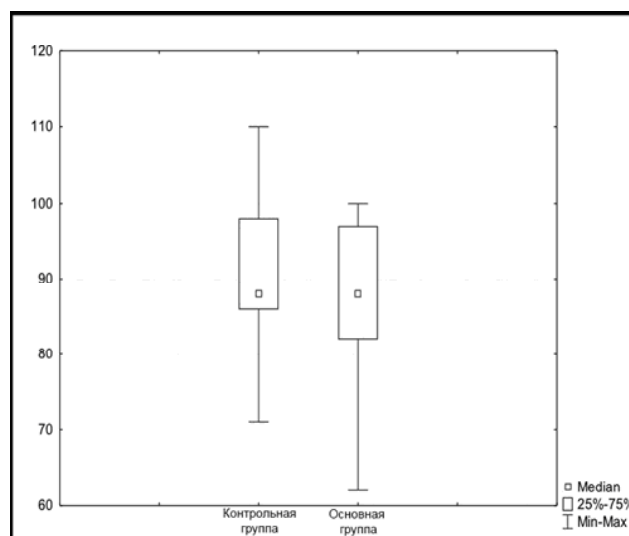


Рис. Концентрация VEGF-A во внутриглазной жидкости в контрольной и основной группах

Индивидуальная чувствительность к аллоксану животных одного и того же вида варьирует в очень широких пределах. Причины различной чувствительности в ответ на введение диабетогенных доз аллоксана определяются большим количеством факторов, в том числе возрастом, полом, состоянием нервной и эндокринной систем, характером обмена веществ, состоянием внутренних органов. В качестве примера можно привести работу А. А. Пальчиковой с соавторами, в которой исследовали гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозоциновой моделей сахарного диабета у крыс. Авторы выявили высокую

индивидуальную гетерогенность животных по реакции на введение аллоксана уже в первые сутки после введения препарата. За первые 5 суток исследования на фоне постепенного отказа от потребления воды и экскреции мочи погибли 31 % подопытных животных [2].

Высокая смертность лабораторных животных является ещё одним недостатком данной модели сахарного диабета, с которой мы столкнулись во время проведения эксперимента. Так, через 3 дня после внутрибрюшинного введения аллоксана моногидрата смертность лабораторных животных составила 24 % (19 крыс), через 6 дней – 58 % (46 крыс).

Также высокой смертности, по нашему мнению, могло способствовать большое число животных с низкой массой тела, использованных в исследовании. Низкая масса тела может свидетельствовать о недостаточной зрелости животного и соответственно приводить к более выраженной токсической реакции на введение аллоксана. Эти факторы должны учитываться при подборе вводимой дозы аллоксана в сторону ее уменьшения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инсулинотерапия на ранних сроках ее начала не приводит к снижению уровня VEGF-A во внутриглазной жидкости крыс. Необходимо проведение эксперимента на модели хронического сахарного диабета с более длительным сроком наблюдения и инсулинотерапии на половозрелых крысах массой не менее 250 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баранов В.Г., Соколоверова И.М., Гаспарян Э.Г. Экспериментальный сахарный диабет. Роль в клинической диабетологии. – Л.: Наука, 1983. – 240 с.
2. Пальчикова А.А., Кузнецова Н.В., Кузьминова О.И., Селятицкая В.Г. Гормонально-биохимические особенности аллоксановой и стрептозоциновой моделей экспериментального диабета // Бюллетень СО РАМН. – 2013. – Т. 33, № 6. – С. 18–24.
3. Chiarelli F., Santilli F., Mohn A. Role of growth factors in the development of diabetic complications // *Horm. Res.* – 2000. – Vol. 53, № 2. – P. 53–67.

4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352, № 9131. – P. 837–853.

5. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas [Electronic resource]. – 4th ed. – Brussels, Belgium: International Diabetes Federation Executive Office, 2009. URL: <http://www.diabetesatlas.org>.

6. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group // *N. Engl. J. Med.* – 1993. – Vol. 329, № 14. – P. 977–986.

REFERENCES

1. Baranov V.G., Sokoloverova I.M., Gasparyan E.G. Eksperimental'nyi sakharnyi diabet. Rol' v klinicheskoi diabetologii [Experimental diabetes. Role in clinical diabetology]. Leningrad: Nauka, 1983. 240 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Pal'chikova A.A., Kuznetsova N.V., Kuz'minova O.I., Selyatitskaya V.G. Gormonal'no-biokhimicheskie osobennosti alloksanovoi i streptozotsinovoi modelei eksperimental'nogo diabeta [Hormonal and biochemical features of the alloxan and streptozocin models of experimental diabetes]. *Byulleten' SO RAMN [Bulletin of the SB RAMS]*. 2013, no. 6 (55), pp. 18–24. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Chiarelli F., Santilli F., Mohn A. Role of growth factors in the development of diabetic complications. *Horm. Res.*, 2000, no. 2 (53), pp. 53–67.
4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*, 1998, Vol. 352, № 9131, pp. 837–853.
5. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 4th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation Executive Office, 2009. Available at: <http://www.diabetesatlas.org>.
6. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N. Engl. J. Med.*, 1993, no. 14 (329), pp. 977–986.

Контактная информация

Паштаев Николай Петрович – д. м. н., профессор, директор Чебоксарского филиала ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова», e-mail: pr@mntkcheb.ru