

DOI: 10.26693/jmbs02.06.041

УДК 616.379 – 008.64:616 – 092.9

Савицький І. В., Сарахан В. М.,
Кузьменко І. А., Якимчук Н. В.**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ:
ОСОБЛИВОСТІ МЕТОДИК МОДЕЛЮВАННЯ**

Одеський національний медичний університет

profgen@ukr.net

Цукровий діабет являється важким соціально-економічним тягарем у будь-якій країні світу й посідає одне з топових місць в рейтингу хронічних захворювань. За останні роки його поширеність невинно збільшується. Розвиток гіперглікемічних ускладнень, що також мають тенденцію до зростання, суттєво знижує якість життя пацієнта, зменшує його працездатність, знижує на 10–30% тривалість життя. Відомо, що у хворих на цукровий діабет значно зростає ризик розвитку серцево-судинної патології.

За останні кілька десятиліть було розроблено безліч моделей цукрового діабету. Умовно їх можна поділити на такі великі групи: інвазивні (повне чи часткове хірургічне видалення підшлункової залози) та неінвазивні (хімічні, ендокринні, імунні, генетичні методи моделювання цукрового діабету). Із усіх представлених методик моделювання експериментального діабету найбільш поширеними та визнаними в світі являються хімічні методи (використання токсичних речовин – стрептозоцину, аллоксану та ін.). Перевагами даних методик являється відносно високий відсоток розвитку ЦД, можливість вибору змодельованої стадії ЦД, простота виконання. Недоліком – існує ризик травматизації та загибелі тварин, внаслідок високої токсичності взятих сполук.

Ключові слова: цукровий діабет, модель експерименту, внутрішньочеревне введення, лабораторні тварини.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України» (ДП «УкрНДІ МТ»), м. Одеса «Удосконалення профілактики та лікування основних екозалежних та професійно обумовлених захворювань на основі вивчення особливостей їх етіології та патогенезу», № державної реєстрації 0116U008822, строки виконання 2016–2019 рр.

Вступ. Однією із важливіших медико-соціальних та економічних проблем у будь-якій

країні світу є діагностика та своєчасне лікування хворих на цукровий діабет (ЦД). Поширеність цього захворювання та його ускладнень зумовлюють високий розвиток інвалідності населення. Відомо, що за десять останніх років пацієнтів із ЦД збільшилася у 1,5 рази. Станом на початок 2015 року в Україні було зареєстровано близько 1 млн 198,5 тис. хворих (без урахування статистики деяких районів Донецької та Луганської областей, АР Криму). Фактично кожен третій зі 100 чоловік страждає на ЦД, що становить 2,9% від усього населення країни [2].

Переважна більшість (90%) страждають на цукровий діабет другого типу. Це зумовлено причинами захворювання (неправильне висококалорійне харчування, ожиріння, клімактеричний період, гендерний вік та ін.). Та все ж близько 85 тис. людей хворіють на цукровий діабет першого типу, який притаманний особам дитячого або досить молодого віку [2, 11].

Частота ускладнень при ЦД також має загрозливу статистику. Близько 80–90% хворих без адекватної терапії страждають на діабетичну ретинопатію, що являється однією з провідних причин сліпоти в старшому віці. В 35–40% хворих на ЦД діагностовано діабетичну нефропатію, а у 70% – атеросклероз магістральних судин [2].

Захворювання, які є коморбідними та/або стають наслідком цукрового діабету – це атеросклероз, артеріальна гіпертензія, ожиріння, високий ризик виникнення інсульту та інфарктів, розвиток мікро- та макроангіопатій. Часто поєднання кількох діагнозів зумовлює підвищений ризик виникнення ускладнень [11].

Окрім вищезазначених даних, значну частку захворюваності становлять так звані приховані форми цукрового діабету, тому фактичні цифри набагато більші за статистичні [3, 10, 12].

Тож високі показники захворюваності та наявності супутніх хвороб становлять велику проблему. Цукровий діабет значно знижує якість життя пацієнта, зменшує його працездатність, на 10–30% скорочує тривалість життя [2, 11].

Мета дослідження – виявлення оптимального способу моделювання цукрового діабету в умовах

експерименту для подальшого дослідження патофізіологічних механізмів ЦД і способів його корекції.

За останні кілька десятиліть була розроблена достатня кількість моделей цукрового діабету. Основною метою їх було відтворення одного із механізмів розвитку захворювання, а саме блокування синтезу інсуліну та зменшення його секреції [1, 4–6, 8].

Умовно їх можна поділити на 2 групи: інвазивні та неінвазивні. Інвазивні згруповані на безпосередньому впливі на островки Лангерганса. Це здійснюється шляхом повного (тотального) чи часткового (субтотального) хірургічного видалення підшлунквої залози.

Перевагами хірургічної методики моделювання ЦД є скорочений підготовчий період перед експериментом (ефект після видалення ПЗ настає в перші години). До недоліків слід віднести значну травматизацію тварин, складність виконання (особливо на малих тваринах), наявність специфічного обладнання та навичок дослідника. Саме тому більшого поширення отримала інша група методик моделювання ЦД.

До неінвазивних входять:

- Хімічні методи моделювання (токсична, ендокринна, імунна моделі).
- Генетичні методи моделювання.
- Додаткові фізіологічні методи моделювання.

Сенс неінвазивних методів полягає в тому, що в тіло експериментальної тварини вводять різні речовини, що руйнують клітини підшлунквої залози або інгібують синтез та вихід у кров інсуліну. У хімічному методі використовуються такі токсичні препарати, як аллоксан, стрептозотоцин (СТЗ), дитизон та ін. Ендокринна модель базується на тривалому введенні гормонів гіпофізу, АКТГ, гормону росту, які викликають метагіпофізарний діабет, а глюкокортикоїди – метастероїдний. У імунній моделі використовуються антитіла проти інсуліну, а у генетичній – виведені чисті лінії мишей та інших тварин з спадково-обумовленою формою цукрового діабету.

У літературі частіше всього зустрічаються хімічні моделі цукрового діабету. Частота використання стрептозотоцинової методики складає близько 70% випадків, 29% – аллоксанової, решта – інші речовини. Незважаючи на більшу перевагу у використанні стрептозотоцину, за останні роки зросла зацікавленість до аллоксанової моделі. Введення цієї хімічної сполуки призводить до вибіркового некрозу островців Лангерганса підшлунквої залози. Внаслідок цього розвивається класична картина захворювання.

Тим не менш, у застосуванні аллоксанової моделі існує високий ризик загибелі тварин через значну токсичність сполуки.

Розглянемо кілька прикладів хімічної моделі з використанням стрептозотоцину:

1. Класична модель Ульянова-Тарасова.

Вона полягає в тому, що внутрішньовенно та/чи внутрішньом'язово безпородним самцям білих щурів вводили протамін-сульфат протягом 3-х тижнів, у дозування 1 мг на 100г маси тіла тварини, розведеного в об'ємі 0,5 мл 0,85%-ого розчину NaCl, кратністю 3 рази на добу. Забір крові проводився із яремної вени, v. jugularis. З метою запобігання згортання крові застосовували антикоагулянт – 3,8% цитрат натрію. Експериментальні тварини, яким був змодельований цукровий діабет, отримували замісну терапію інсуліном. Досліджувані щурів утримували на стандартному раціоні віварію. Використані препарати протамін-сульфату, інсуліну для ін'єкцій та гепарину фармацевтичної компанії «Гедеон Ріхтер» (Угорщина).

2. Експериментальна модель стрептозотоцину-55.

Цукровий діабет моделюють шляхом введення внутрішньовенно натщесерце СТЗ у розрахунку 55мг на кг маси тіла тварини й розведені в буферному натрієво-цитратному розчині, рН якого становив 4,5. Забір крові проводився с хвостової вени на 1-й та 2-й тижні з початку експерименту. Вміст глюкози визначався в першій половині дня, у ранковий час (одна й та ж година, за бажанням експериментатора), за умови вільного доступу тварин до їжі вночі. Умовами включення в експеримент були тварини із рівнем глікемії більше 300 мг/л, однакової маси та статі. Подальше спостереження розвитку захворювання проводилося на відібраних тваринах, яким проводилася інсулінотерапія (0-2 од. п/шк. 2–5 разів на тиждень).

3. Експериментальна модель стрептозотоцину-60.

СТЗ використовували в дозуванні 60 мг/кг з обмеженим доступом їжі вночі напередодні забору крові. Під час експерименту щурів утримували на стандартному віварійному раціоні. Виводили з експерименту шляхом декапітації з попередньою анестезією тіопенталом натрію (50 мг/кг) на 10-й та 28-й день від моменту введення стрептозотоцину. Щурам проводилося біохімічне та гістохімічне дослідження підшлунквої залози.

Приклади хімічних моделей з використанням аллоксану:

1) Класична модель (одноразове введення).

На статевозрілих безпородних білих щурах масою 280–350 г. моделюють цукровий діабет шляхом введення одноразово внутрішньочеревним методом 200 мг/кг аллоксану [4].

2) Модифікована модель (дрібно введення).

Ця методика полягає в тому, що тваринам вводять аллоксан дрібно з інтервалом у пару днів. Так, спершу використовують дозування 150 мг/кг,

потім 100 мг/кг. Попередньо щурів тримали на голодній дієті протягом 24 годин. Доступ до води був необмежений. В результаті використання даної моделі отримали гіперглікемію в експериментальних тварин, аналогічну інсулінозалежному цукровому діабету 1 типу [1].

Аллоксанову модель можливо корегувати відповідно до мети дослідження. Для отримання субкомпенсованої форми цукрового діабету аллоксан вводять в таких пропорціях: у перший день 5 мг/100г розчину внутрішньочеревним введенням, у восьмий та п'ятнадцятий день – по 7 мг/100г. Для розвитку некомпенсованої форми ЦД у дозуванні 10 мг/100г маси тіла тварини розчин аллоксану вводять на перший, третій та п'ятий день [1, 4].

Вибір внутрішньочеревного способу введення базується на легкості виконання процедури та малій травматизації тварин. Застосування хімічних речовин, які руйнують острівці Лангерганса, зумовлюють високу вірогідність виникнення ЦД. Але наявний високий ризик загибелі тварин, внаслідок токсичної дії цих сполук при передозуванні.

Слід пам'ятати й про те, що усі наведені хімічні моделі цукрового діабету патогенетично зумовлюють розвиток інсулінозалежного типу, тобто ЦД 1 типу. В той час, як в Україні поширений інсулінонезалежний. Для моделювання цього типу застосовують фізіологічні методи. Тобто тварин утримують на висококалорійній легкозасвоюваній дієті із вільним доступом до водного розчину фруктози. Експериментальних щурів утримують у тісних клітках для обмеження їх фізичної активності.

Внаслідок такого режиму у організмі тварин розвивається резистентність рецепторів до дії інсуліну з подальшим зростанням концентрації глюкози у крові. Тобто обумовлене виникнення цукрового діабету 2 типу. Недоліком даної методики є тривале утримання тварин, наявність супутніх патологій (ожиріння, захворювань опорно-рухового апарату, атеросклероз судин та ін.), неможливість моделювання стадій ЦД.

Отже, підсумовуючи вищезазначені дані, цукровий діабет є поширеним захворюванням не тільки в Україні, але в усьому світі. З усіх представлених методик моделювання експериментального діабету найбільш поширеними та визнаними в світі є хімічні методи (використання токсичних речовин – стрептозоцину, аллоксану та ін.). Перевагами даних методик є простота у виконанні та високий відсоток розвитку ЦД, можливість вибору змодельованої стадії ЦД, простота виконання. Недоліком – існує ризик травматизації та загибелі тварин, внаслідок високої токсичності взятих сполук.

Висновки. З усіх представлених моделей експериментального діабету найбільш патогенетично обґрунтованою ми вважаємо аллоксанову із додаванням розчину фруктози. Таке поєднання дозволяє відтворити картину цукрового діабету в експерименті за 30 діб, зменшити токсичний ефект, а разом із цим значно зменшити відсоток загибелі тварин.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому плануються дослідження ефективності методів патогенетичної корекції ендотеліальної дисфункції у щурів зі змодельованим цукровим діабетом по вищевказаній методиці.

References

1. Alekseeva NT, Gluhov AL, Ostroushko AP. Rol kletok fibroblasticheskogo differona v protsesse zazhivleniya ran. *Vestnik jeksperim i klinich hirurgii*. 2012; 5 (3): 601-8. [Ukrainian].
2. Dovidnik osnovnih pokaznikov dijagnostiki endokrinologichnoї sluzhbi Ukraїni za 2003 rik. *Endokrinologija*. 2014; 1 (19): 1-40. [Ukrainian].
3. Dreval AV. *Lechenie saharnogo diabeta i soputstvujushhих zabolovanij*. M: Eksmo, 2010. 352 s. [Russian].
4. Baranova VG. *Eksperimentalnyj saharnyj diabet*. L: Nauka, 1983. 240. [Russian].
5. Kresjun NV. Nejrodegenerativnye izmenenija setchatoj obolochki glaz kryс so streptozotocinovym diabetom v razlichnyh uslovijah jeksperimental'nogo lechenija. *Zaporozhskij medicinskij zhurnal*. 2014; 4 (85): 21-5. [Russian].
6. Mozhejko LA. Eksperimental'nye modeli dlja izuchenija saharnogo diabeta. Chast' I. Alloksanovyj diabet. *Zhurnal GGMU*. 2013; 3: 26-9. [Russian].
7. Proshin AV. Morfologicheskaya kharakteristika ranevogo protsessa u bolnykh s gnoyno-nekroticheskimi formami porazheniy nizhnikh konechnostey pri sakharom diabete. *Vestnik Novg gos un-ta. Seria: Medicinskie nauki*. 2010; 59: 63-6. [Russian].
8. Dzhafarova RE. Sravnitel'noe issledovanie razlichnyh modelej alloksan-inducirovannogo saharnogo diabeta. *Kazanskij medicinskij zhurnal*. 2013; 6 (94): 915-9. [Russian].
9. Sarkisov DS, Perov YuYa. *Mikroskopicheskaja tehnik: rukovodstvo dlja vrachej i laborantov*. M: Medicina, 1996. 544 p. [Russian].
10. *Saharnyj diabet: diagnostika, lechenie, profilaktika*. Pod red. II Dedova, MV Shestakovoj. M: OOO «Izdatel'stvo «MIA», 2011; 808. [Russian].
11. Tkachenko VI. Analiz poshirenosti ta zahvorjuvanosti na cukrovij diabet sered naselennja svitu ta Ukraїni za 2003–2013 rr. *Liki Ukraїni pljus*. 2013; 4 (21): 55-9. [Ukrainian].

12. Hlebnikova AN, Marycheva NV. Osobennosti naruzhnoj terapii patologii kozhi u bol'nyh saharnym diabetom. *Klinicheskaja dermatol i venerol.* 2011; 6: 52-8. [Russian].
13. Abramson SB, Attur M. evelopments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11 (3): 227. PMID: 19519925. PMCID: PMC2714096. doi: 10.1186/ar2655.
14. Jamshidzadeh A, Azarpira N. The effects of topical sildenafil on wound healing in rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2011; 7 (1): 43-8.
15. Böger RH, Ron ES. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev.* 2005; 10 (1): 14–23. PMID: 15771559.
16. Whiting DR. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice.* 2011; 94: 311-21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2011.10.029>.
17. Creager MA, Lüscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences and medical therapy: Part I. *Circulation.* 2003; 108: 1527-32. PMID: 14504252. DOI: 10.1161/01.CIR.000.091257.27563.32.
18. Wever RM, Lüscher TF, Cosentino F, et al. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 1998; 97: 108-12.

УДК 616.379 – 008.64:616 – 092.9

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА:
ОСОБЕННОСТИ МЕТОДИК МОДЕЛИРОВАНИЯ**

Савицкий И. В., Сарахан В. М., Кузьменко И. А., Якимчук Н. В.

Резюме. Сахарный диабет является важной социально-экономической проблемой любой страны мира. Он состоит в списке хронических заболеваний, что нуждаются в длительной заместительной терапии, и за последние годы в Украине его распространённость только увеличивается. Развитие гипергликемических осложнений, что так же имеет тенденцию к увеличению числа случаев, существенно снижает качество жизни пациента, его работоспособность, уменьшает на 10–30% продолжительность жизни. Известно, что у больных значительно повышается риск развития сердечно-сосудистой патологии.

За последние несколько десятилетий было разработано множество моделей сахарного диабета. Условно их можно поделить на такие большие группы: инвазивные (полное или частичное иссечение поджелудочной железы) и неинвазивные (химические, эндокринные, иммунные, генетические методы моделирования сахарного диабета). Из всех представленных методик моделирования экспериментального диабета наиболее часто в литературе встречаются химические методы с использованием токсических веществ – стрептозоцина, аллоксана и др. преимуществами данных методик является простота использования, относительно высокий процент развития СД, возможность выбора стадии СД. Недостатками – риск травматизации и гибели живых животных во время введения, вследствие высокой токсичности при передозировке соединения.

Ключевые слова: сахарный диабет, экспериментальная модель, внутрибрюшное введение, лабораторные животные.

UDC 616.379 – 008.64:616 – 092.9

Experimental Study of Diabetes: Peculiarities of Simulation Techniques

Savitskii I. V., Sarahan V. M., Kuzmenko I. A., Yakymchuk N. V.

Abstract. Diabetes is a heavy socio-economic burden in any country in the world and is ranked one of the top places in the ranking of chronic diseases. In recent years, its prevalence has been steadily increasing. The development of hyperglycemic complications, which also have a tendency to increase, significantly reduces the patient's quality of life, his/her ability to work, and his/her life expectancy by 10–30%. It is known that patients with diabetes significantly increase the risk of cardiovascular disease. Maintaining blood glucose levels within the limits of physiological standards requires a lot of costs, both economic and physical.

Over the past few decades, many models of diabetes have been developed. These models can be divided into such large groups as: invasive (full or partial surgical removal of the pancreas) and non-invasive (chemical, endocrine, immune, genetic methods for the simulation of diabetes). Of all the experimental methods described in the simulation of experimental diabetes, the most common and recognized in the world are chemical methods (to use a streptozocin, alloxan, etc.).

The advantages of the surgical procedure for simulating the DM are the reduced preparatory period before the experiment (the effect after the removal of software occurs in the first hours). But the disadvantages include a significant injury to animals, the complexity of the implementation (especially in small animals), the availability

of specific equipment and skills, high cost. That is why the chemical methods of DM simulation have become more widely used. The main point of DM simulation is to introduce various substances destroying the pancreatic cells or inhibit the synthesis and release into the peripheral blood of insulin into the experimental animal's body.

The advantages of these techniques are the ease of implementation and a relatively high percentage of development of diabetes. Its disadvantage is that there is a risk of trauma and death of animals due to the high toxicity of the compounds taken. In the immune model, antibodies are used against insulin, and in the genetic – the removal of pure lines of mice and other animals with a hereditary-conditioned form of diabetes.

Summing up the above data, diabetes is a common disease not only in Ukraine but throughout the world. The curiosity of scientists is due to high disability of patients with diabetes and the development of complications. Of all the experimental methods described in the simulation of experimental diabetes, the most common and recognized in the world are chemical methods.

We consider alloxan model with the addition of a fructose solution to be the most pathogenically grounded of all the presented experimental diabetes` models. This combination allows you to reproduce the picture of diabetes in an experiment for 30 days, reduce the toxic effect, and at the same time significantly reduce the animals' death rate.

Aspects for further research are connected with the study of the efficacy of pathogenic correction of endothelial dysfunction in rats with simulated diabetes according to the aforementioned procedure.

Keywords: diabetes, experimental model, intraperitoneal vision, laboratory animals.

Стаття надійшла 22.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування