



Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2

А.А. Спасов, М. П. Воронкова, Г. Л. Снигур, Н. И. Чепляева,
М. В. Чепурнова

Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград

Контактная информация: Чепурнова Мария marishka8417@mail.ru

Из-за высокой распространенности диабета в мире продолжают поиски и изучение новых мишеней действия антидиабетических средств, изучаются их механизмы действия. Достаточно большое количество общепринятых экспериментальных моделей СД модифицированы и полностью описаны. Эти модели могут быть классифицированы по двум широким категориям: 1) генетические; 2) негенетические экспериментальные модели СД. Популярность использования последних по сравнению с генетическими обусловлена простым воспроизведением, относительно низкой стоимостью и достоверностью получаемых результатов. Экспериментальный СД такого типа используется для фармакологического скрининга, изучения механизма действия антидиабетических средств и, как правило, представлен стрептозотоцин/аллоксан – индуцированным СД на крысах или мышах. При использовании этих моделей, как правило, формируется СД смешанного типа, что не всегда позволяет четко идентифицировать механизм действия антидиабетических веществ для лечения инсулиннезависимого типа СД, что обуславливает воспроизведение экспериментальной модели СД типа 2, которая должна максимально соответствовать биохимическим изменениям в плазме крови и патогенезу СД типа 2 у человека. Следовательно, целью данной статьи является воспроизведение и сравнительная оценка экспериментальной модели СД типа 2 с СД смешанного типа.

Ключевые слова: сахарный диабет типа 2, стрептозотоцин, никотинамид.

Для скрининга и детального изучения антидиабетических препаратов используют различные генетические и негенетические экспериментальные модели сахарного диабета (СД) [7]. И хотя они не совсем эквивалентны по этиопатогенетическим механизмам данной патологии человека, каждая из них выступает в качестве неотъемлемого инструмента для исследования генетических, эндокринных, метаболических, морфологических изменений, лежащих в основе данного заболевания. Так, СД – генетические дефекты в инсулинпродуцирующих клетках, в структурах, обуславливающих

трансдукцию инсулинового сигнала или секреторную функцию эндокриноцитов, могут быть детально исследованы с использованием специализированных линий животных со спонтанно полученными мутациями или направленным нокаутом генов [9]. Тем не менее, наиболее простыми в воспроизведении являются негенетические модели, в которых используются гидрофильные β -клеточные глюкозные аналоги, такие как аллоксан, стрептозотоцин, хлорозотоцин, ципрогептадин и др. Механизм действия этих веществ заключается, прежде всего, в деструкции β -клеток панкреатического

островка путем: 1) генерации свободных радикалов кислорода, нарушающих целостность клетки; 2) алкилирования ДНК и последующей активизации полиАДФ-рибозо-синтетазы – снижение содержания NAD в β -клетке; 3) угнетения активного транспорта кальция и кальмодулин-активированной протеинкиназы (D.A. Rees, J.C. Alcolado, 2005). В данной категории экспериментальных моделей СД использование стрептозотоцина (N-нитрозопроизводного глюкозамина) является наиболее распространенным (R.M. Cowett, 1994). В зависимости от применяемой в эксперименте дозы цитотоксина (45-70 мг/кг) и пути введения (в/бр, в/в), возможно моделирование различных состояний углеводного обмена, соответствующих определенным клиническим типам диабета (смешанный СД (тип 1-2) или нарушенная толерантность к углеводам, приравниваемая к латентному или скрытому диабету) (K. Srinivasan et al., 2007). При явном СД, характеризующемся появлением клинических признаков (гипергликемия, наличие глюкозы в моче, полиурия, полидипсия, резкая потеря в весе), достаточно трудно решить вопрос о вкладе каждого из звеньев в патогенетическую цепь его развития и количественно определить степень повреждения β -эндокриноцитов. Есть данные (S.H. Bae, 2003), что при увеличении дозы стрептозотоцина уменьшается влияние инсулина на утилизацию глюкозы и на синтез гликогена в диафрагме, а тканевая чувствительность к инсулину прогрессивно снижается с увеличением длительности течения экспериментального диабета (до 60 дней), и в конечном счете приводит к развитию неконтролируемой декомпенсации, поздних осложнений и, как следствие, в 30-50% случаев – к гибели животных. Очевидно, что в эксперименте четко раз-

граничить тип полученного СД в таких условиях не представляется возможным, что, соответственно, затрудняет объективную оценку фармакологического действия исследуемых антидиабетических препаратов. Все это обуславливает проведение поиска новых экспериментальных моделей СД типа 2. Одной из таких возможностей, по литературным данным [6], является превентивное введение никотинамида непосредственно перед интоксикацией стрептозотоцином, которое минимизирует повреждающее действие цитотоксина, и, вероятно, оказывает цитопротективное действие на островки Лангерганса поджелудочной железы. Так как объективно фиксируется развитие умеренной гипергликемии и происходит сокращение количества инсулина на 40%, а также стабилизация других клинических проявлений СД [1].

Целью данной работы явилось воспроизведение экспериментальной модели СД типа 2 с помощью стрептозотоцина и никотинамида, и проведение сравнительной оценки данной экспериментальной модели СД типа 2 с классической моделью стрептозотоцин-индуцированного СД смешанного типа, исходя из показателей уровня глюкозы в крови натощак и при проведении глюкозотолерантных тестов, уровня С-пептида в плазме крови, морфологических изменений и количественной оценки инсулинпродуцирующих клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 70-ти половозрелых белых крысах-самцах линии *Wistar*, массой 200-250 г., которые содержались в условиях вива-

рия ВолГМУ с естественным световым режимом на полнорационной сбалансированной по содержанию питательных веществ диете для лабораторных животных, согласно ГОСТ Р50258⁰⁰92. Эксперименты были выполнены согласно методическим руководствам и нормативным документам, правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96).

Уровень глюкозы в крови и моче определяли глюкозооксидазным методом («Глюкоза ФКД», Россия); уровень кетонных тел в моче определяли с использованием диагностических тест-полосок ФАН (Чехия); концентрацию С-пептида в плазме крови – иммуноферментативным способом (DRG, Австрия); исследование на толерантность к сахарной нагрузке проводили с использованием ПГТТ по Т.П. Бондарь, Г.И. Козинец (2003) с оценкой результатов по А.В. Древаль (2005).

Негенетическую форму экспериментального сахарного диабета типа 2 воспроизводили по Islam S., Choi H. (2007) и моделировали стрептозотоцином («Sigma», США) (внутрибрюшинно – 65 мг/кг) с предварительным (за 15 мин.) введением никотинамида (интраперитонеально – 230 мг/кг). Количество глюкозы в крови проводили на 3, 7, 21, 28 сутки после введения цитотоксина. На 14 сутки эксперимента производили тест пероральной сахарной нагрузки (3 г/кг, интрагастрально) с забором образцов крови через каждые 30 мин. в течение 2 ч. Наличие глюкозы и кетонных тел в моче крыс всех экспериментальных групп оценивали на 7, 14, 21, 28 сутки после введения стрептозотоцина. Определение массы тела и количества потребляемой пищи и воды производили исходно (за 7 дней до введения цитотоксина), а

также на 7, 14, 28 сутки после введения стрептозотоцина.

Фиксацию ткани поджелудочной железы, почек и печени осуществляли в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. По общепринятым гистологическим методикам изготавливали парафиновые срезы с последующей окраской гематоксилином и эозином, ШИК(PAS)-реакцией, трихром по Массону. Иммунофлюоресцентная микроскопия выполнялась на парафиновых срезах ткани почек с использованием антител к IgG, IgM и фибриногену (DakoCytomation, Дания). Для выявления липидов на замораживающем микротоме изготавливали срезы печени и окрашивали их суданом III. Визуализацию в-эндокриноцитов островков Лангерганса проводили при иммуногистохимической реакции с поликлональными антителами к инсулину (DakoCytomation, Дания) с помощью непрямого иммунопероксидазного метода, используя протокол высокотемпературной демаскировки антигенов в миниавтоклаве. Достоверность полученных результатов контролировали с помощью позитивных и негативных контролей антигенов, а также негативных контролей антител.

Морфометрический анализ проводили на базе компьютерной программы «ВидеоТестМорфо-4» (Россия). Определяли процентное соотношение площади, занимаемой в-инсулоцитами, к общей площади островка, которая составляла 100%, объемную долю (ОД, %) островков по отношению к экзокринной части железы, площадь островков (мкм²), а также размеры ядер инсулоцитов (мкм²) и их количество (% от общего количества клеток панкреатических островков).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы «ВидеоТестМорфо-4». Проводился расчет

базовых статистических показателей (M, m), с использованием парного t-критерия Стьюдента при достоверности $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень глюкозы в крови у крыс с СД смешанного типа на 3 день после введения стрептозотоцина достоверно превосходил в 3,2 раза, а в моче – в 5,7 раз, таковой у интактных животных. В течение последующих дней наблюдений количество сахара в крови крыс этой группы животных также оставалось стабильно высоким – 15,9 ммоль/л, практически не изменяясь ($\pm 0,38$ ммоль/л) по сравнению с 7-м днем исследования. При этом максимального значения уровень гликемии натошак достиг к 28-му дню исследования (16,5 ммоль/л). При проведении перорального теста толерантности к глюкозе площадь под кривой «концентрация глюкозы-время» увеличивалась в 3,4 раза по сравнению с контрольными значениями интактной группы животных. Декомпенсация у таких крыс подтверждалась снижением содержания С-пептида в плазме крови, через 3 недели эксперимента его количество достоверно уменьшилось в группе крыс с диабетом на 42,2% ($p \leq 0,05$); наличием кетонных тел в моче; регистрацией полидипсии (потребление воды увеличивалось в среднем в 2,5 раза) и полиурии; отмечалось снижение количества потребляемой пищи (на 15,81% $p \leq 0,05$) и резкая потеря массы тела (на 7-ой день – 22%, к 14-му дню – 25%, а к 21-му дню – 34%). Животные были вялы и апатичны, шерсть животных была серой и тусклой, наблюдались гнойно-эрозивные повреждения тканей хвоста и конечностей, помутнение зрачка и склеры, с большим количеством различной величины кровоизлияний.

При моделировании СД типа 2 также было зарегистрировано повышение уровня глюкозы в крови животных. Так, на 3-и сутки после интоксикации этот показатель составил $14,92 \pm 1,23$ ммоль/л, но к 7-му дню понизился, составив $10,4 \pm 0,13$ ммоль/л, а к 14-му дню – $8,75 \pm 0,22$ ммоль/л ($p \leq 0,05$) и далее практически не менялся вплоть до 4-й недели исследования. Тем не менее, о наличии дисбаланса в углеводном обмене данной группы крыс свидетельствует присутствие глюкозы в моче, количество которой было не стабильно и варьировало в пределах от 3,8 до 1,9 ммоль/л, при этом кетонных тел обнаружено не было. Полученные результаты подтверждались достоверным увеличением площади под кривой «концентрация глюкоза-время» у экспериментальной группы крыс в 1,8 раза по сравнению с интактными животными при проведении глюкозотолерантного перорального теста на 14-й день исследования. Однако стоит отметить, что при этом скорость элиминации глюкозы из периферического кровотока этой группы животных была существенно выше, чем значения, полученные для группы с СД смешанного типа, что, по-видимому, может свидетельствовать о менее выраженном дисбалансе классической триады показателей этого теста: скорости всасывания глюкозы в кишечнике, скорости утилизации глюкозы периферическими тканями и количества секретируемого инсулина. Последнее подтверждается тем, что количество С-пептида в плазме животных с СД типа 2 уменьшалось к 28-му дню исследования на 33,5% ($p \leq 0,05$) по отношению к значению этого показателя у интактных крыс, что соответствует литературным данным, и выше данного показателя, полученного у крыс с СД смешанного типа.

Кроме того, следует отметить, что в этой группе крыс масса тела либо не изменялась, либо снижалась незначительно, а колебания в количестве потребляемой пищи и воды на всем протяжении исследования не отличались от физиологической нормы.

При стрептозототин-индуцированном СД в поджелудочной железе от-

мечаются выраженные деструктивные и воспалительные изменения островков Лангерганса, что сопровождается статистически достоверным уменьшением их размера, объемной доли, а также количества и площади инсулин-позитивных клеток. У неповрежденных в-эндокриноцитов определяется выраженная гипертрофия ядер.

Таблица 1

Данные морфометрического исследования поджелудочной железы

	Интактный контроль	Стрептозототин-индуцированный сахарный диабет	Сахарный диабет 2 типа
Площадь островков, мкм ²	12452,8±1230	1146,4±190,5*	13467,8±1495 [^]
ОД островков, %	23,8±1,3	11,8±1,5*	18,7±0,8* [^]
Количество в-клеток, %	83,2±5,1	7,1±1,0*	20,9±6,8* [^]
Площадь в-клеток, %	72,1±9,4	37,7±8,2*	57,7±8,3* [^]
Размер ядер в-клеток, мкм ²	23,4±0,4	29,5±2,2*	30,1±0,6*

* – достоверно по сравнению с группой интактного контроля.

[^] – достоверно по сравнению с группой стрептозототин-индуцированного диабета.

При моделировании СД типа 2 в поджелудочной железе признаков воспалительной инфильтрации не определялось. По сравнению с контрольной группой происходило статистически достоверное уменьшение объёмной доли островков с формированием очагового интралобулярного и перидуктального склероза. Панкреатические островки хорошо визуализировались и имели средний и крупный размеры. Площадь панкреатических островков была сопоставима с площадью островков у животных контрольной интактной группы. Количество и площадь инсулин-позитивных клеток достоверно уменьшались по сравнению с контрольной группой. Отмечалась гипертрофия

ядер в-эндокриноцитов. Изменения размера, объемной доли панкреатических островков, а также количества и площади инсулин-позитивных клеток по сравнению с моделью стрептозототин-индуцированного диабета носили менее выраженный характер (табл. 1, рис. 1, 2).

В печени животных – как с моделью стрептозототин индуцированного диабета, так и СД 2 типа – определялись явления умеренно выраженной мелкокапельной жировой дистрофии, преимущественно центрлобулярных гепатоцитов. В интактной группе жировая дистрофия гепатоцитов отсутствовала.

У животных с моделью стрептозототин-индуцированного диабета струк-

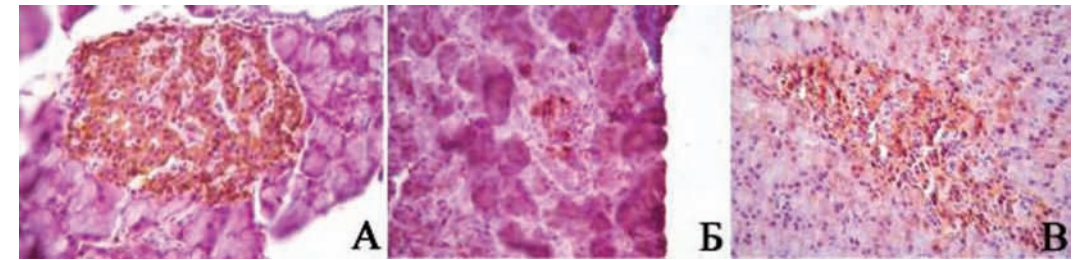


Рис. 1. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет, единичные инсулин-позитивные клетки. В. Модель сахарного диабета 2 типа, уменьшение количества инсулин-позитивных клеток, визуализация диаминобензидином. Ув. х400.

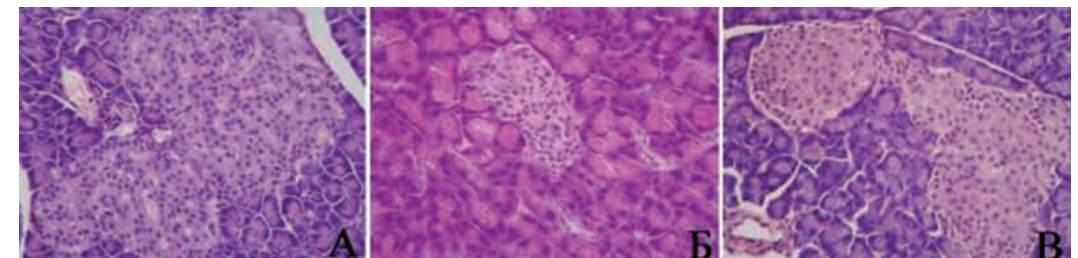


Рис. 2. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет, уменьшение размеров панкреатических островков. В. Модель сахарного диабета 2 типа, гипертрофия ядер в-эндокриноцитов островков. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х400.

турных изменений, характерных для диабетической нефропатии, не определялось. Капиллярные петли клубочков были полнокровны, в эпителии проксимальных и дистальных извитых канальцев определялись дистрофические изменения. В почках животных с моделью СД 2 типа определялась очаговая линейная умеренная флуоресценция IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны большинства клубочков (рис. 3). В

эпителии дистальных и проксимальных извитых канальцев отмечались умеренные дистрофические изменения. В просветах канальцев отмечались гомогенные эозинофильные, PAS-позитивные массы. Признаков расширения мезангиального матрикса, утолщения гломерулярной базальной мембраны, «капсульных капель», «фибриноидных шапочек» или узлового гломерулосклероза не определялось.

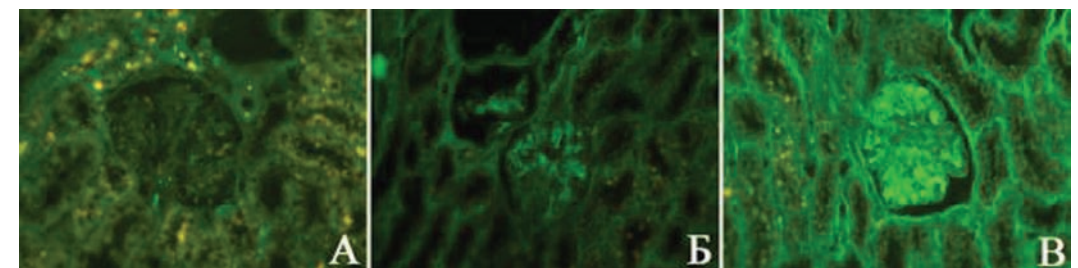


Рис. 3. А. Интактный контроль. Б. Стрептозототин-индуцированный диабет. В. Модель сахарного диабета 2 типа, линейные отложения IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны. Иммунофлуоресценция с антителами к IgG. Ув. х400.

Выводы

По полученным результатам можно заключить, что при экспериментальной модели стрептозотоцин-индуцированного СД с предварительным введением никотинамида повышается устойчивость β -клеток островков Лангерганса к повреждающему действию стрептозотцина, что позволяет воспроизводить состояние в значительной степени близкое диабету типа 2, проявляющемуся в умеренной и стабильной гипергликемии, присутствии глюкозы в моче, без явлений ацидоза. Анализ патогистологических изменений островкового аппарата поджелудочной железы и печени также свидетельствует о развитии структурных изменений, характерных для сахарного диабета 2 типа. Изменения в почках не сопровождаются развитием патогномичных признаков сахарного диабета, однако линейные отложения IgG вдоль гломерулярной базальной мембраны могут расцениваться как ранние проявления диабетической нефропатии. Исследуемая экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 может быть использована при поиске и экспериментальном тестировании новых пероральных антидиабетических средств для лечения инсулинорезистентности, метаболического синдрома и сахарного диабета типа 2.

Список литературы

1. **Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А.** Модификация метода определения перекисей липидов в тесте

с тиобарбитуровой кислотой // Лабораторное дело. 1988. № 11. С. 41-43.

2. **Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г.** Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. №1. С. 16-19.

3. **Костюк В. А., Потапович А. И., Ковалева Ж. В.** Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. 1990. Т.36. №2. С. 88-91.

4. **Моин В. М.** Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. 1986. №12. С. 724-727.

5. **Чистяков Д. А., Савостьянов К. В., Туракулов Р. И.** Гены антиоксидантной защиты и предрасположенность к сахарному диабету // Сахарный диабет. 2000. № 3. С. 15-17.

6. **Islam S., Choi H.** Nongenetic Model of Type 2 Diabetes: A Comparative Study // Pharmacology. 2007. № 79. P. 243-249.

7. **Islam S., Loots D.T.** Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review // Methods Find Exp Clin Pharmacol 2009. 31(4): P. 249-261.

8. **Древаль А.В.** Оценка внутривенного теста толерантности к глюкозе с помощью простой математической модели // Лабораторное дело. 1985. № 5. С. 276-280.

9. **Сарвилина И.В., Макляков Ю.С., Криштопа А.В., Каркищенко В.Н.** Поиск новых мишеней для разработки сахароснижающих лекарственных средств на основе биомоделирования сахарного диабета второго типа и протеомных технологий // Биомедицина. 2008. № 1. С. 5-13.

Experimental model of a type 2 diabetes

A.A. Spasov, M.P. Vorohkova, G.L. Snegur, N.I. Cheplyaeva, M.V. Chepurnova

Due to the high prevalence of diabetes worldwide, extensive research is still being performed to develop new antidiabetic agents and determine their mechanisms of action. A number of diabetic animal models have been developed and improved over the years, of which rodent models are the most thoroughly described. These rodent models can be classified into two broad categories: 1) genetically induced spontaneous diabetes models; and 2) experimentally induced nonspontaneous diabetes models. The popularity of using experimentally induced nonspontaneous models for diabetes research over that of the genetically induced spontaneous models is due to their comparatively lower cost, ease of diabetes induction, ease of maintenance and wider availability. The various experimentally induced type 2 diabetes (T2D) rodent models developed for both routine pharmacological screening and mechanistic diabetes-linked research trials include: streptozotocin (STZ)/alloxan rat models. The use of these models, however, is not without limitations. A T2D model should ideally portray an identical biochemical blood profile and pathogenesis to T2D in humans. Hence, this article will comparatively evaluate experimentally induced rodent T2D models considering the above-mentioned criteria, in order to guide diabetes research groups to more accurately select the most appropriate models given their specific research requirements.

Key words: type 2 diabetes, streptozotocin, nicotinamide.

Экспериментальное биомоделирование для оценки возможности изменения морфотипа слизистой оболочки полости рта

Б.С. Сибатян¹, Г.Д. Капанадзе², М.В. Ломакин¹, А.С. Алейников¹, Г.М. Ожаровская¹, Н.А. Полева¹, Л.Т. Хуцишвили¹

¹ – Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Гия Джемалиевич Капанадзе giyak@yandex.ru

В эксперименте на мини-свиньях разными методами проведена пластика альвеолярной слизистой для формирования кератинизированной и прикрепленной слизистой оболочки, чтобы выяснить, какие методы наиболее показаны в различных клинических ситуациях.

Ключевые слова: эксперимент, мини-свиньи, моделирование, слизистая оболочка.

Для высокоэстетичного результата лечения в современной стоматологии недостаточно воссоздать коронковые части зубов, полностью соответствующие анатомическим и физиологическим параметрам, необходимо также иметь естественный контур мягких тканей, ко-

торые в пришеечных областях зубов состоят из кератинизированной слизистой оболочки. В полости рта, помимо пришеечных областей зубов, кератинизированная слизистая имеется на твердом небе. Свободные небные трансплантаты являются основным средством пласти-