

УДК 577.121:616.379-008

ВІДТВОРЕННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОЇ МОДЕЛІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ У ЩУРІВ

Галенова Т.І., Конопельнюк В.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І.

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
e-mail: konopelnyuk@rambler.ru

Надійшла до редакції 25.03.2010

У експерименті на щурах відтворено стрептозотоцин-індуковану модель цукрового діабету 2 типу. Встановлено зміни основних показників вуглеводного та ліпідного обміну, розвиток стану глюкозотолерантності та інсулінорезистентності у дослідних тварин з моделлю цукрового діабету 2 типу. Зроблено висновок, що змодельований стан є адекватною моделлю цукрового діабету 2 типу у людини. Даний підхід може бути використаний у дослідженні біохімічних та молекулярних механізмів патогенезу цукрового діабету 2 типу на тваринах.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, метаболічні порушення, стрептозотоцину.

ВСТУП

Останні десятиріччя були відзначені значними досягненнями у розумінні природи цукрового діабету (ЦД) 2 типу, його діагностики та лікування. Однак не всі сторони патогенезу цього захворювання достатньо вивчені, й доказом цьому є неухильний ріст захворюваності, висока смертність і частота ускладнень.

З огляду на дані про мультифакторність патогенезу ЦД 2 типу, без сумніву, є актуальним дослідження різних експериментальних моделей інсулінової недостатності, які б на патогенетичному рівні відповідали розвитку цього захворювання у людини і могли б бути основою для пошуку нових перспективних протидіабетичних засобів, шляхів корекції різноманітних ускладнень, які виникають за умов ЦД 2 типу.

Класичною експериментальною моделлю по відтворенню різних гіперглікемічних станів є стрептозотоцин-індукована модель. Природний антибіотик стрептозотоцин (СТЦ) представляє собою N-ацетилглюкозамін, що містить у положенні ацетату залишок нітрозосечовини. Тропність стрептозотоцину до β -клітин обумовлена наявністю в складі його молекули глюкози, за допомогою якого він селективно зв'язується з відповідним переносником у складі плазматичної мембрани клітин, що забезпечує високу акумуляцію препарату в інсулярній тканині [1]. Токсичність стрептозотоцину обумовлена різними факторами. Основним метаболітом СТЦ, з яким в найбільшій мірі пов'язаний його токсичний ефект, є оксид азоту. У серії досліджень доведено [2], що завдяки наявності нітрозного залишка СТЦ здатен

неферментативно вивільнювати вільний NO, який може перетворюватися в пероксинітрид і призводити до процесів вільнорадикального окиснення. Специфічна дія NO на β -клітини полягає також в активації гуанілатциклази, що призводить до підвищення рівня cGMP, інгібування мітохондріальної аконітази та порушень аеробного окиснення глюкози, і як наслідок, пригнічення глюкозостимульованої секреції і синтезу інсуліну [3]. Зниження активності аконітази, яка залучена у цикл Кребса, призводить до повного виснаження внутрішньоклітинних запасів НАДН і АТФ [4], що і є безпосередньо причиною некрозу β -клітин. Слід зазначити, що сам СТЦ і його метаболіти являються алкілюючими агентами, які викликають метилювання залишків гуаніну та аденіну в молекулі ДНК [5]. В сукупності всі ці фактори призводять до загибелі β -клітин підшлункової залози і надають підставу використовувати СТЦ для моделювання експериментального ЦД.

Метою роботи було відтворити в експерименті на щурах стрептозотоцин-індуковану модель ЦД 2 типу і оцінити можливість використання цієї експериментальної моделі для подальшого дослідження молекулярних та біохімічних механізмів патогенезу ЦД 2 типу.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей. Експериментальний ЦД 2 типу викликали одноразовим внутрішньочеревним введенням новонародженим 1-2 добовим щурят розчину стрептозотоцину з розрахунку 80 мг на 1 кг

маси тіла [6]. Контрольну групу складали щури, яким у тому ж віці внутрішньочеревно вводили 10 мМ цитратний буфер (рН 4,5), який використовували для розведення стрептозотоцину.

Через 180 діб у сироватці крові дослідних тварин визначали основні показники вуглеводного та ліпідного обміну. Концентрацію глюкози встановлювали за допомогою приладу «ГЛЮКОФОТ-П» (Україна) згідно інструкції. Вміст глікозильованого гемоглобіну, холестеролу та тригліцеридів вимірювали спектрофотометрично за допомогою наборів реактивів фірми Lachema (Росія). Рівень вільних жирних кислот (ВЖК) встановлювали згідно методу [7]. Рівень інсуліну визначали методом імуноферментного аналізу з використанням набору реактивів (Millipore, Cat. EZRMI-13K).

Біохімічний аналіз крові (вміст альбуміну, загального білка, загального білірубину, креатиніну, сечової кислоти, сечовини, активність лужної фосфатази, аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ), α -амілази) проводили за допомогою напівавтоматичного біохімічного аналізатора Microlab 300 (Vital Scientific, Нідерланди).

Одним з основних підтверджень розвитку стрептозотоцин-індукованого ЦД 2 типу було встановлення глюкозотолерантності та інсулінорезистентності у групі дослідних тварин з моделлю ЦД 2 типу.

Пероральний тест на толерантність до глюкози проводили згідно рекомендацій, як запропоновано у роботі [8]. Перед проведенням тесту натщесерце тварини були анестезовані за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг. Визначали концентрацію глюкози у крові, після чого за допомогою зонду щурам *per os* вводили розчин глюкози у загальному об'ємі 2 мл із розрахунку 2 г/кг маси тварини. За допомогою внутрішньочеревного катетера через 30, 60, 90 та 120 хв відбирали проби крові та визначали концентрацію глюкози. За результатами тесту будували глікемічні криві, які показують, наскільки швидко нормалізується рівень цукру у крові контрольних тварин та щурів з моделлю ЦД 2 типу.

Для підтвердження розвитку стану інсулінорезистентності у дослідних тварин визначали чутливість периферичних тканин до дії інсуліну за допомогою інсуліно-глюкозотолерантного тесту [9] проведеного з власними модифікаціями. Перед проведенням тесту натщесерце тварини були анестезовані за допомогою інтраперитонеальної ін'єкції тіопенталу натрію у дозі 40 мг/кг. Після встановлення концентрації глюкози у крові, щурам внутрішньочеревно вводили розчин глюкози у загальному об'ємі 0,2 мл із розрахунку 0,7 г/кг маси

тварини та розчин інсуліну ("Монодар", Україна) з розрахунку 0,175 U/кг маси тварини. За допомогою внутрішньочеревного катетера через 2, 4, 6, 8, 10, 20 та 30 хв від моменту введення інсуліну відбирали проби крові та визначали концентрацію глюкози. Глікемічні криві, побудовані за результатами тесту, відображають, наскільки швидко нормалізується рівень глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін у групі контрольних тварин та щурів з моделлю ЦД 2.

Статистичний аналіз здійснювали за допомогою прикладних програм статистичного аналізу Microsoft Excel. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток ЦД 2 типу супроводжується тривалими порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів та систем. Одним з основних діагностичних критеріїв розвитку ЦД є визначення рівня глікемії натще.

У ході досліджень нами встановлено, що концентрація глюкози в крові тварин контрольної групи коливалася в межах 4,2-6,8 ммоль/л. Показано, що розвиток експериментального стрептозотоцин-індукованого ЦД 2 типу супроводжувався підвищенням вмісту глюкози в крові натще в 1,5 рази порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1, А). Для подальших досліджень у групу дослідних тварин з моделлю ЦД 2 типу відбирали тварин з рівнем глікемії 8-14 ммоль/л.

Показано підвищення рівня глікозильованого гемоглобіну у крові тварин з моделлю ЦД у 3,5 раз (рис. 1, Б) порівняно з контролем, що може бути показником довготривалої гіперглікемії та прогностичним маркером ускладнень, що супроводжують розвиток досліджуваної патології.

При ЦД 2 типу порушення вуглеводного метаболізму поєднуються з вираженими змінами ліпідного обміну. У ході досліджень нами встановлено, що за умов розвитку стрептозотоцин-індукованого ЦД 2 типу відбувалося підвищення концентрації тригліцеридів в 1,7 раза відносно їх вмісту в крові контрольних щурів (рис. 1, В). Слід відмітити зростання рівня холестеролу в крові в 2,4 раза у дослідних тварин з експериментальним ЦД порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1, Г). Вміст ВЖК у сироватці крові щурів з експериментальним ЦД 2 типу був підвищений в 3 рази порівняно з контролем (рис. 1, Д).

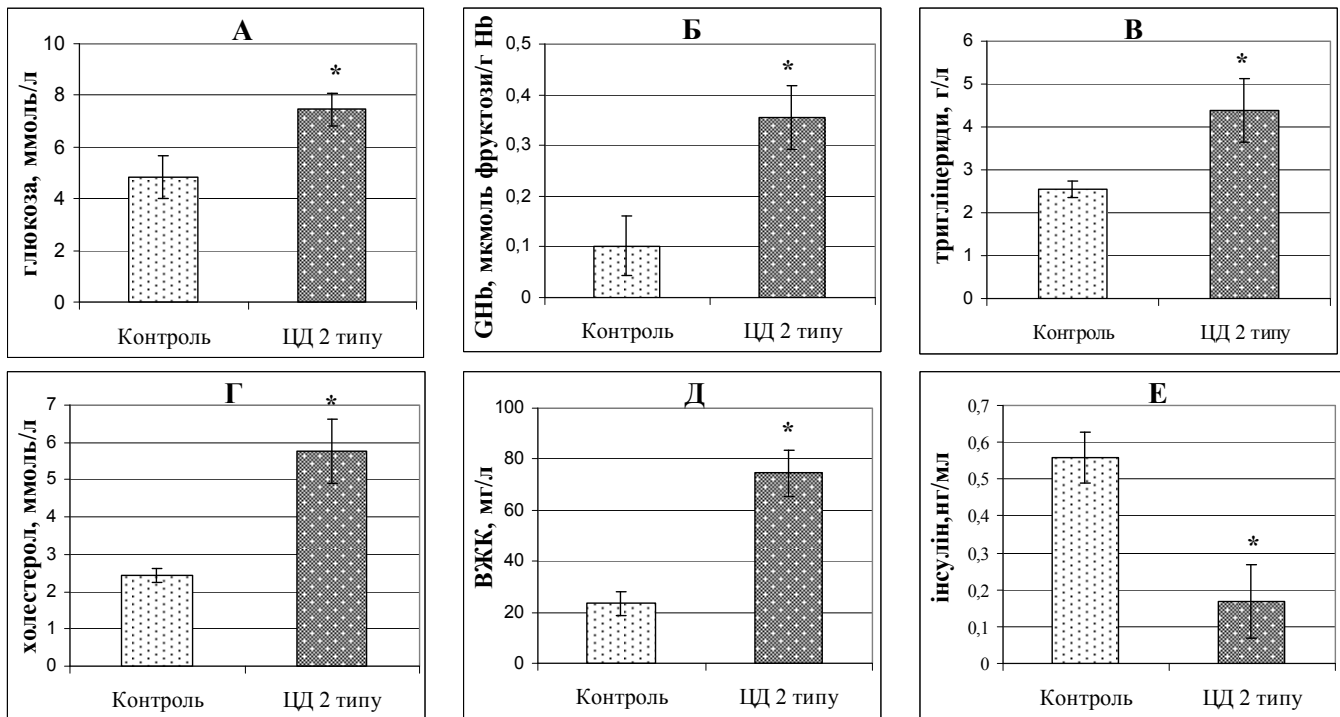


Рис. 1. Концентрація глюкози (А), глікозильованого гемоглобіну (ГНб) (Б), тригліцеридів (В), холестеролу (Г), ВЖК (Д) та інсуліну (Е) у сироватці крові контрольних щурів та тварин з моделлю ЦД 2 типу ($M \pm m$; $n = 8$):

Примітка: * - $p < 0,05$ різниці достовірні по відношенню до контролю

Такі зміни ліпідного метаболізму можуть бути наслідком гіперглікемії та інсулінорезистентності периферичних тканин і підтверджувати розвиток експериментального ЦД 2 типу у групі дослідних тварин.

Показано зниження концентрації інсуліну у 3,5 рази у сироватці крові щурів з експериментальною моделлю ЦД 2 типу порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 1, Е). Зниження вмісту інсуліну може бути наслідком порушення функціонування інсулярного апарату β -клітин підшлункової залози за умов досліджуваної патології.

Отже, встановлені зміни основних показників вуглеводного та ліпідного обмінів відповідають клінічній картині, що супроводжує розвиток ЦД 2 типу і узгоджується з метаболічними порушеннями у людей хворих на інсуліннезалежний ЦД.

У таблиці 1 наведені основні біохімічні показники сироватки крові щурів, за якими можна охарактеризувати функціональний стан організму, та оцінити глибину метаболічних порушень за умов досліджуваної патології.

Встановлено, що розвиток стрептозотозин-індукованого ЦД 2 типу супроводжувався зміною основних біохімічних показників крові експериментальних тварин (табл. 1). Показано підвищення вмісту загального білірубину (в 1,35 рази), зниження рівня креатиніну, сечової кислоти та сечовини (у 1,25, 1,3 та 1,6 рази відповідно) у сироватці крові дослідних тварин з моделлю ЦД 2 типу. У ході досліджень нами встановлено, що за

умов розвитку стрептозотозин-індукованого ЦД 2 типу не відбувається достовірних змін вмісту альбуміну та загального білка відносно їх рівня у крові контрольних щурів.

Показано зростання активності основних печінкових трансаміназ – АЛТ та АСТ у 2,4 та 1,4 рази відповідно у тварин з моделлю ЦД 2 типу порівняно зі значеннями контрольної групи тварин. Відмічено підвищення активності лужної фосфатази в 1,2 рази та α -амілази у 1,4 у сироватці крові експериментальних тварин порівняно з контролем.

Таблиця 1.

Показники біохімічного аналізу сироватки крові щурів за умов експериментального ЦД 2 типу ($M \pm m$, $n=8$)

Показник	Контроль	ЦД 2 типу
Білірубін загальний, мкмоль/л	1.243 \pm 0,26	1,68 \pm 0,08*
АЛТ, од/л	27,14 \pm 5,08	64,87 \pm 9,26*
АСТ, од/л	154,43 \pm 11,67	208 \pm 38*
Лужна фосфатаза, од/л	204,5 \pm 12,34	249,5 \pm 2,12*
α -амілаза, од/л	513,63 \pm 87,73	723,2 \pm 138,74*
Креатинін, мкмоль/л	82,16 \pm 8,83	65,66 \pm 5,28*
Сечова кислота, мкмоль/л	180,49 \pm 27,51	139,28 \pm 17,55*
Сечовина, ммоль/л	10,97 \pm 1,97	6,73 \pm 1,16*
Загальний білок, мг/мл	1,755 \pm 0,19	1,723 \pm 0,06
Альбумін, г/л	37,76 \pm 3,53	37,79 \pm 2,5

Примітка: * - $p < 0,05$ різниці достовірні по відношенню до контролю.

Встановлені зміни біохімічних показників крові за умов моделювання ЦД 2 типу вказують на суттєві порушення функціонування різних органів та систем, що загалом узгоджується з особливостями клінічного перебігу цієї патології і може бути додатковим підтвердженням формування стійкого стану ЦД 2 типу у дослідних тварин.

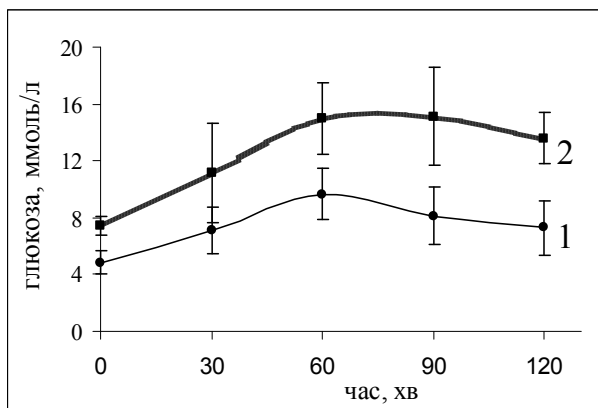


Рис. 2. Глікемічні криві перорального глюкозотолерантного тесту: 1 – у контрольній групі тварин; 2 – у щурів з експериментальною моделлю ЦД 2 типу

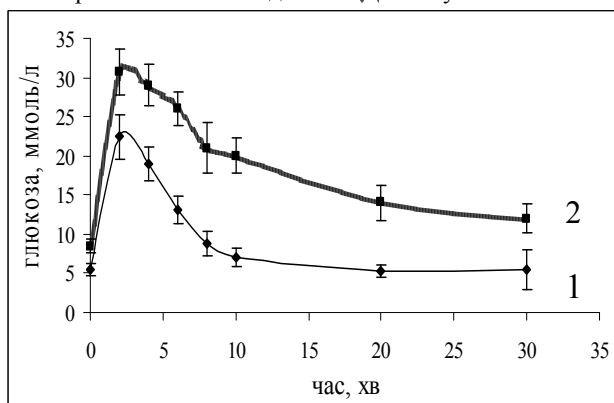


Рис. 3. Глікемічні криві отримані у ході інсуліно-глюкозотолерантного тесту: 1 – у групі контрольних тварин; 2 – у щурів з експериментальною моделлю ЦД 2 типу.

Розвиток ЦД 2 типу часто супроводжується порушенням толерантності до глюкози. Термін «порушення толерантності до глюкози» використовують для характеристики патологічного стану, при якому рівень глюкози у плазмі крові перевищує 7,8 ммоль/л через 2 години після перорального прийому глюкози.

З аналізу кривих глюкозотолерантного тесту встановлено, що у тварин з експериментальним стрептозоточин-індукованим ЦД 2 типу рівень глікемії через 2 години від моменту введення глюкози залишався вищим за 13 ммоль/л (рис. 2).

Отримані результати можуть вказувати на порушення толерантності до глюкози у групі тварин з моделлю ЦД 2 типу. В клініці порушену толерантність до глюкози не прийнято трактувати як діагностичний маркер ЦД, а лише як показник

підвищеного ризику розвитку діабету. У середньому лише 30% пацієнтів з порушеною толерантністю до глюкози стають діабетиками.

Інсулінорезистентність – це патологічний стан, який характеризується низьким рівнем поглинання глюкози периферичними тканинами організму під дією інсуліну, що є результатом нечутливості клітин і тканин різних органів до цукрознижувальної дії цього гормону.

Сьогодні інсулінорезистентність розглядають як основний патогенетичний фактор розвитку ЦД 2 типу, а дослідження чутливості периферичних тканин до дії інсуліну є основним діагностичним критерієм підтвердження стану інсулін-незалежного ЦД [10].

Глікемічні криві, наведені на рис. 3 відображають динаміку нормалізації рівня глюкози в крові у відповідь на екзогенний інсулін у групі контрольних тварин та щурів з моделлю ЦД 2.

Для кількісного обрахунку результатів отриманих у ході інсулін-глюкозотолерантного тесту за індекс чутливості периферичних тканин до інсуліну приймали швидкість зниження глюкози в крові після введення інсуліну, яку визначали за зміною показників концентрації глюкози на 2 і 10 хвилини від моменту введення інсуліну.

З аналізу отриманих даних встановлено зниження швидкості засвоєння глюкози периферичними тканинами у тварин з експериментальним ЦД 2 майже в 1,5 раза порівняно з контрольною групою (рис. 3). Отримані результати можуть вказувати на стан інсулінорезистентності, який відіграє важливу роль у патогенезі ЦД 2 типу. Втрата чутливості клітин печінки, м'язової та жирової тканин до дії інсуліну є однією з ключових причин метаболічних порушень вуглеводного та ліпідного обміну за умов ЦД 2 типу та одним з основних факторів розвитку та прогресування його ускладнень.

ВИСНОВКИ

За допомогою стрептозоточину відтворено модель ЦД 2 типу, яка супроводжується зміною основних показників вуглеводного та ліпідного обміну, появою глюкозотолерантності та інсулінорезистентності. Отримані результати дозволяють стверджувати, що стрептозоточин-індукована модель ЦД є адекватною та близькою до ЦД 2 типу у людини і може бути використана в дослідженнях на тваринах для більш поглибленого вивчення біохімічних та молекулярних механізмів патогенезу ЦД 2 типу.

Література

1. *Szkudelski T.* The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas // *Physiol. Res.* – 2001. – Vol. 50, № 6. – P.537-546.

2. Turk J., Corbett J.A., Ramanadham S. et al. Biochemical Evidence for Nitric Oxide Formation from Streptozotocin in Isolated Pancreatic Islets // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. – Vol. 197, № 3. – P.1458-1464.
3. Stevens R.B., Sutherland D.E., Ansite J.D. et al. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes? // J. Immunol. – 1997. – Vol. 159, № 11. – P.5329-2335.
4. Yang H., Wright J.R. Human beta-cells are exceedingly resistant to streptozotocin in vivo // Endocrinology. – 2002. – Vol. 143, № 7. – P.2491-2495.
5. Caedinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. Poly(ADP-ribose)polymerase activation determines strain sensitivity to streptozotocin-induced beta-cell death in inbred mice // J. Mol. Endocrinol. – 1999. – Vol. 22. – P.65-70.
6. Hemmings S.J., Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2000. – Vol. 32. – P. 905-919.
7. Itaya A. A more sensitive and stable colorimetric determination of free fatty acids in blood // J. Lipid Res. – 1977. – Vol. 18 – P.663-665.
8. Islam M.A., Akhtar M.A., Khan M.R. et al. Oral glucose tolerance test (OGTT) in normal control and glucose induced hyperglycemic rats with *Coccinia cordifolia* L. and *Catharanthus roseus* L. // Pak. J. Pharm. Sci. – 2009. – Vol. 22, № 4. – P.402-404.
9. Zhang F., Ye C., Li G., Ding W. et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters // Exp.Anim.–2003.–Vol. 52, № 5.–P.401-407.
10. Yi Lin, Zhongjie Sun. Current views on type 2 diabetes // J. Endocrinol. – 2010. - Vol. 204. – P. 1–11.

ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА У КРЫС

Галенова Т.И., Конопельнюк В.В., Савчук А.Н., Остапченко Л.И.

В эксперименте на крысах воспроизведена стрептозотоцин-индуцированная модель сахарного диабета 2 типа. Установлены изменения основных показателей углеводного и липидного обмена, развитие состояния глюкозотолерантности и инсулинорезистентности у подопытных животных с моделью сахарного диабета 2 типа. Сделан вывод, что смоделированное состояние является адекватной моделью сахарного диабета 2 типа у человека. Данный подход может быть использован в исследовании биохимических и молекулярных механизмов патогенеза сахарного диабета 2 типа на животных.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, метаболические нарушения, стрептозотоцин.

REPRODUCTION OF THE STREPTOZOTOCIN-INDUCED EXPERIMENTAL MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS

Galenova T.I., Konopelnjuk V.V., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I.

Streptozotocin-induced rat model of type 2 diabetes is described. Changes in carbohydrate and lipid metabolism as well as the development of glucose tolerance and insulin resistance in animals with experimental type 2 diabetes were observed. We have concluded that the simulated state is an adequate model of type 2 diabetes in humans. This approach can be used to study biochemical and molecular mechanisms of type 2 diabetes pathogenesis in animals.

Key words: type 2 diabetes, metabolic disorders, streptozotocin.