

Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа

Р.А. Клёсов, В.Н. Каркищенко, О.И. Степанова, А.О. Ревякин

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

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

В работе представлены данные экспериментального моделирования сахарного диабета 1 типа на крысах. Предложены дозы и альтернативный метод введения стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда для получения сахарного диабета 1 типа на генетически не предрасположенных к развитию аутоиммунных заболеваний животных.

Ключевые слова: биомодель, сахарный диабет 1 типа, крысы, стрептозотоцин, неполный адьювант Фрейнда.

Введение

Сахарный диабет (СД) 1 типа – острая социальная болезнь XXI века, по-прежнему остаётся одной из наиболее частых причин ранней инвалидизации и гибели больных во всех странах мира. По данным экспертов ВОЗ, СД занимает третье место в структуре смертности населения после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний. В 2000 г. количество больных СД составило более 150 млн чел. Прогнозируется, что к 2025 г. их число достигнет 300 млн чел., причем на долю больных СД 1 типа приходится около 10%. Если признать медленно прогрессирующий аутоиммунный СД взрослых вариантом течения СД 1 типа, то процент больных СД 1 типа станет существенно выше [4]. На данный момент известна одна иммуннопатологическая аутоиммунная модель СД 1 типа на генетически здоровых (не предрасположенных) животных, но при

попытке её воссоздания возникла проблема высокой смертности – 65% среди экспериментальных животных от введения активных действующих веществ.

Обычно используемые экспериментальные модели СД 1 типа – аллоксановая и стрептозотоциновая – являются цитотоксическими, избирательно повреждают β -клетки поджелудочной железы и сопровождаются фиброзирующей регенерацией поджелудочной железы без сопутствующего развития в ней аутоиммунного повреждения [5].

В результате было принято решение разработать новые подходы и методы создания биомодели сахарного диабета 1 типа у крыс.

Целью эксперимента являлась оптимизация ныне существующей стрептозотоциновой биомодели СД 1 типа у крыс и разработка новых методов, позволяющих добиться более качественных результатов в эксперименте.

Материалы и методы

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России на белых лабораторных крысах-самцах Wistar массой 520-560 г в возрасте 8-10 мес. Лабораторные животные поступили из филиала НЦБМТ ФМБА России «Андреевка». Животные были взяты в эксперимент методом случайной выборки.

Кормление осуществлялось стандартным полнорационнным комбикормом, доступ к воде и корму – свободный. Крысы содержались в вентилируемых клетках системы «RairIsoSystem» при температуре 20-22°C, по 5 особей. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздрава РФ №708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животные были поделены на две группы: контрольная группа (n=40) и опытная группа (n=54). Двукратно поочередно в течение 2 недель с интервалом 24 ч вводили в первый день неполный адьювант Фрейнда (А.), во второй день – навеску стрептозотоцина (Stz.), растворённого в 1 мл воды для инъекций. Дозировки и объёмы введения представлены в таблице. Введение осуществляли подкожно, в паховую складку [3].

Стрептозотоцин – противоопухолевое средство алкилирующего действия из группы производных нитрозомочевины, вещество, токсичное для бета-клеток поджелудочной железы. По структуре достаточно напоминает молекулы сахара, чтобы захватываться и транспортироваться внутрь клеток. Ингибирует митоз, преимущественно G2-фазу. Механизм противоопухолевого действия полностью не изучен, но, вероятно, обусловлен образованием метилкарбониевых ионов, которые вызывают алкилирование или связываются с различными внутриклеточными структурами, включая нуклеиновые кислоты. Образует поперечные сшивки между нитями ДНК, что и приводит к ингибированию её синтеза; на синтез РНК и белка влияет в незначительной степени. Оказывает выраженный гипергликемический эффект, вызывая необратимое повреждение β -клеток поджелудочной железы [2].

Неполный адьювант Фрейнда – адьювант, представляющий собой масляную эмульсию, содержащую дериваты ланолина (жирные кислоты). Используется для неспецифической активации иммунной системы [2].

Для достоверного доказательства наличия СД 1 типа у экспериментальных животных были проведены исследова-

Таблица

Схема введения препаратов крысам

Группа животных	1-е введение		2-е введение		3-е введение	
подкожно, раз в 7 дней						
	1-й день	2-й день	1-й день	2-й день	1-й день	2-й день
Контрольная группа	без введения		без введения		без введения	
Опытная группа	1 мл А.	15 мг/кг Stz.	1 мл А.	20 мг/кг Stz.	1 мл А.	25 мг/кг Stz.

ния в динамике. Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяли на приборе Nycocard REDER II (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения – 3-18%.

Помимо этого, велся постоянный контроль быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения – 3-18%.

Содержание глюкозы в крови измеряли на приборе Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови (2-5 мкл) наносили на тест-полоску. Диапазон измерения составлял 0,6-33,3 ммоль/л от массы животных и суточного объема выпитой воды.

Результаты и их обсуждение

В ходе эксперимента показано, что уже на вторую неделю после введения

препаратов у животных опытной группы отмечалось повышение уровня глюкозы в крови до $10,9 \pm 0,84$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c оставался в пределах нормы – $3,9 \pm 0,22\%$. Далее, на третью неделю после введения препаратов, отмечалось достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $18,4 \pm 0,68$ ммоль/л (рис. 1).

Уровень HbA1c повысился до $9,2 \pm 0,28\%$ на 4-й неделе (рис. 2), и это повышение носит пролонгированный характер. Так, на 9-ю неделю эксперимента средние значения уровня глюкозы у животных опытной группы составляли $31,6 \pm 0,45$ ммоль/л, а HbA1c – $9,7 \pm 0,36\%$.

В течение эксперимента велись наблюдения за изменениями массы животных контрольной и опытной групп. Уже с 3-й недели замечено достоверное изменение массы животных опытной группы ($501 \pm 14,4$ г) по сравнению с контрольной группой ($645 \pm 13,7$) г. Масса животных опытной группы уменьшалась на протяжении всего эксперимента: к 9-й неделе средний показатель



Рис. 1. Динамика уровня гликемии крови лабораторных животных контрольной и опытной групп.

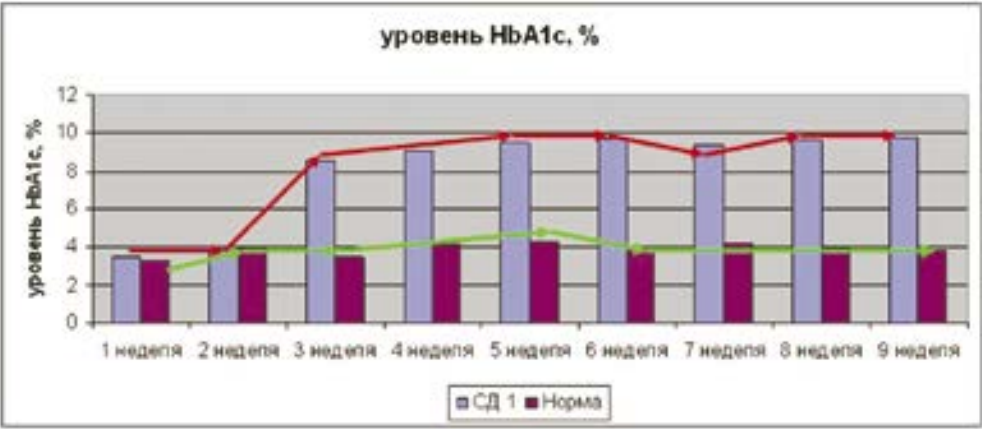


Рис. 2. Динамика HbA1c в крови лабораторных животных контрольной и опытной групп.

массы животного составлял $367 \pm 19,7$ г, в то время как у животных контрольной группы этот показатель составлял $696 \pm 21,6$ г (рис. 3).

Суточный мониторинг объёмов выпитой воды (рис. 4) также показал различия между контрольной и опытной группами. Так, на 2-ю неделю моделирования СД 1 типа у животных опытной группы отмечалось увеличение суточного объёма выпитой воды до $120 \pm 4,44$ мл, в то время как в конт-

рольной группе аналогичный показатель составлял $40 \pm 6,66$ мл. Этот факт обнаруживался на протяжении всего эксперимента: на 9-ю неделю средний суточный объём выпитой воды у животных опытной группы доходил до $365 \pm 25,5$ мл, по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе, составлявшем $40 \pm 3,33$ мл. Данное наблюдение свидетельствует об одном из клинических симптомов СД 1 типа – полидипсии.

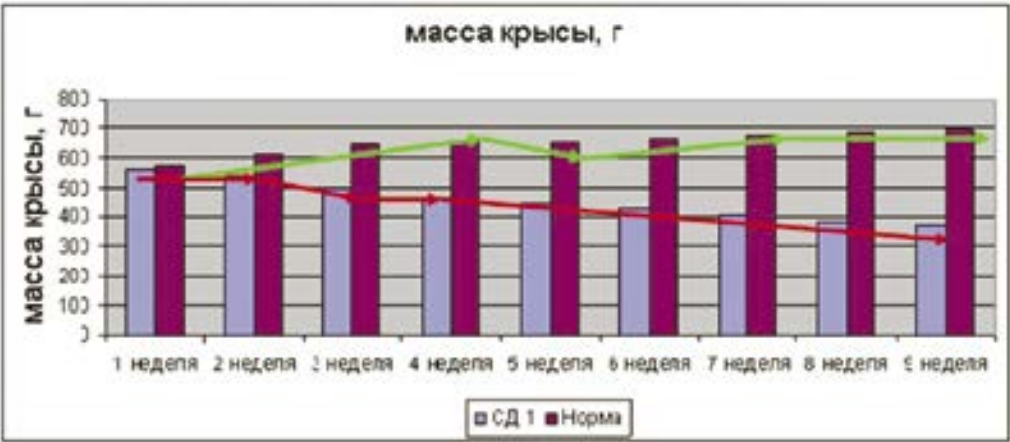


Рис. 3. Динамика массы животных контрольной и опытной групп.



Рис. 4. Суточный объем выпитой воды животными контрольной и опытной групп.

Одним из наиболее интересных результатов исследования явилось появление в опытной группе животных гангренозных повреждений хвостов (рис. 5). Из 54 экспериментальных животных данная патология наблюдалась у 11. Причём первые признаки гангренозных процессов проявились на 52 сутки эксперимента, что соответствует 6 годам течения СД 1 типа у человека, и имели

динамику воспалительного процесса, переходящего в некроз. Подобные изменения наблюдались только у животных опытной группы. Появление гангренозных поражений хвостов лабораторных крыс позволяет говорить о создании аналога синдрома диабетической стопы у человека на экспериментальной биологической модели метаболического синдрома СД 1 типа.



Рис. 5. Гангренозные поражения хвостов животных опытной группы.

Выводы

В результате проведённых исследований предложен альтернативный метод моделирования СД 1 типа у крыс. В отличие от методики [1], внутрибрюшинный метод введения заменён на подкожный, как более безопасный и удобный. Цитратный буфер, ввиду его токсичности, заменён на воду для инъекций. Оптимизирована однородность заболевания по группе. В ходе эксперимента доказана адекватность полученной биомодели наличием соответствующего клинического симптомокомплекса, характерного для сахарного диабета 1 типа (гипергликемия, высокий уровень HbA_{1c}, сильная потеря массы, полидипсия и полиурия). Создана биологическая модель метаболического синдрома СД 1 типа в виде гангренозного поражения хвостов крыс опытной группы, анало-

гичная синдрому диабетической стопы у человека. Работа по данной теме продолжается.

Список литературы

1. *Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А., Клименко Е.Д., Поздняков О.М., Великий Д.А.* Способ моделирования сахарного диабета 1 типа у крыс (Патент № RU 02400822).
2. Первая медицинская помощь. - М.: Большая Российская энциклопедия. 1994.
3. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. - М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
4. *Gillespie K.M.* Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. CMAJ. 2006; 175(2).
5. *Nir T., Melton D.A., Dor Y.* Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration // Journal of Clinical Investigation. 2007. 117(9): 2553-2561.
6. *Vavra J.J., Deboer C., Dietz A., Hanka L.J., Sokolski W.T.* Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. 1959. Antibiot. Annu. 7: 230-5.

Optimization of biomodel type 1 diabetes

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

The research presents the experimental simulation of type 1 diabetes in rats. The dose and method of introduction streptozotocine, and incomplete Freund's adjuvant for type 1 diabetes were proposed for animals that are not genetically predisposed to the development of autoimmune diseases.

Key words: biomodel, type 1 diabetes, rats, streptozotocine, incomplete Freund's adjuvant.