



Новые биомодели метаболического синдрома

В.Н. Каркищенко¹, Р.А. Клёсов¹, О.И. Степанова¹, О.В. Баранова²

¹ – ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

² – ФГАУ «Лечебно-реабилитационный центр» Минздрава России, Москва

Контактная информация: Клёсов Роман Алексеевич, klesrom@mail.ru

Работа посвящена поиску и исследованию новых биомоделей метаболического синдрома. Клиническими, биохимическими и морфологическими методами изучены линии мышей NZB и CC57B₆, которые воспроизводят течение развития метаболического синдрома и соответствующие патогенетические, функциональные и структурные изменения в организме. Установлено, что мыши линии C57Bl/KsLepr^{db}/+ могут быть использованы в качестве биомодели метаболического синдрома с первого по третий месяц жизни, мыши линий NZB и CC57B₆ – начиная с шестого месяца. Животные линии NZB отличаются более высоким уровнем глюкозы и HbA_{1c}, а также более выраженным ожирением, однако у данной линии отмечена агрессивность по сравнению с животными линии CC57B₆.

Ключевые слова: биомодель, метаболический синдром, ожирение, NZB, CC57B₆, C57Bl/KsLepr^{db}/+ (db/db), мыши.

Введение

Метаболический синдром (МС) представляет собой многофакторный комплекс патологических изменений, в основе которых лежит инсулинорезистентность. Еще в 1988 г. G.M. Reaven писал о сочетании инсулинорезистентности, артериальной гипертензии, гиперлипидемии и ожирении [9]. МС часто предшествует развитию сахарного диабета 2-го (СД 2) типа и таким образом представляет собой один из основных факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний в наше время [10]. Данный синдром также ассоциирован с развитием стеноза печени, с нарушением функции почек и повышенным развитием онкологических заболеваний [6,

7, 8], что делает необходимым не только выявление, но и своевременную коррекцию этих состояний. В связи с этим становится актуальным вопрос о поиске методов коррекции МС. Биомоделирование МС – необходимая составляющая доклинических исследований лекарственных препаратов для лечения МС.

Целью работы явился поиск и разработка биомоделей МС на лабораторных животных.

Материалы и методы

После изучения доступной литературы по данной тематике было принято решение, что наиболее подходящими для разработки в качестве биомодели

МС животными-моделями следует считать мышей линий NZB и CC57Br.

NZB (новозеландская черная мышь) – инбредная линия мышей, особи которой характеризуются спонтанным развитием аутоиммунного заболевания, сходного с красной волчанкой. Инбридинг: F92. Генотип: a, B, +rd, H-2^d. Окраска шерсти черная. Выведены Бельшевским (B1) в 1948 г. из смешанной колонии университета Отаго, которая была привезена в Новую Зеландию из Англии в 1930 г. Происходит от черной пары, отделившейся от NZO на F3 [1].

CC57Br. Инбридинг: F109. Генотип: a, b, H-2^b. Окраска шерсти коричневая. Выведена Н.Н. Медведевым (Mv) в 1943 г. от скрещивания BALB/cN х C57Bl/N [1].

Нами не обнаружено работ, в которых эти линии мышей изучались на наличие у них МС. Для изучения патофизиологических изменений МС в организме животных были использованы мыши линий NZB и CC57Br в возрасте 3-14 мес., для контроля динамики развития МС использовали группу мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db), являющейся генетической моделью СД 2 типа, с развитием МС, начиная с первого месяца жизни, и группу фенотипических здоровых гетерозиготных мышей той же линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/+) [4, 5]. В табл. представлено общее количество мышей в эксперименте.

Экспериментальных животных содержали в условиях свободного доступа к воде и пище на рациональном питании, кормление животных осуществлялось стандартным полнорационным гранулированным (экструдированным) комбикормом для лабораторных животных ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5 [2]. Животных содержали в микроизоляторной системе по 5 особей, при температуре 20-22°C, в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

Биохимические исследования проводили в 10 мкл цельной крови, полученной пункцией малой подкожной вены голени у мышей после 16-18 ч голодания по ранее созданной методике [3].

Исследования показателей крови были проведены в динамике. Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Асси-ЧЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял 0,6-33,3 ммоль/л.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе NycoCardREDERII (Норвегия).

Таблица

Распределение животных по группам

Группа	Контроль 1	Контроль 2	Эксперимент 1	Эксперимент 2
Линия животных	db/+	db/db с МС	NZB	CC57Br
Количество животных	20	20	20	20

Тест основан на методе боратного аффинного анализа, диапазон измерения: 3-18%.

Проводился постоянный контроль массы тела животных в динамике.

Для гистологических исследований использовался микроскоп Nikon-EclipseTS 100 (Япония) с программным обеспечением. Парафиновые срезы внутренних органов окрашивались гематоксилин-эозином, криосрезы печени – Суданом III.

Результаты и их обсуждение

Отмечено, что линии мышей NZB и CC57Br характеризуются инсулинорезистентностью и возникающим ожирением в возрасте 6-10 мес. Для подтверждения инсулинорезистентности проведено *биохимическое исследование* уровня глюкозы в крови животных. Было установ-

лено, что у мышей линии NZB **уровень глюкозы** в крови повышается с 5-го мес. жизни и составляет $7,9 \pm 1,34$ ммоль/л, рост гликемии продолжается и к 10-му мес. жизни, достигая $11,7 \pm 1,82$ ммоль/л. У мышей линии CC57Br отмечено аналогичное повышение – с $7,3 \pm 2,01$ до $12,3 \pm 1,30$ ммоль/л (CC57Br) в возрастном интервале 5-10 мес., у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) – до $25,9 \pm 1,90$ ммоль/л (рис. 1).

При исследовании **уровня гликозилированного гемоглобина (HbA1c)** у мышей линии NZB с 5-го мес. жизни значения HbA1c составляют 4,0-4,8%, у мышей линии CC57Br – 4,5-5,0%, у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) значения данного показателя оставались стабильно высокими, доходя до $9,4 \pm 0,21\%$, по сравнению с нормой – $3,2 \pm 0,13\%$ (рис. 2).

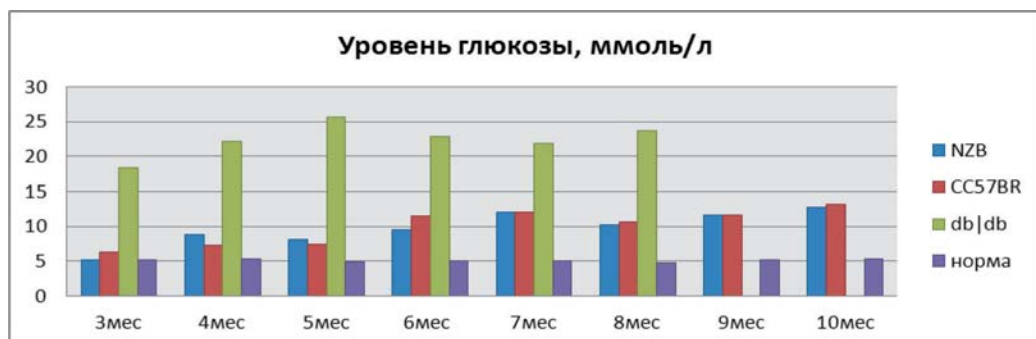


Рис. 1. Динамика изменения уровня глюкозы в крови лабораторных животных.

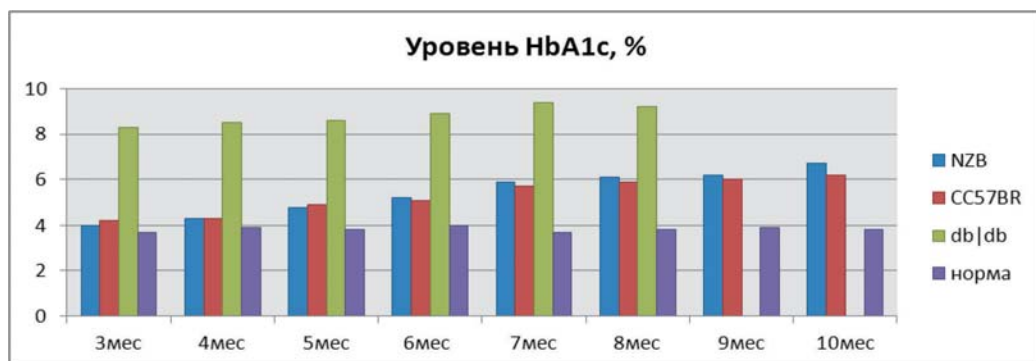


Рис. 2. Динамика изменения уровня HbA1c в крови лабораторных животных.

С возрастом уровень HbA1c у мышей линий NZB и CC57Br повышается и составляет 5,9-6,8% к 10-му мес. жизни. Продолжая динамические исследования уровня глюкозы и HbA1c, установлено, что у мышей линий NZB и CC57Br на 5-7 мес. жизни прогрессируют нарушения углеводного обмена и достоверно отличаются от аналогичных показателей в контрольной (здоровой) группе животных.

Помимо этого, в результате *взвешивания* отмечено увеличение массы тела (рис. 3, 4) у животных экспери-

ментальных групп. Так, у мышей линии NZB отмечен рост с $38,7 \pm 1,25$ до $43,7 \pm 1,30$ г, а в возрасте 12 мес. масса тела может составлять 52-59 г; мыши линии CC57Br прибавляли в весе с $32,7 \pm 2,41$ до $38,5 \pm 1,67$ г, доходя до 47-49 г в возрасте 12 мес.; у мышей линии B/Ks-Lepr^{db/+} (db/db) отмечено увеличение массы тела в течение всего исследования по сравнению с нормой ($29,7 \pm 1,07$ г), что свидетельствует о появлении ожирения, типичного для МС, и, следовательно, о нарушениях жирового обмена у этих животных.

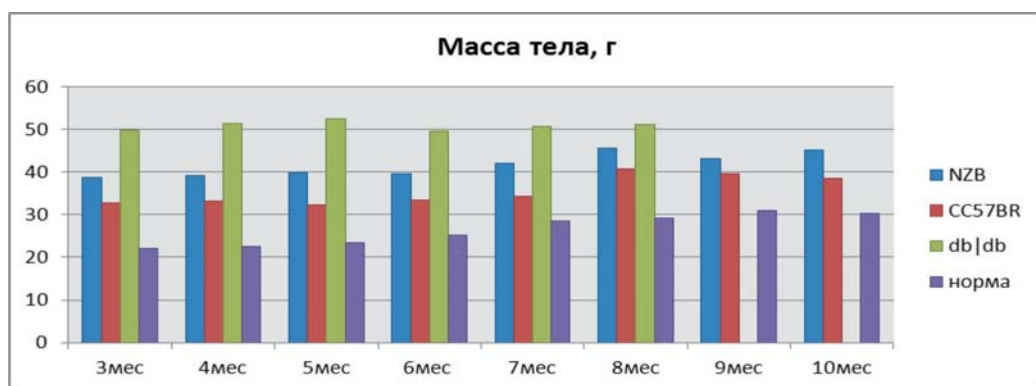


Рис. 3. Динамика изменения массы тела животных.

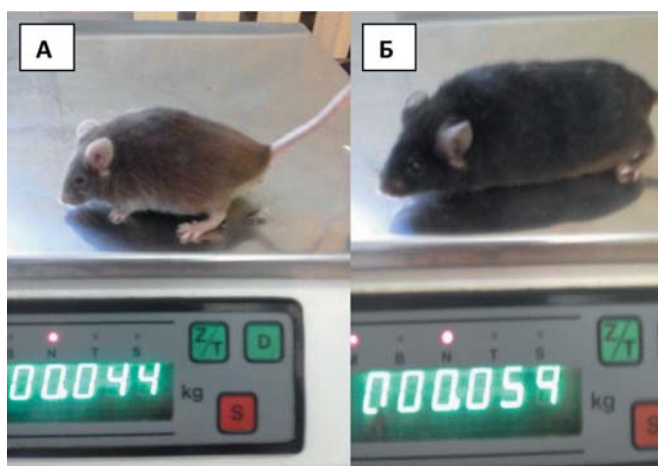


Рис. 4. Взвешивание экспериментальных животных в возрасте 12 мес. (на весах – масса в граммах): А – мыши линии NZB, Б – мыши линии CC57Br.

При *гистологическом исследовании* органов, участвующих в патогенезе МС, получены следующие результаты. Выявлены типичные для МС нарушения в структуре печени и почек.

Гистологическое исследование **печени мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** показало, что дольковое и балочное строение сохранено, отмечается выраженное полнокровие центральных вен, часть из которых паретически расширена, полнокровие центральных отделов синусоидов, сосудов порталных трактов. Гепатоциты всех отделов долек – с признаками плазмореписа, с фрагментированной,

эозинофильной цитоплазмой с просветленными ядрами и выраженными ядрышками (рис. 5). Отмечалась гибель единичных клеток по периферии центральных вен (некробиоз).

Гистологическое исследование **печени мышей линий NZB и CC57Br в возрасте 14 мес.** обнаружило, что строение органа сохранено, центральные вены расширены, часть из них полнокровна, отмечается выраженная очаговая жировая дисторфия гепатоцитов мелко-среднекапельного характера, с поражением преимущественно центральных отделов долек (рис. 6).

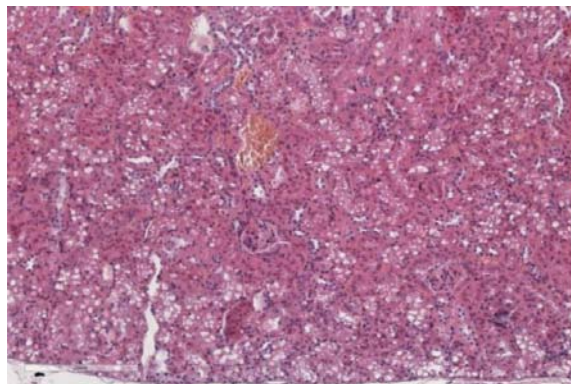


Рис. 5. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии NZB в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

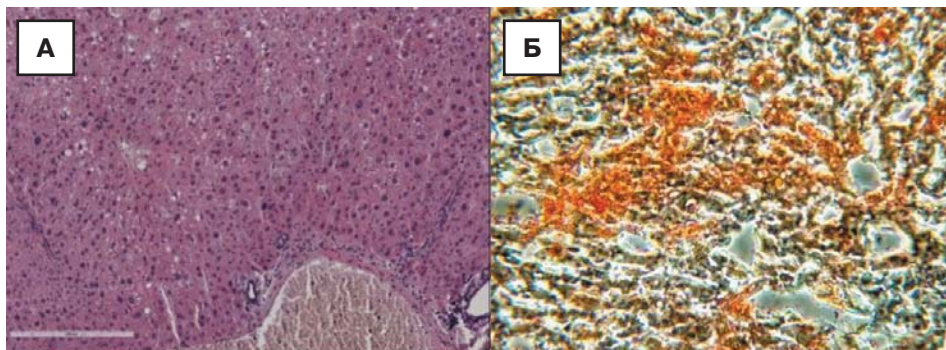


Рис. 6. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии NZB в возрасте 14 мес. Окраска: гематоксилин-эозин (А); Судан III (Б). Ув. х200.

При исследовании **почки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** установлено, что клубочки одинакового размера, с признаками умеренного и выраженного полнокровия капиллярных петель, единичными фокусами интра- и перигломерулярных кровоизлияний. В большей части клубочков отмечалась пролиферация эпителия наружного листка капсулы Боумена-Шумлянско-го. Выраженная жировая дистрофия эпителия проксимальных и дистальных извитых канальцев почки, в части канальцев эпителий некротизирован и слущен в просвет. В просвете единичных канальцев отмечалось скопление гомогенной эозинофильной жидкости. Выраженное полнокровие сосудов мозгового слоя с фокусами некротических кровоизлияний, отек стромы, мелкие перитубулярные кровоизлияния. В эпителии собирательных трубочек и эпителии проксимальных и дистальных каналь-

цев, в строме почек – скопление крупных липидных вакуолей в условиях выраженного кислородного голодания / тканевой гипоксии, накопление связано с инфильтрацией эпителия почечных канальцев жиром при липемии и гиперхолестеринемии (рис. 7А). **В возрасте 14 мес.** у животных в почке отмечаются участки с явлениями жировой дистрофии эпителия извитых канальцев, полнокровные сосуды капиллярного типа, мелкая очаговая лимфоцитарная инфильтрация. Мозговой слой с явлениями отека, полнокровия сосудов (рис. 7Б).

Гистоструктура **селезенки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** нарушена, рисунок строения стерт, отмечается гиалиноз стенок селезеночных артерий, полнокровие сосудов красной пульпы, т.е. гистологические признаки гипоплазии селезенки (рис. 8). Масса селезенки составила $0,059 \pm 0,011$ г, при норме – $0,089 \pm 0,016$ г.

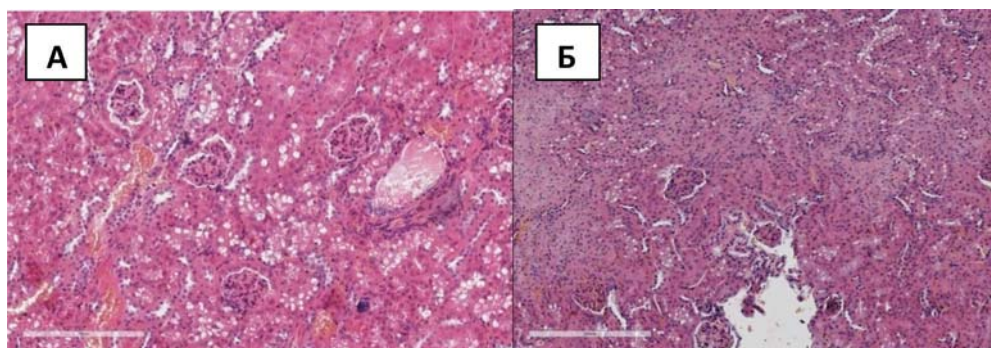


Рис. 7. Морфологические изменения в ткани почки мышей линии NZB в возрасте 12 и 14 мес.: А – в строме почек отмечается скопление крупных липидных вакуолей, ув. х 400; Б – ткань почки с полнокровными капиллярными петлями клубочков, участками жировой дистрофии эпителия извитых канальцев, ув. х200. Окраска гематоксилин-эозином.

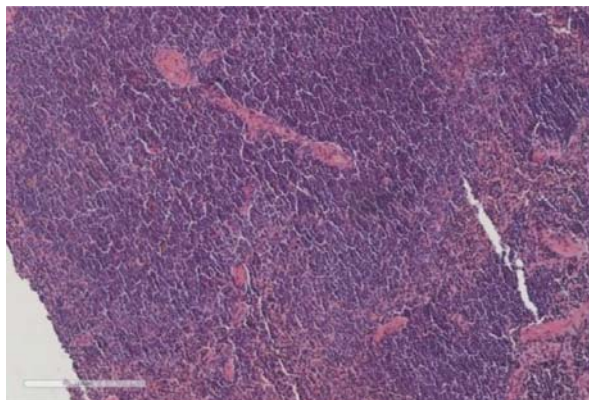


Рис. 8. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей линии NZB в возрасте 12 мес.: гипоплазия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

Дольковое строение **поджелудочной железы мышей линии NZB в возрасте 12 мес.** сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами обычного гистологического строения, вставочными, внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечались полнокровные сосуды (кровеносные капилляры, междольковые артериолы и артерии). Протоки поджелудочной железы выстланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. Эндокринная часть представлена островками Лангерганса преимущественно

округлой, правильной формы, среднего размера, клеточными, лежащими между панкреатическими, ацинусами (рис. 9).

Морфологические изменения внутренних органов **мышей линии CC57Br в возрасте 12 мес.** аналогичны изменениям у мышей линии NZB. В **печени** – дольковое и балочное строение сохранено, отмечалось выраженное полнокровие центральных вен, часть из которых паретически расширена, полнокровие центральных отделов синусоидов, сосудов порталных трактов. Гепатоциты всех отделов долек – с признаками плазмореписа, с фрагментированной, эозинофильной цитоплазмой

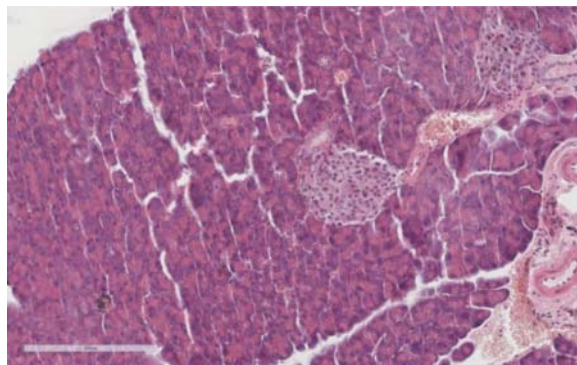


Рис. 9. Морфологические изменения ткани поджелудочной железы у мышей линии NZB в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х200.

с просветленными ядрами и выраженными ядрышками. Отдельные гепатоциты – в состоянии средне-крупнокапельной жировой дистрофии, часть клеток – с фрагментированной цитоплазмой (рис. 10).

Почка: клубочки одинакового размера, с признаками умеренного и выраженного полнокровия капиллярных петель, единичными фокусами интра- и перигломерулярных кровоизлияний. В некоторых клубочках отмечалась незначительная пролиферация эпителия наружного листка капсулы Боумена-Шумлянского. Признаки жировой дистрофии

эпителия проксимальных и дистальных извитых канальцев почки. Выраженное полнокровие сосудов мозгового слоя с фокусами некротических кровоизлияний, отек стромы, мелкие перитубулярные кровоизлияния. Установлено, что в эпителии собирательных трубочек и эпителии проксимальных и дистальных канальцев, в строме почек присутствовало скопление крупных липидных вакуолей в условиях выраженного кислородного голодания / тканевой гипоксии, накопление связано с инфильтрацией эпителия почечных канальцев жиром при липемии и гиперхолестеринемии (рис. 11).

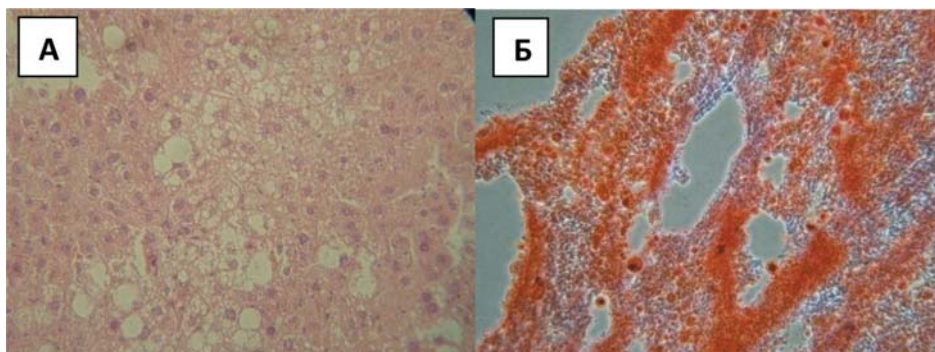


Рис. 10. Гистологическое исследование ткани печени мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес.: А – средне-крупнокапельная жировая дистрофия, окраска гематоксилин-эозином, ув. х400; Б – средне-крупнокапельная дистрофия, окраска Суданом III, ув. х200.

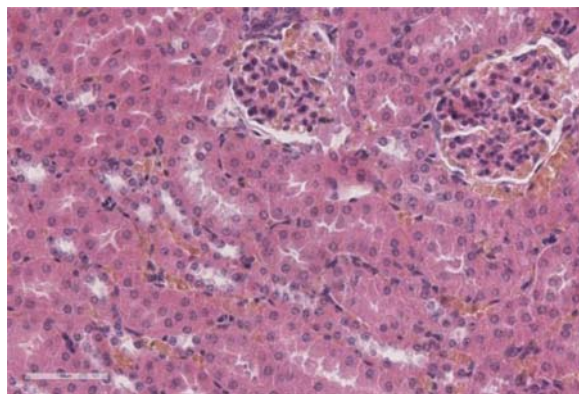


Рис. 11. Морфологические изменения в ткани почки мышей линии CC57B6 в возрасте 12 мес.: в строме почек отмечается скопление крупных липидных вакуолей. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

Гистоструктура **селезенки** нарушена, рисунок строения стерт, отмечается полнокровие сосудов красной пульпы, обширные кровоизлияния, что соответствует признакам гипоплазии селезенки (рис. 12). Масса органа составила $0,603 \pm 0,013$ г.

Дольковое строение **поджелудочной железы** сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами обычного гистологического строения, вставочными, внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечались полнокровные сосуды (кровоносные капилляры, междольковые ар-

териолы и артерии). Протоки поджелудочной железы выстланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. Эндокринная часть представлена многочисленными островками Лангерганса преимущественно округлой, правильной формы, среднего и крупного размеров, клеточными, лежащими между панкреатическими, ацинусами (рис. 13).

В исследуемый период жизни (12-14 мес.) у экспериментальных животных возникают выраженные метаболические нарушения, сопровожда-

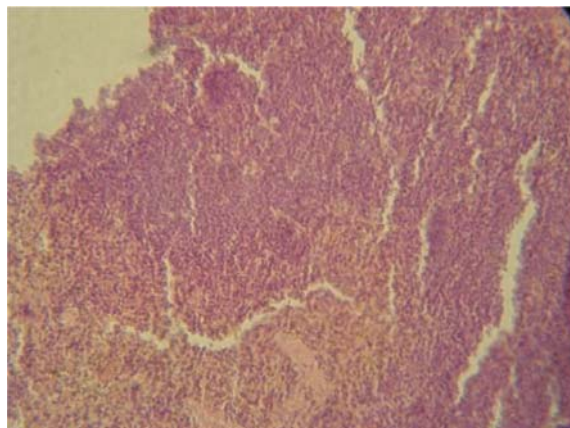


Рис. 12. Морфологические изменения в ткани селезенки мышей линии CC57Br в возрасте 12 мес.: гипоплазия. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.

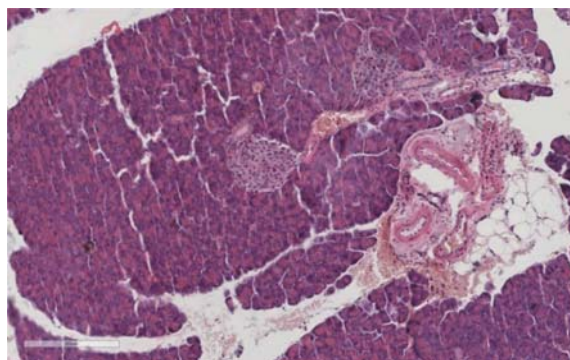


Рис. 13. Гистологическое исследование ткани поджелудочной железы мышей линии CC57Br в возрасте 12 мес. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. x200.



Рис. 14. Развитие мацерации кожного покрова у мышей линии NZB в возрасте 14 мес.

ющиеся структурными изменениями внутренних органов. Обнаруженные гистологические изменения печени и почек у животных линий NZB и CC57Br укладываются в картину изменений при MC. Показано, что они сопровождаются клиническими и биохимическими признаками, характерными при MC, – стойкой инсулинорезистентностью и ожирением.

Также установлено, что у мышей линии NZB в возрасте 14 мес. возникает *мацерация кожного покрова* (рис. 14).

Выводы

1. Клинические и биохимические исследования, проведенные на мышках линий NZB и CC57Br, выявили убедительные изменения в виде нарастающего увеличения массы животных и устойчивой гипергликемии, свидетельствующие о развитии MC.

2. Гистологические исследования образцов тканей мышей линий NZB и CC57Br выявили структурно-морфологические изменения в печени, почках и селезенке.

3. Установлено, что мыши линии NZB характеризуются более высоким

уровнем глюкозы и гликозилированного гемоглобина, а также более выраженным ожирением, при этом животные данной линии более агрессивны по сравнению с CC57Br.

4. Показано, что мыши линий NZB и CC57Br имеют более позднее развитие MC по сравнению с мышками линии C57BL/KsLepr^{db}/. Начиная с 6-го мес. жизни мыши линий NZB и CC57Br могут быть использованы в качестве новой адекватной модели MC в эксперименте, включая отработку новых способов лечения и профилактики заболевания.

Список литературы

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2005. – 608 с.
2. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль-2С. – 2010. – 358 с.
3. Степанова О.И. Метод взятия крови у мышей из малой подкожной вены голени // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 137-139.
4. Степанова О.И., Каркищенко В.Н., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Галахова Т.В., Онищенко Н.А., Касинская Н.В. Генетическая модель сахарного диабета 2 типа на мутантных мышках линии C57BL/KsLepr^{db}/+ // Биомедицина. – 2006. – № 2. – С. 28-40.

5. *Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Галахова Т.В., Баранова О.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.* Мутантные мыши линии C57BL/KsLepr^{db}/+ как генетическая модель сахарного диабета 2-го типа // Бюлл. exper. биол. и мед. – 2007. – № 12. – С. 664-667.
6. *Aschner P.* Diabetes epidemiology in Colombia // *Avances Diabetologia.* – 2010. – No. 29. – Pp. 95-100.
7. *Extermann M.* Metabolic syndrome and cancer: from bedside to bench and back // *Interdiscip. Top. Gerontol.* – 2013. – V. 38. – Pp. 49-60.
8. *Ferdinand K.C., Rodriguez F., Nasser S.A.* Cardiorenal metabolic syndrome and cardiometabolic risks in minority populations // *Cardiorenal. Med.* – 2014. – V. 4. – No. 1. – Pp. 1-11.
9. *Reaven G.M.* Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes.* – 1988. – No. 37. – Pp. 1595-1607.
10. *Vanni E., Bugianesi E., Kotronen A., et al.* From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? // *Digest. Liver Dis.* – 2010. – V. 42. – No. 5. Pp. 320-330.
1. *Karkischenko N.N.* Osnovy biomodelirovaniya [Basics of biomodeling]. Moscow: Izd-vo VPK. 2005. 608 p. (In Russian).
2. Rukovodstvo po laboratornym zhivotnym i alternativnym modelyam v biomeditsinskikh issledovaniyakh [Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical research]. Ed. by N.N. Karkischenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil-2S. 2010. 358 p. (In Russian).
3. *Stepanova O.I.* Metod vzyatiya krovi u myshey iz maloy podkozhnoy veny goleni [Method of drawing blood from mice from the small saphenous vein of the leg]. *Biomedicine.* 2006. No. 2. Pp. 137-139. (In Russian).
4. *Stepanova O.I., Karkischenko V.N., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Galakhova T.V., Onishchenko N.A., Kasinskaya N.V.* Geneticheskaya model sakharnogo diabeta 2 tipa na mutantnykh myshakh linii C57BL/KsLepr^{db}/+ [Genetic model of type 2 diabetes mellitus in mutant mice of the C57BL/KsLepr^{db}/+ line]. *Biomedicine.* 2006. No. 2. Pp. 28-40. (In Russian).
5. *Stepanova O.I., Karkischenko N.N., Galakhova T.V., Baranova O.V., Semenov Kh.Kh., Beskova T.B., Stepanova E.A., Zakirianov A.R., Onishchenko N.A.* Mutantnyye myshi linii C57BL/KsLepr^{db}/+ kak geneticheskaya model sakharnogo diabeta 2-go tipa [Mutant mice of the C57BL/KsLepr^{db}/+ line as a genetic model of type 2 diabetes mellitus]. *Byull. eksper. biol. and med.* [Bulletin of experimental biology and medicine]. 2007. No. 12. Pp. 664-667. (In Russian).
6. *Aschner P.* Diabetes epidemiology in Colombia. *Avances Diabetologia.* 2010. No. 29. Pp. 95-100.
7. *Extermann M.* Metabolic syndrome and cancer: from bedside to bench and back. *Interdiscip. Top. Gerontol.* 2013. V. 38. Pp. 49-60.
8. *Ferdinand K.C., Rodriguez F., Nasser S.A.* Cardiorenal metabolic syndrome and cardiometabolic risks in minority populations. *Cardiorenal. Med.* 2014. V. 4. No. 1. Pp. 1-11.
9. *Reaven G.M.* Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988. No. 37. Pp. 1595-1607.
10. *Vanni E., Bugianesi E., Kotronen A., et al.* From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Digest. Liver Dis.* 2010. V. 42. No. 5. Pp. 320-330.

References

New biomodels of metabolic syndrome

V.N. Karkischenko, R.A. Klesov, O.I. Stepanova, O.V. Baranova

The work is devoted to the search and research of new biomodels of metabolic syndrome. Mouse line NZB and CC57Br was investigated like as new biomodel of metabolic syndrome by clinical, biochemical, and morphological methods of analysis, which reproduce the course of the development of the metabolic syndrome and the corresponding pathogenetic, functional and structural changes in the body. It was established that C57Bl/KsLepr^{db}/+ line of mice can be used as the metabolic syndrome biomodel from the first to the third month of life, NZB and CC57Br mice – starting from the sixth month. Animals of the NZB line have a higher level of glucose and HbA1c, as well as more pronounced obesity, however, aggressiveness was noted in this line compared to animals of the CC57Br.

Key words: biomodel, metabolic syndrome, obesity, NZB, CC57Br, C57Bl/KsLepr^{db}/+ (db/db), mice.