



Разработка модели нефролитиаза у крыс и кроликов



GLP-PLANET



Rus-LASA

Научный сотрудник отдела специфической
токсикологии и фармакодинамики
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

Каранина Варвара Дмитриевна

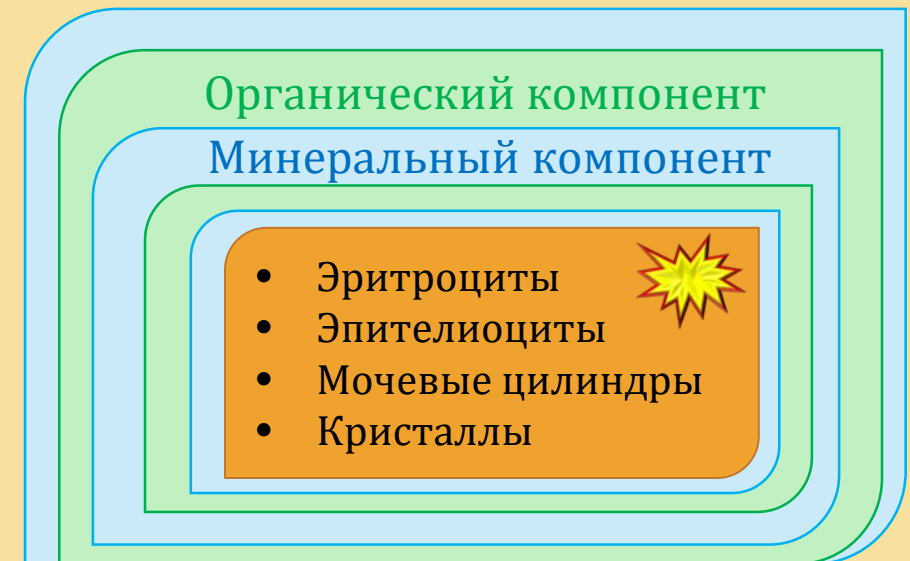
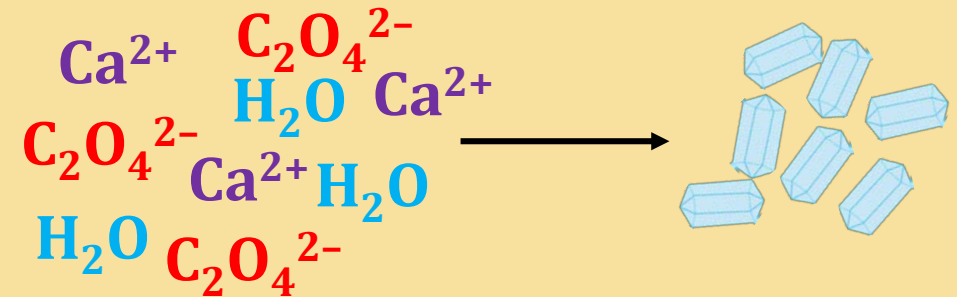
Этапы образования камней

1. Кристаллизация

В перенасыщенной моче ионы кальция объединяются с ионами оксалата в нерастворимые кристаллы оксалата кальция, которые в моче существуют в виде моно- или дигридата оксалата кальция.

2. Формирование ядра

Камни образуются на центрах гетерогенной нуклеации: эритроцитах, эпителиальных клетках, мочевых цилиндрах и уже существующих камнях. На такой центр наслаиваются органические (мукополисахариды, липиды клеточных мембран...) и минеральные компоненты камней (Alelign T., 2018).



Этапы образования камней

3. Рост и агрегация кристаллов

Рост кристаллов медленный, как правило, не приводит к обструкции канала и задержке мочи. Агрегация происходит путем вязкого связывания кристаллов оксалата кальция с выступающими в роли клея органическими молекулами – промоторами камнеобразования.

4. Взаимодействие кристалла с клеткой

Прикрепление кристалла к мембране, его эндоцитоз, разложение в лизосомах или транспортировка в интерстиций. Оксалатные камни в почках могут формироваться в просвете канальцев и на поверхности почечных сосочков, прикрепляясь к субэпителиальным отложениям фосфата кальция и минерализованного коллагена, т.н. бляшкам Рэндалла (Alelign T, 2018; Khan S.R., 1992).

Ингибиторы камнеобразования

- Остеопонтин
- Бикунин
- Фрагмент 1 протромбина
- Нефрокальцин
- и другие...

Промоторы камнеобразования

- Белок Тамма-Хорсфалла (low sialic acid form)
- Аннексин
- Гиалуроновая кислота
- Коллаген и другие...

Места кристаллизации

- Просвет канальцев
- Почечные сосочки
- и другие...

Точные механизмы
до конца не выяснены

Актуальность

Разработка современных **методов лечения и профилактики** МКБ являются актуальными проблемами медицинской науки. Наличие **неизвестных механизмов в патогенезе** образования камней и не до конца выясненная роль протеинов в регуляции этого процесса осложняют разработку лекарственных препаратов для лечения и профилактики МКБ. Именно для этого необходимо разработать адекватные и воспроизводимые **экспериментальные модели** (Жариков А.Ю., 2008; Tzou D.T., 2016).

Существующие способы моделирования МКБ

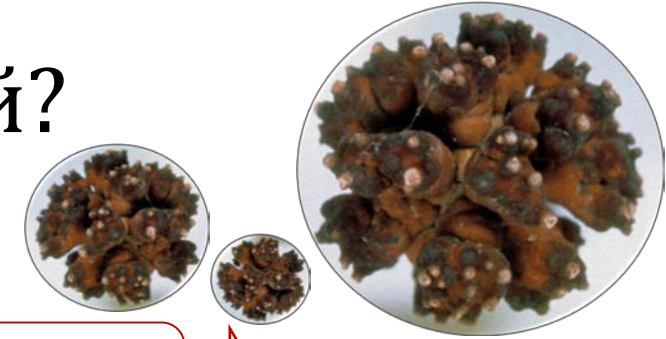
- Выбор предрасположенных пород/линий
 - Крысы Sprague-Dawley с генетически обусловленным гиперкальциурическим камнеобразованием
- Консервативные
 - Введение крысам и кроликам литогенных веществ: этиленгликоль (ЭГ), оксалат, гликолевая кислота, гидроксид-L-пролин (Khan S.R., 1992)
- Манипуляции с диетой
 - Создание дефицита магния и/или витамина B6 в рационе крыс (Tzou D.T., 2016)
- Хирургические
 - Временная обструкция мочеточников у кроликов (Itatani H., 1979)
 - Резекция кишечника у крыс для усиления абсорбции оксалата (Worcester E.M., 2005)

Как ЭГ приводит к образованию камней?

Биотрансформация этиленгликоля в печени



Источник изображения: Tumblr



Цель

Изучение эффективности (возможности) моделирования нефролитиаза с помощью этиленгликоля с оценкой воспроизводимости моделей на кроликах и крысах

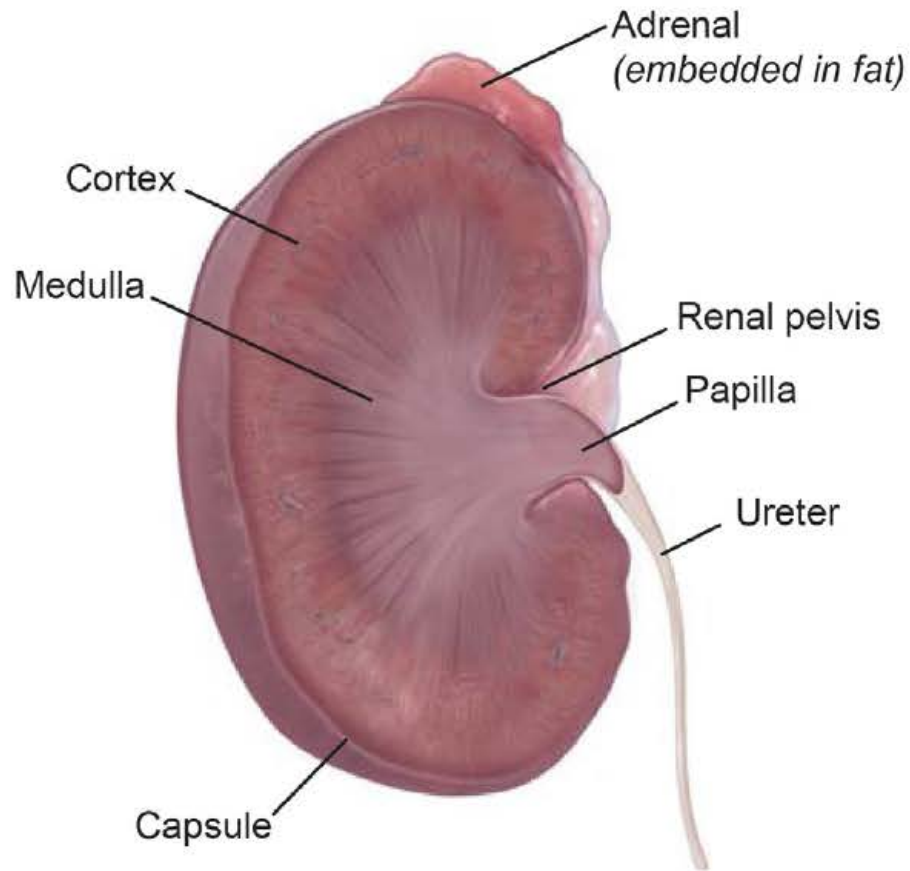
Работа выполнена на базе АО НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ». Эксперимент был одобрен на заседании биоэтической комиссии, заключение № 3.52/19.



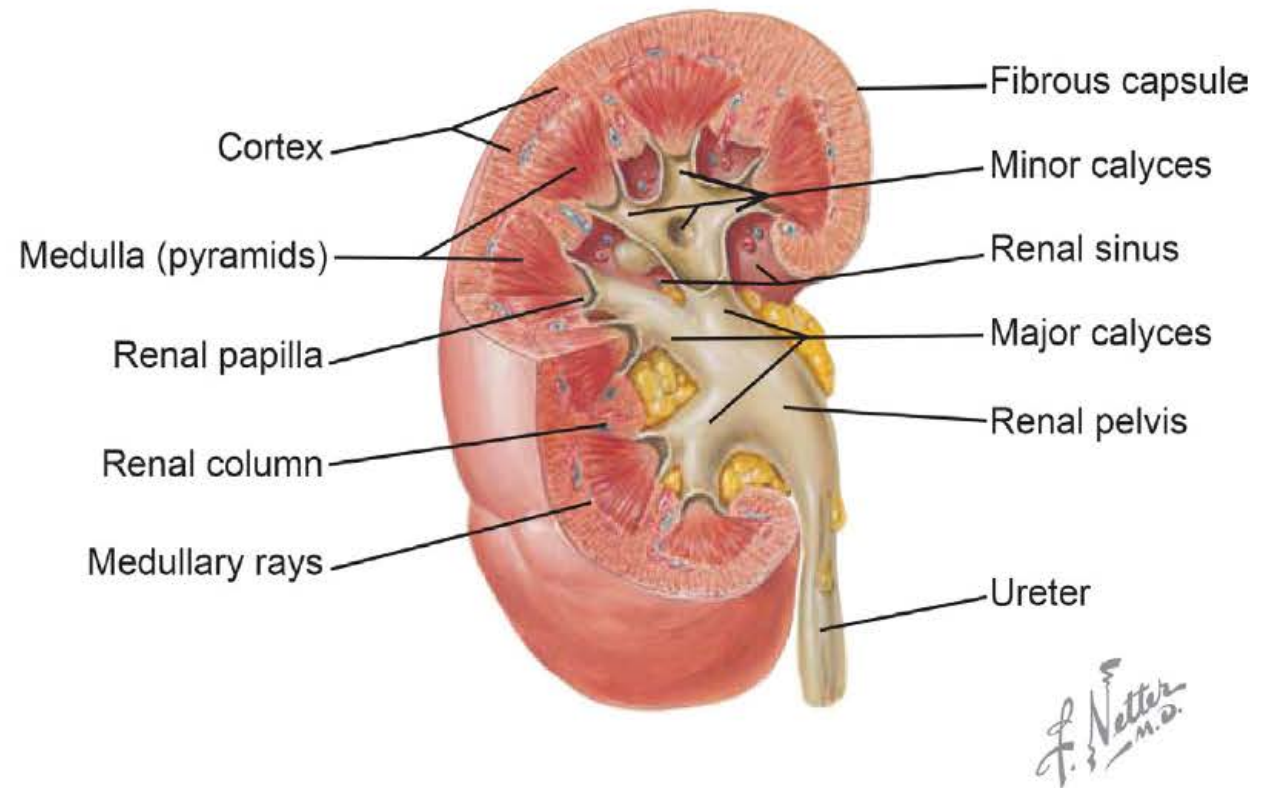
Материалы и методы – тест-система

Анатомические различия по сравнению с человеком

У крыс и кроликов почка **однопапиллярная**



У человека почка **мультипапиллярная**



Источник изображения: Elsevier, Inc., www.netterimages.com

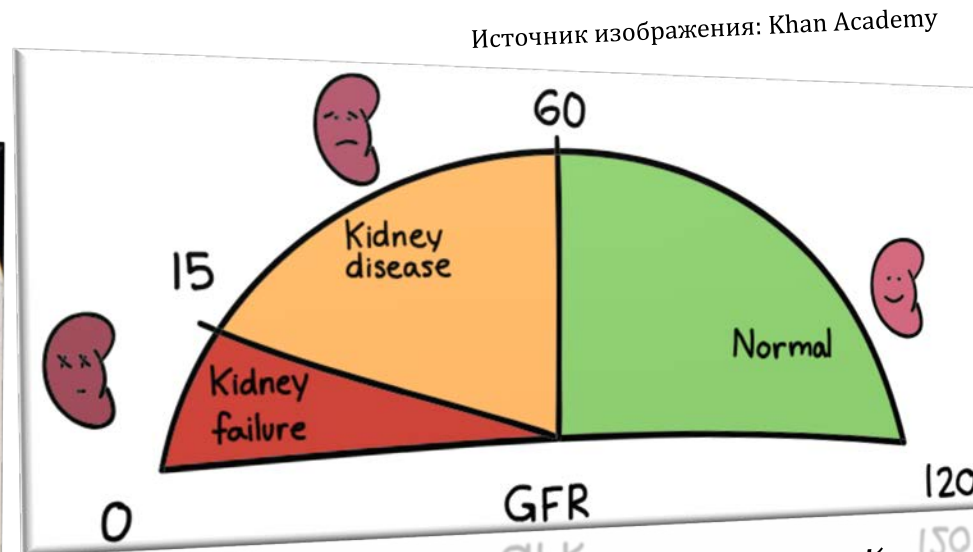
Материалы и методы – тест-система

Сходные клинические и патоморфологические признаки

При нефролитолизе у людей и у крыс отмечено сходство патоморфологических признаков. Кроме того, МКБ у кроликов, крыс и людей вызывает аналогичные изменения показателей обмена (Жариков А.Ю., 2008; Tzou D.T., 2016; Quesenberry K.E., 2012)



Кристаллурия



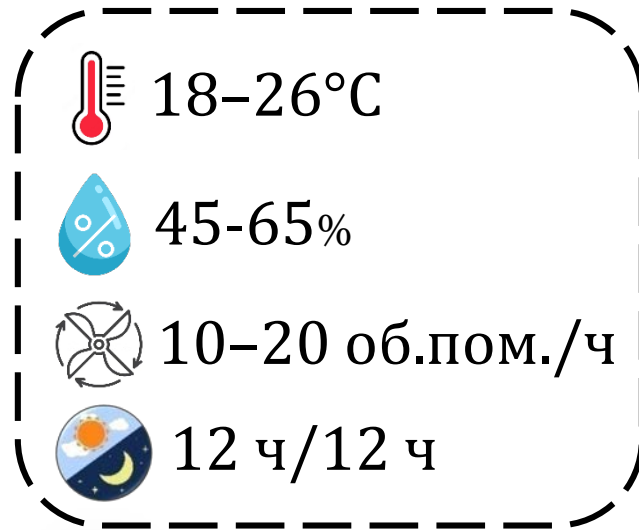
Снижение скорости клубочковой фильтрации (GFR)



Боль, угнетение

Материалы и методы – тест-система

- Крысы Wistar
- 40 самцов
- 200-220 г



- Кролики Советская шиншилла
- 32 самца
- 2,5-3 кг



Материалы и методы – индукция патологии

Введение крысам и кроликам этиленгликоля (ЭГ) с питьевой водой ad libitum при помощи поилки в течение 28 дней в следующих концентрациях:

Тест-система		<i>Крысы</i>	<i>Кролики</i>
Кол-во животных в группе		20	16
Концентрация ЭГ, Длительность введения	Группа №1	1% ЭГ, 28 дней	1,5% ЭГ, 28 дней
	Группа №2	1,5% ЭГ, 9 дней	4% ЭГ, 13 дней



Исследование мочи у крыс

Общий анализ

- 1) Суточный диурез
- 2) Отношение потребленного ЭГ к объему суточной мочи
- 3) Билирубин
- 4) Уробилиноген
- 5) Кетоновые тела
- 6) Аскорбиновая кислота
- 7) Глюкоза
- 8) Белок
- 9) Нитриты
- 10) pH
- 11) Относительная плотность
- 12) Эритроциты
- 13) Лейкоциты

Микроскопия осадка

- 1) Эпителий
- 2) Лейкоциты
- 3) Эритроциты
- 4) Цилиндры
- 5) Слизь
- 6) Соли
- 7) Бактерии

Клинически значимые изменения отмечены по показателям:

- ✓ Глюкоза
- ✓ Эритроциты
- ✓ Лейкоциты
- ✓ Соли



Исследование мочи у крыс

Балльная оценка микроскопии мочи

Значения в поле зрения (п.з.)

Исследуемые показатели	0 баллов	0,5 баллов	1 балл	2 балла	3 балла	4 балла
Эпителий	<i>нет</i>	<i>единичные</i>	<i>3–10</i>	<i>11–30</i>	–	–
Лейкоциты	<i>нет</i>	<i>единичные</i>	<i>3–10</i>	<i>11–30</i>	<i>31–50</i>	<i>более 50</i>
Эритроциты	<i>нет</i>	<i>единичные</i>	<i>2–5</i>	<i>6–15</i>	<i>16–30</i>	<i>более 30</i>
Цилиндры	<i>нет</i>	–	<i>есть</i>	–	–	–
Слизь	<i>нет</i>	–	<i>есть</i>	–	–	–
Соли	<i>нет</i>	–	<i>единичные</i>	<i>до 20% п.з.</i>	<i>до 50% п.з.</i>	<i>до 100% п.з.</i>
Бактерии	<i>нет</i>	–	<i>есть</i>	–	–	–

Клинически значимые изменения показателей мочи

Исследуемые показатели	ЭГ 1% в течение 28 дней			ЭГ 1,5% в течение 9 дней		
	Фон	N-й день	43-й день	Фон	N-й день	43-й день
Глюкоза, мг/дл	0,0 (0,0; 0,0)	50,0 (0,0; 500,0) [29-й] ■	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	50,0 (0,0; 50,0) [29-й]	0,0 (0,0; 0,0)
Лейкоциты, баллы	0,0 (0,0; 0,0)	1,0 (0,5; 1,0) [29-й] ■	0,0 (0,0; 0,3)	0,0 (0,0; 0,5)	1,0 (1,0; 2,0) [9-й] ■	0,0 (0,0; 0,3)
Эритроциты, баллы	0,0 (0,0; 0,5)	0,5 (0,0; 1,0) [29-й] ■	0,0 (0,0; 0,5)	0,0 (0,0; 0,5)	1,0 (0,5; 1,0) [9-й] ■	0,3 (0,0; 0,5)
Соли, баллы	1,0(1,0;1,0)	2,0 (1,0;2,0) [15-й] ■	1,0 (1,0;1,0)	0,0(0,0;1,0)	1,0(1,0;1,0) [15-й]	1,0 (1,0;1,5)

Me (Q1;Q3)

■ Различия статистически значимы по сравнению с фоном в соответствующей группе (t-критерий Стьюдента для зависимых переменных $p < 0,05$);

■ Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 1,5% ЭГ, в соответствующий день (t-критерий Стьюдента для независимых переменных $p < 0,05$)

Клинически значимые изменения показателей мочи

Биохимический анализ

Исследуемые показатели	ЭГ 1% в течение 28 дней			ЭГ 1,5% в течение 9 дней		
	Фон	N-й день	43-й день	Фон	N-й день	43-й день
Креатинин, мкмоль/л	7335±983	1891±187 [29-й]	3338±249	7181±1028	1784±229 [15-й]	5971±1447
Мочевина, ммоль/л	767±94	270±16 [29-й]	325±29	717±89	259±18 [15-й]	479±131

M±SEM

Различия статистически значимы по сравнению с фоном в соответствующей группе (t-критерий Стьюдента для зависимых переменных $p < 0,05$);

Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 1,5% ЭГ, в соответствующий день (t-критерий Стьюдента для независимых переменных $p < 0,05$)

Клинически значимые изменения показателей крови

M±SEM

Исследуемые показатели	ЭГ 1% в течение 28 дней			ЭГ 1,5% в течение 9 дней		
	Фон	N-й день	43-й день	Фон	N-й день	43-й день
Креатинин, мкмоль/л	49±2	234±26 [29-й]	105±10	51±3	423±60 [9-й]	61±9
Мочевина, ммоль/л	6,9±0,3	43,9±4,7 [29-й]	14,8±1,8	7,1±0,3	52,3±3,7 [9-й]	9,3±0,9
Клиренс креатинина, мкл/мин	785±53	173±29 ■ [29-й] ■	500±77 ■ ■	853±126	380±30 ■ [15-й]	1058±229

■ Различия статистически значимы по сравнению с фоном в соответствующей группе (t-критерий Стьюдента для зависимых переменных $p < 0,05$);

■ Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 1,5% ЭГ, в соответствующий день (t-критерий Стьюдента для независимых переменных $p < 0,05$)

Патологические изменения почек

Макроскопическое исследование



1% ЭГ в течение 28 дней,
эвтаназия на 29-й день



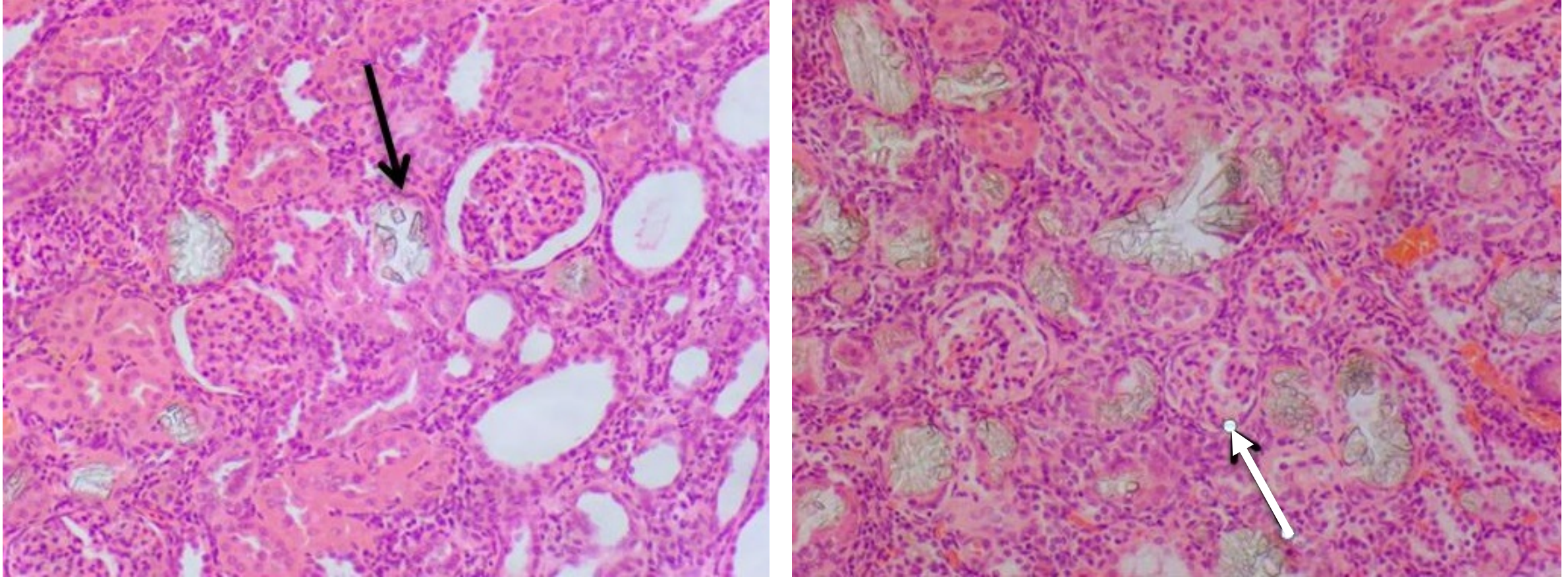
1% ЭГ в течение 28 дней,
эвтаназия на 43-й день



1,5% ЭГ в течение 9 дней,
Эвтаназия на 29-й день

Патологические изменения почек

Гистологическое исследование



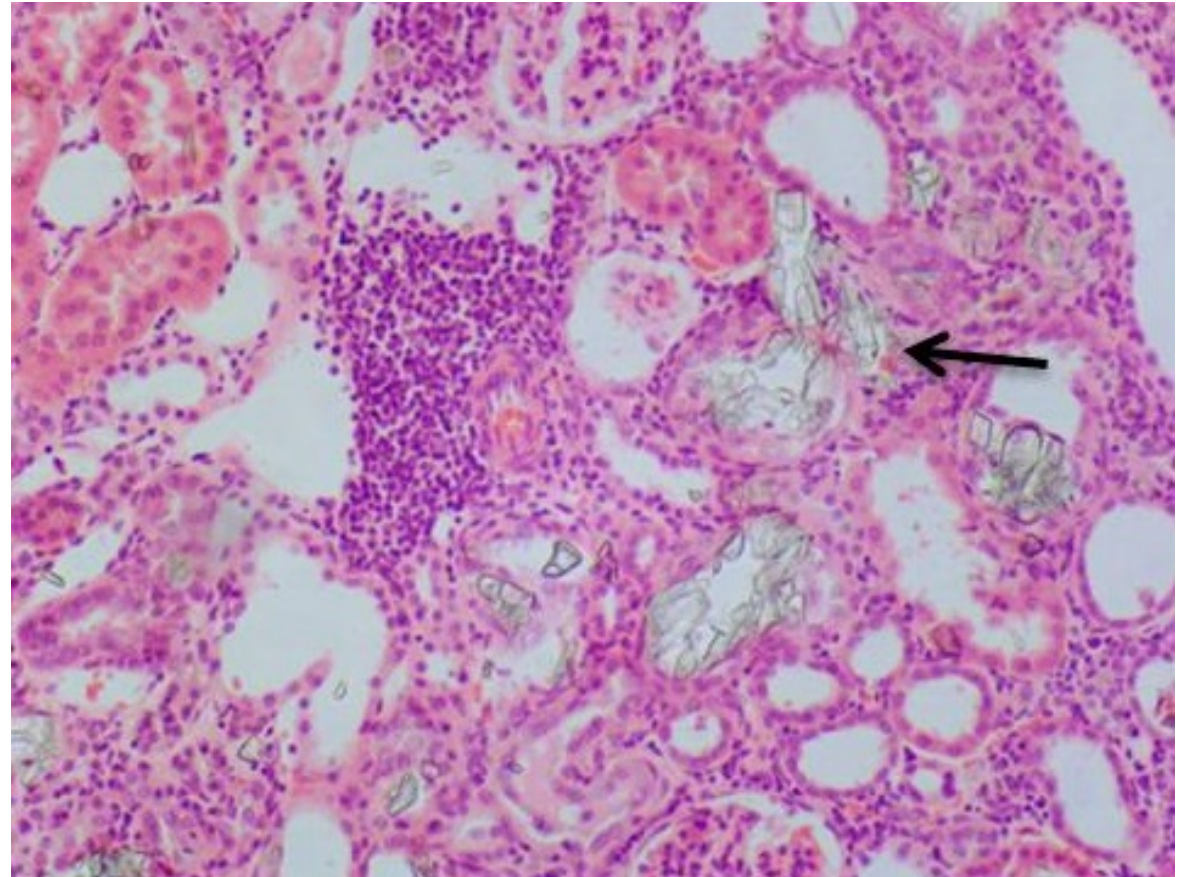
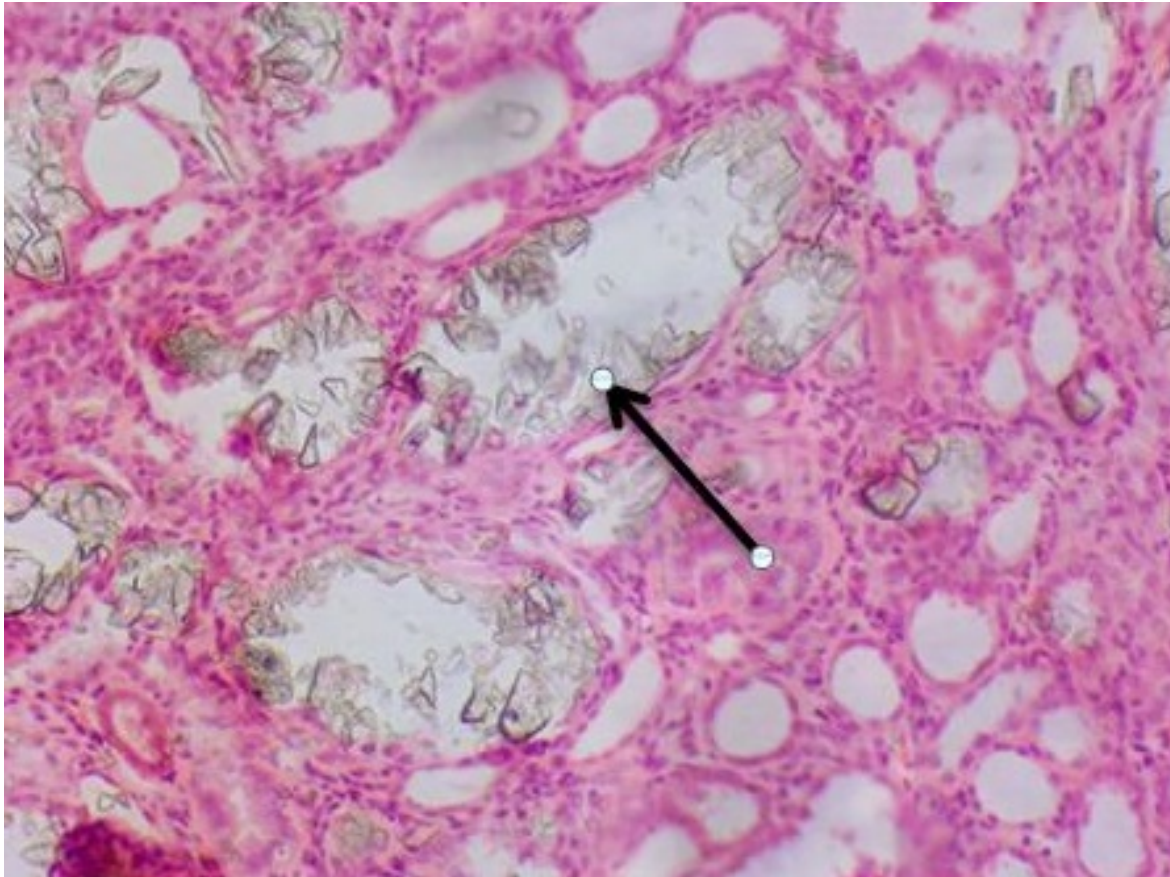
1% ЭГ в течение 28 дней, эвтаназия на 43-й день.

Кристаллические структуры (черная стрелка), склероз клубочков (белая стрелка).

Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x100

Патологические изменения почек

Гистологическое исследование



1,5% ЭГ в течение 9 дней, гибель на 9-й день.
Кристаллические структуры (черная стрелка).
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x100

Какой режим введения ЭГ крысам лучше?

1%
28 дней



1,5%
9 дней

✓ *Низкая концентрация более гуманна*



Исследование мочи у кроликов

Общий анализ

- 1) Суточный диурез
- 2) Отношение потребленного ЭГ к объему суточной мочи
- 3) Билирубин
- 4) Уробилиноген
- 5) Кетоновые тела
- 6) Аскорбиновая кислота
- 7) Глюкоза
- 8) Белок
- 9) Нитриты
- 10) pH
- 11) Относительная плотность
- 12) Эритроциты
- 13) Лейкоциты

Микроскопия осадка

- 1) Эпителий
- 2) Лейкоциты
- 3) Эритроциты
- 4) Цилиндры
- 5) Слизь
- 6) Соли
- 7) Бактерии

**1,5% ЭГ
28 дней**

**4% ЭГ,
13 дней**

**Клинически значимые изменения
отсутствовали**

Клинически значимые изменения показателей крови

	Исследуемые показатели	ЭГ 1,5% в течение 28 дней			ЭГ 4% в течение 13 дней		
		Фон	N-й день	43-й день	Фон	N-й день	43-й день
M±SEM	Креатинин, мкмоль/л	100±3	94±5 [29-й]	105±3	96±3	287±101 [14-й] ■	112±8
	Мочевина, ммоль/л	7,0±0,3	6,6±0,2 [29-й]	8,0±0,4	6,5±0,4	15,5±3,9 [14-й] ■	7,0±0,6

■ Различия статистически значимы по сравнению с фоном в соответствующей группе (t-критерий Стьюдента для зависимых переменных $p < 0,05$);

■ Различия статистически значимы по сравнению с группой животных, получавших 4% ЭГ, в соответствующий день (t-критерий Стьюдента для независимых переменных $p < 0,05$)

Патологические изменения почек

Макроскопическое исследование



1,5% ЭГ в течение 28 дней,
эвтаназия на 29-й день



1,5% ЭГ в течение 28 дней,
эвтаназия на 43-й день

Патологические изменения почек

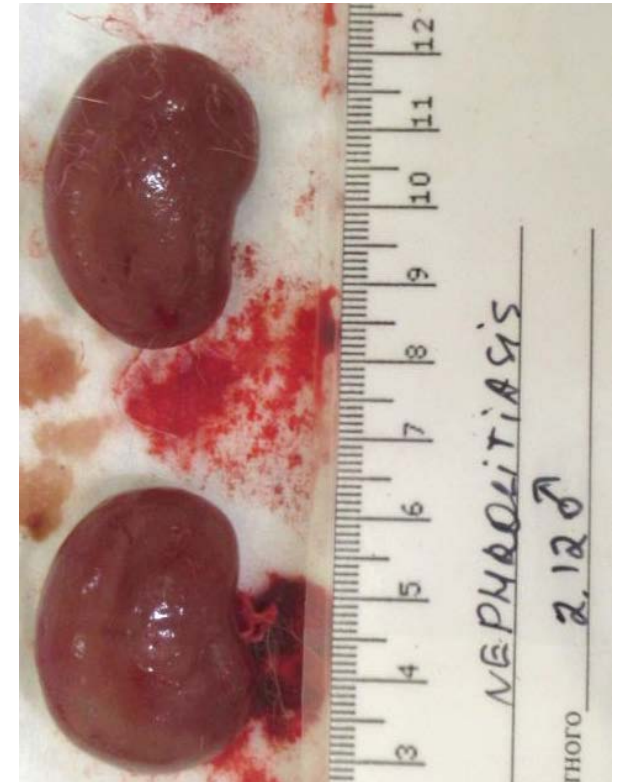
Макроскопическое исследование



4% ЭГ в течение 13 дней,
гибель на 13-й день



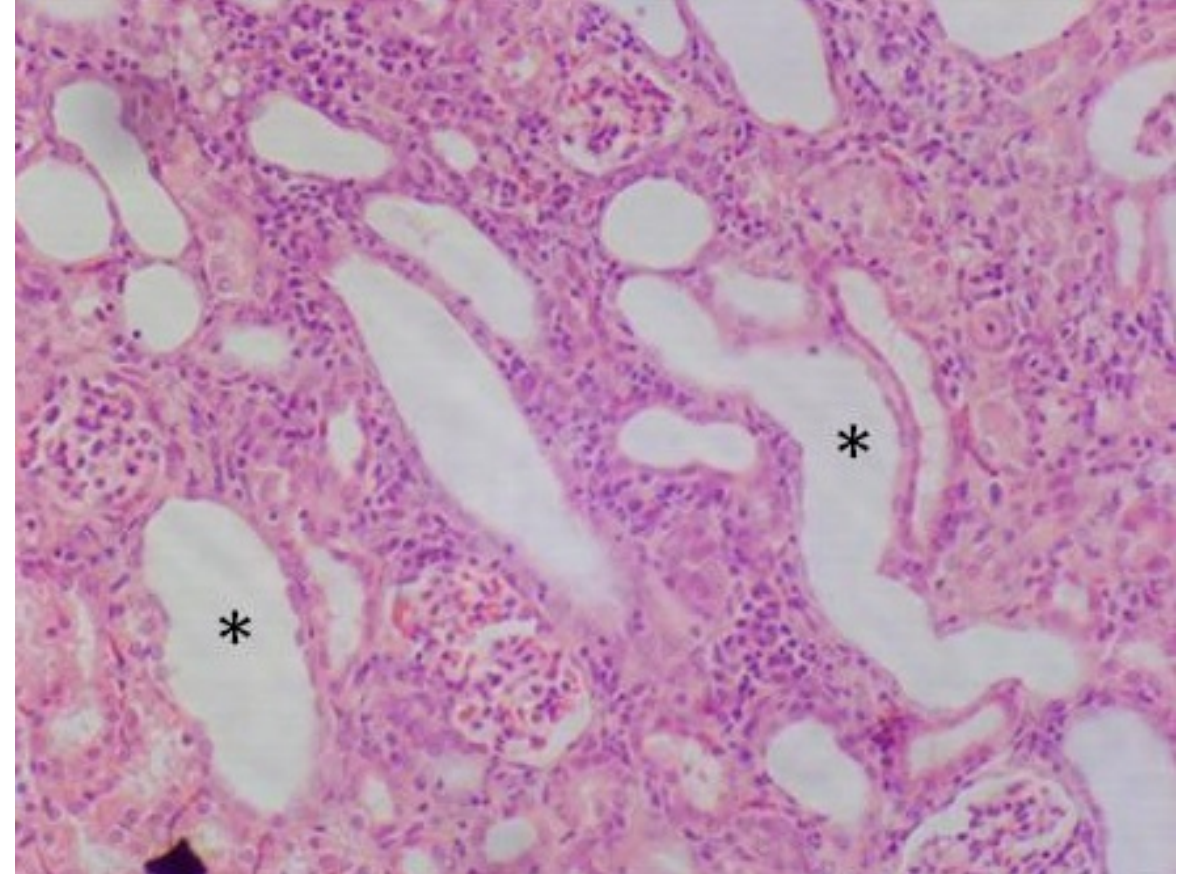
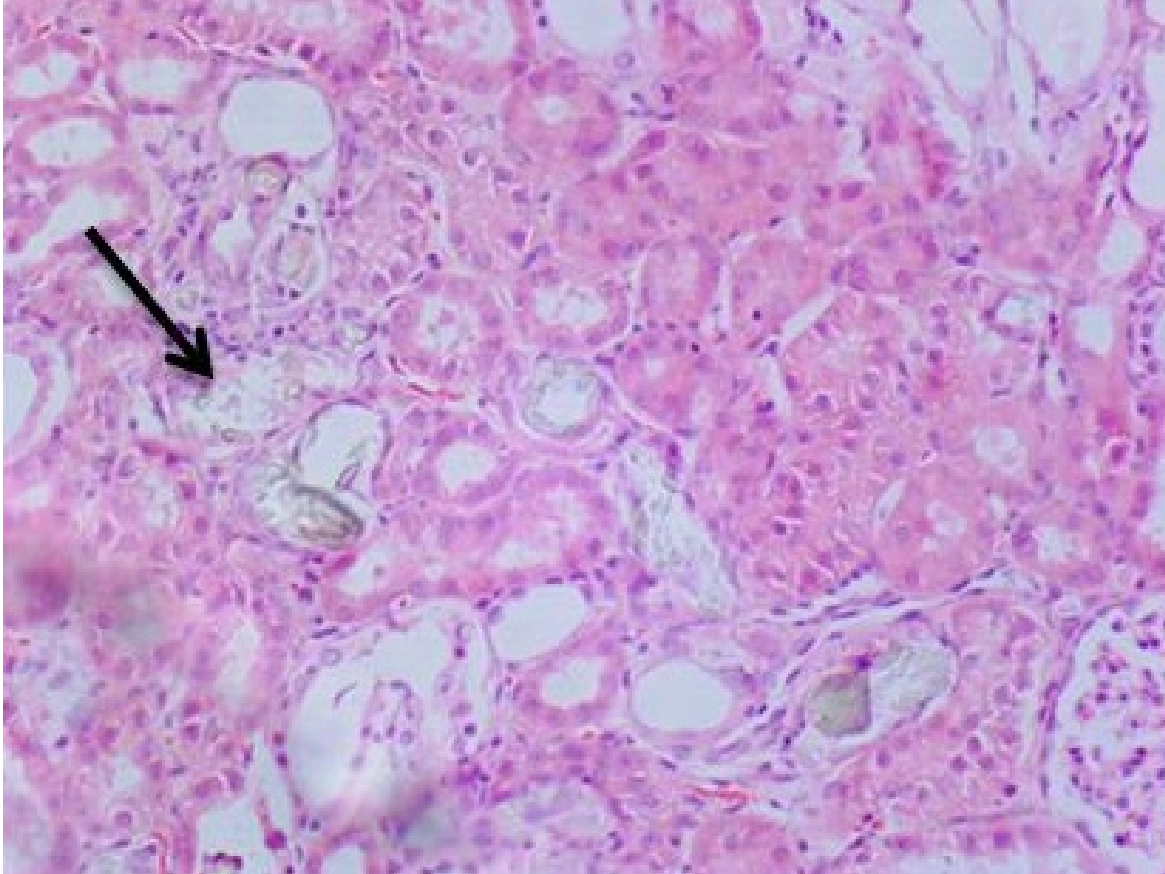
4% ЭГ в течение 13 дней,
эвтаназия на 29-й день



4% ЭГ в течение 13 дней,
эвтаназия на 43-й день

Патологические изменения почек

Гистологическое исследование



4% ЭГ в течение 13 дней, гибель на 13-й день.
Кристаллические структуры (→), дистрофия эпителия (*)
Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение x100

В каком режиме вводить ЭГ кроликам?

1,5%
28 дней



4%
13 дней

- × Нет клинически значимых изменений в моче и крови
- × Слабые макроскопические изменения почек

- ✓ Повышение мочевины и креатинина в крови
- ✓ Более выраженная патоморфологическая картина

Кого взять для моделирования МКБ: крыс или кроликов?

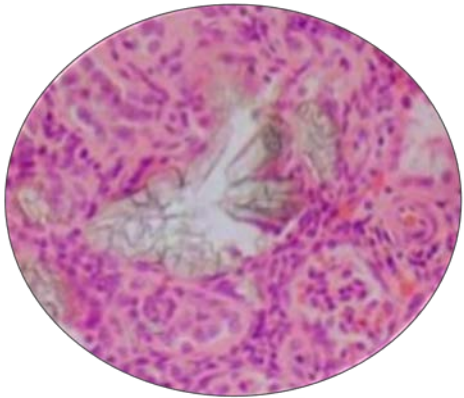
Система балльной оценки признаков нефролитиаза

0 баллов: нет; 0,5 баллов: у ≤50% животных; 1 балл: у >50% животных

Показатель	Крысы (1% ЭГ 28 дней)	Кролики (4% ЭГ 13 дней)
Снижение массы тела	1	0,5
Гипероксалурия	1	0
Снижение креатинина в моче	1	0
Снижение мочевины в моче	1	0
Снижение СКФ	1	0
Увеличение креатинина в крови	1	0,5
Увеличение мочевины в крови	1	0,5
Кристаллические депозиты в почках	1	0,5
ИТОГО:	8	2

Выводы

1. Моделирование патологии нефролитиаза может осуществляться как на крысах, так и на кроликах, при этом более выраженную патологию удастся получить на крысах.



Кристаллы в просвете канальцев:

У 100% крыс (1% 28 дней и 1,5% 9 дней)

У 31% кроликов (1,5% 28 дней)

У 46 % кроликов (4% 13 дней)

Выводы

2. На основании полученных результатов была разработана система балльной оценки признаков нефролитиаза у самцов крыс и кроликов.



Сформированному нефролитиазу дана оценка:

При введении ЭГ 1% 28 дней крысам – 8 баллов

При введении ЭГ 4% 13 дней кроликам – 2 балла

Выводы

3. При использовании кроликов в качестве тест-системы нефролтиаза сложной является прижизненная оценка степени поражения почек. **Основным критерием оценки поражения почек у кроликов является гистологическое исследование.**
4. У крыс помимо гистологического исследования при нефролтиазе для оценки степени повреждения почек могут быть использованы показатели:
 - ✓ Кристаллы (оксалаты) в моче
 - ✓ Уровень креатинина, мочевины, белка в моче
 - ✓ Уровень креатинина, мочевины в крови
 - ✓ Скорость клубочковой фильтрации

Спасибо за внимание!

