

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЕЙ АЛЛОКСАН-ИНДУЦИРОВАННОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Рена Энвер кызы Джафарова*

Научно-исследовательский центр Азербайджанского медицинского университета, г. Баку

Реферат

Цель. Изучить в сравнительном аспекте течение патологического процесса в классической и модифицированной нами моделях аллоксан-индуцированного сахарного диабета.

Методы. Эксперименты проводили на беспородных белых крысах половозрелого возраста, разделённых на две группы: первая группа (25 крыс) – животные, которым однократно вводили 200 мг/кг аллоксана (классическая модель), вторая группа (25 крыс) в 1-й день получала 150 мг/кг, во 2-й день – 100 мг/кг, через день – 100 мг/кг аллоксана. В качестве контроля исследовали по 25 интактных крыс. На 10-й и 21-й дни животных декапитировали, кровь и органы забирали для лабораторных исследований. Состояние животных (летальность, частота груминга, массу тела, потребление корма и воды) оценивали визуально. Содержание глюкозы и липидов определяли ферментативным колориметрическим методом (набор реактивов «Human», Германия; анализатор ФП-901), инсулина и С-пептида – иммуноферментным методом (анализатор «Chemwell», набор реактивов «DEMENITECKILL-WELLSEE», Германия), диеновых конъюгатов и малонового диальдегида – фотоколориметрическим методом по окрашенным продуктам тиобарбитуровой кислоты.

Результаты. В первой группе летальность составила 68%, средняя потеря массы тела – 41,2%. Уровень глюкозы в крови на 10-й и 21-й дни превышал показатели интактных животных на 370,7 и 146,2%, снижение уровня инсулина в крови составило 95,8 и 83,7%, С-пептида – 96 и 83,7%. Во второй группе летальность составила 32%, средняя потеря массы тела – 36,5%, уровень глюкозы крови на 10-й и 21-й дни повысился на 364,5 и 151,5%, инсулина – снизился на 96,1 и 82,9%, С-пептида – снизился на 96,0 и 83,7% соответственно. В обеих группах развивалась умеренная гиперлипидемия (повышалось содержание холестерина, триглицеридов, липопротеинов низкой и очень низкой плотности, свободных жирных кислот и снижалось содержание липопротеинов высокой плотности), концентрация диеновых конъюгатов и малонового диальдегида резко возрастала в зависимости от активности антиоксидантной системы тканей в различной степени.

Вывод. При моделировании сахарного диабета аллоксаном в обеих группах на 10-й день развивается острая, а на 21-й день – хроническая форма аллоксанового сахарного диабета; летальность животных в предлагаемой нами модифицированной модели аллоксанового сахарного диабета на 36% ниже по сравнению с «классической» моделью.

Ключевые слова: модель сахарного диабета, аллоксан, глюкоза крови, инсулин, С-пептид, липидный обмен, оксидативный стресс.

COMPARATIVE STUDY OF DIFFERENT MODELS OF ALLOXAN-INDUCED DIABETES MELLITUS R.E. Jafarova. *Scientific and Research Center of Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan.* **Aim.** To compare the clinical course of diabetes mellitus induced by alloxan using classic and modified technique. **Methods.** Experiments were carried out on mature white mongrel rats, which were divided into two groups: the first group (25 rats) was administered a 200 mg/kg single dose of alloxan (classic model), the second group (25 rats) was administered 150 mg/kg of alloxan at the first day, 100 mg/kg of alloxan at the second day and 100 mg/kg of alloxan at the fourth day. 25 intact rats were examined as a control group. The animals were withdrawn from the experiment by decapitation on the 10th and 21st day, blood and tissue samples were taken for the laboratory testing. The animals' status (mortality, grooming behavior, body weight, food and water intake) were measured by visual examination. The levels of glucose and lipids were assessed using enzyme colorimetric detection («Human» laboratory kits, Germany, FP-901 analyzer), insulin and C-peptide levels were examined by enzyme-linked immunosorbent assay («Chemwell» analyzer, «DEMENITECKILL-WELLSEE» laboratory kits, Germany); levels of diene conjugates and malonic dialdehyde – using the photocolometry based on the colored thiobarbituric acid products. **Results.** In the first group, the mortality reached 68%, mean weight loss – 41.2%. Blood glucose level at the 10th and 21st days was higher by 370.7 and 146.2% respectively compared to intact animals. Insulin level decreased by 95.8 and 83.7%, C-peptide level – by 96 and 83.7%. In the second group, mortality was 32%, mean body weight loss – 36.5%, blood glucose level at the 10th and 21st days elevated by 364.5 and 151.5%, insulin level decreased by 96.1 and 82.9%, C-peptide level – by 96.0 and 83.7% respectively. A moderate hyperlipidemia was observed in both groups with increased levels of cholesterol, triglycerides, low and very-low density lipoproteids, free fatty acids and decreased levels of high density lipoproteids. The concentration of diene conjugates and malonic dialdehyde increased rapidly to a variable degree depending on the tissue anti-oxidative activity. **Conclusion.** When diabetes mellitus is modeled by the use of alloxan, an acute form of alloxan-induced diabetes is observed on the 10th day, a chronic form – on the 21st day in both groups. The modified model of alloxan-induced diabetes showed 36% less mortality rate compared to the classic model. **Keywords:** diabetes model, alloxan, blood glucose, insulin, C-peptide, lipid metabolism, oxidative stress.

Сахарный диабет (СД) – хроническое заболевание, характеризующееся относительной или абсолютной недостаточностью инсулина, в результате которой происходят метаболические нарушения, являющиеся основной причиной поздних осложнений СД [1]. Ранняя инвалиди-

зация и высокая смертность среди больных СД сделали лечение этого заболевания одним из приоритетов национальных систем здравоохранения [1]. В свете этого поиск новых методов лечения и изыскание препаратов, удобных в применении и обладающих незначительными побочными действиями, на сегодняшний день остаётся актуальной проблемой медицинской науки [7]. Для

проведения подобных исследований в области диабетологии используют различные модели СД, одной из которых является аллоксановая модель [9].

Аллоксановая модель наиболее изучена, её широко применяют в экспериментальных исследованиях [5]. Один из основных её недостатков — высокая летальность животных при моделировании. По этой причине для минимизации летальности животных мы сочли целесообразным модифицировать классическую методику аллоксанового СД и изучить в сравнительном аспекте течение патологического процесса.

Для моделирования СД использованы половозрелые беспородные белые крысы с массой тела 280–350 г. Животные были распределены в две группы: первая группа состояла из 25 крыс, которым однократно внутрибрюшинно вводили 200 мг/кг аллоксана (классическая модель) [5], вторая группа (модифицированная методика) — из 25 крыс, которые в 1-й день получали 150 мг/кг, во 2-й день — 100 мг/кг, через день — дополнительно ещё 100 мг/кг аллоксана. В качестве контроля исследовали по 25 интактных крыс.

Выбор нами внутрибрюшинного способа введения аллоксана основывался на лёгкости выполнения процедуры и малой травматичности для животных. При моделировании также учитывали, что диабетогенное действие аллоксана более активно проявляется у животных, находящихся на предварительной голодной диете [5], поэтому все животные в течение 24 ч до начала моделирования не получали пищу, но при этом доступ к воде оставался неограниченным.

Для установления диабетического статуса по ходу эксперимента осуществляли контроль концентрации глюкозы в крови, взятой из хвостового надреза крыс, при помощи тест-анализатора «FreeStyle» фирмы «Abbott» и индикаторной бумаги «IME-DC».

Состояние животных оценивали визуально, фиксировали летальность в группах, изменение массы тела животных, потребление корма и воды. Поведенческую активность оценивали частотой груминга.

На 10-й и 21-й дни животных декапитировали, кровь и органы забирали для лабораторных исследований.

Содержание глюкозы, триглицеридов, липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов высокой плотности (ЛПВН), холестерина, свободных жирных кислот (СЖК) в крови определяли ферментативным колориметрическим методом при использовании набора химических реактивов производства «Human» (Германия) на анализаторе ФП-901.

Концентрацию в крови инсулина и С-пептида определяли иммуноферментным методом на анализаторе «Chemwell», используя стандартный набор реактивов «DEMNITECKILL-WELLSEE» (Германия).

Выраженность окислительного стресса определяли по концентрации диеновых конъюгатов

(ДК) и малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови и тканях печени, сердца, почек, поджелудочной железы фотоколориметрическим методом по окрашенным продуктам тиобарбитуровой кислоты [10].

Статистическую обработку полученных цифровых данных и выявление их статистической значимости проводили параметрическим методом по коэффициенту *t* Фишера–Стьюдента [4] и непараметрическими критериями *U* (Уилкоксона–Манна–Уитни) и *Q* (Розенбаума) [2]. Статистическую достоверность летальности в группах определяли точным методом Фишера для четырёхпольной таблицы [2].

В первой группе, начиная со 2-х суток после введения аллоксана, животные с особо острыми проявлениями интоксикации начинали погибать. Основное количество летальных исходов пришлось на период от 3 до 7 дней. На 3-й день умерли 5 (20%) животных, на 4-й день — 8 (32%), на 5-й день — 2 (8%), на 7-й день — 2 (8%) крысы. Всего умерли 17 крыс, что составило 68%.

В конце 1-й недели клинический осмотр оставшихся в живых крыс показал снижение двигательной активности, отсутствие груминга, значительное повышение потребности в воде на фоне выраженной полиурии. Животные заметно похудели. Шерсть выпала, на поверхности кожи появились гноящиеся язвы. Общее состояние животных характеризовалось как крайне тяжёлое.

К концу 2-й недели состояние крыс улучшалось, было стабильно тяжёлым. Животные потребляли много воды и пищи, груминг отсутствовал.

К концу 3-й недели крысы становились более активными, появлялся редкий груминг. Язвы на поверхности кожи постепенно заживали. Несмотря на обильное потребление пищи и воды, животные сильно похудели.

Средняя масса тела интактных животных, составлявшая в первой группе 296,64±1,85 г (276–313 г), на 21-й день снизилась до 109,75±0,8 г (106–113 г). Потеря в весе составила 41,2%. Различия статистически значимы (*U*=0, *p*<0,01).

Содержание глюкозы в крови животных, составлявшее в интактном состоянии 111,8±1,46 мг/дл (108–115 мг/дл), повышалось, начиная с 3-х суток, и на 7–10-е сутки достигало критических значений — более 600 мг/дл.

Во второй группе на 2-е сутки после введения аллоксана погибла 1 крыса, на 5-й день — 4 крысы, на 6-й день — 2, на 10-й день — 1 крыса. Всего умерли 8 животных, что составило 32% (*p*<0,025 по сравнению с первой группой).

Клинический осмотр крыс, оставшихся в живых в конце 1-й недели, показал, что они малоподвижны, груминг отсутствовал. На фоне выраженной полиурии значительно повышалась потребность в воде и еде, но при этом они заметно похудели. Шерстяной покров выпал, присутствовали очаговые язвы. Общее состояние животных характеризовалось как стабильно тяжёлое.

К концу 2-й недели состояние животных оста-

Таблица 1

Содержание глюкозы, инсулина и С-пептида в плазме крови животных на 10-й и 21-й дни моделирования сахарного диабета аллоксаном

Группы	Статистические данные	Глюкоза, мг/дл	Инсулин, мкЕД/мл	С-пептид, нг/мл
Интактные животные	M±m	111,8±1,46	3,8±0,12	0,15±0,01
	Min-Max	108-115	3,4-4,1	0,12-0,18
	p	—	—	—
Первая группа на 10-й день	M±m	526,2±3,76	0,16±0,09	0,006±0,0015
	Min-Max	518-539	0,0-0,5	0,00-0,01
	p	<0,001	<0,001	<0,001
Первая группа на 21-й день	M±m	275,2±4,409	0,62±0,066	0,018±0,006
	Min-Max	262-287	0,4-0,8	0,008-0,019
	p	<0,001	<0,001	<0,001
Вторая группа на 10-й день	M±m	519,3±4,01	0,15±0,09	0,006±0,0015
	Min-Max	510-532	0,0-0,6	0,00-0,01
	p	<0,001	<0,001	<0,001
Вторая группа на 21-й день	M±m	281,2±3,9	0,65±0,076	0,018±0,006
	Min-Max	268-292	0,4-0,8	0,008-0,019
	p	<0,001	<0,001	<0,001

Примечание: p – статистическая значимость различий по сравнению с интактными крысами.

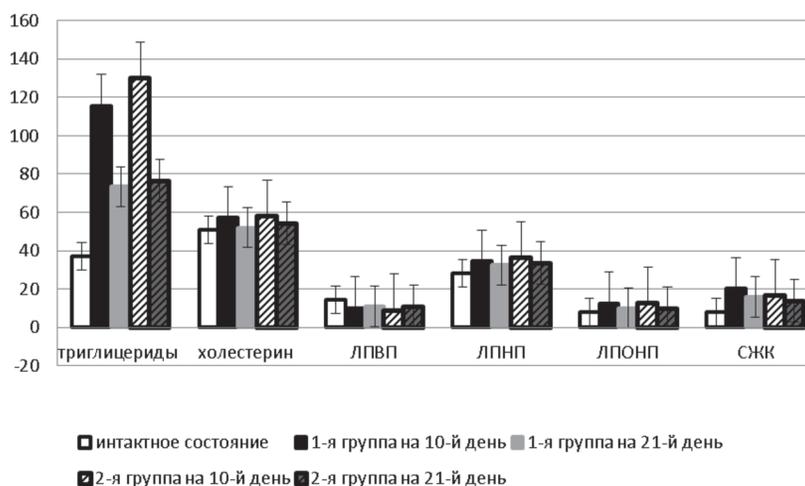


Рис. 1. Содержание холестерина, липидов и жирных кислот в крови животных с аллоксан-моделированным сахарным диабетом. Указаны планки погрешностей со стандартными ошибками. ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности; СЖК – свободные жирные кислоты.

валось стабильно тяжёлым, появился редкий груминг.

К концу 3-й недели состояние животных улучшилось, увеличилась частота груминга. Некоторые язвы на поверхности кожи заживали, потребление пищи и воды было высоким, но животные не прибавляли в весе.

Средняя масса тела интактных животных составляла 316,64±2,97 г (295-350 г). Средняя масса тела крыс с модифицированной моделью СД, оставшихся в живых, составила 201,0±5,6 г (167-258 г), U=0, p <0,01. Таким образом, животные потеряли 36,5% первоначального веса.

Содержание глюкозы в крови интактных животных составило 112,4±1,37 мг/дл (103-129 мг/дл). На 3-и сутки этот показатель снизился до 80,8±2,98 мг/дл (76-90 мг/дл), что связано с тотальной гибелью β-клеток поджелудочной железы, в результате чего в кровь выделяется большое количество депонированного инсулина [5]. На 7-е сутки уровень глюкозы крови повышался и достигал критических значений.

Аллоксан наряду с избирательным поражением β-клеток поджелудочной железы, приводящим к тотальной их гибели и повышению содержания глюкозы в крови в связи с абсолютной инсулино-

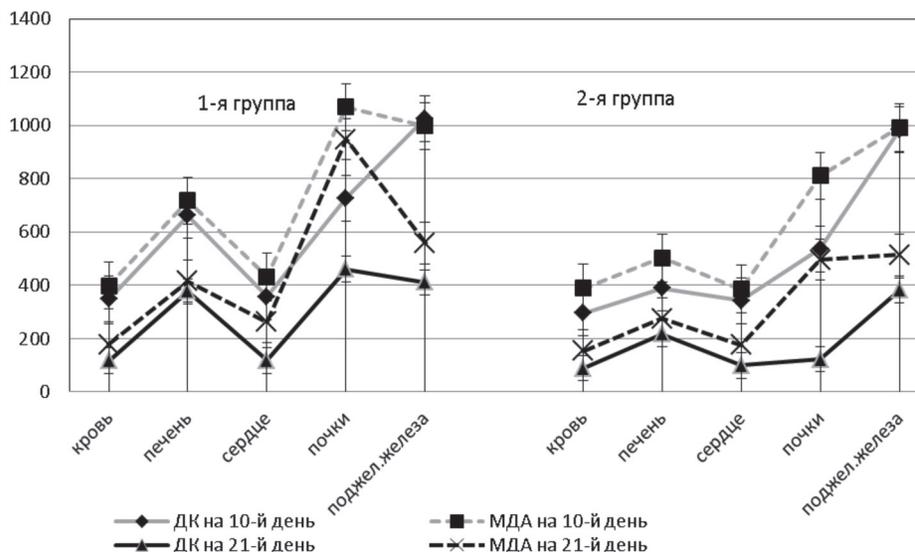


Рис. 2. Изменение концентрации (%) диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) при аллоксан-моделированном сахарном диабете у животных на 10-й и 21-й дни (норма 100%) с указанием стандартной ошибки; поджел. — поджелудочная.

вой недостаточностью, обладает также общей токсичностью, проявляющейся поражением печени и почек с высокой летальностью животных [5]. В первой группе наблюдаемая с первых дней общая интоксикация приводила к гибели значительной части животных в начальный период моделирования. При дробном введении аллоксана токсическая фаза менее выражена, поэтому летальность во второй группе оказалась на 36% ниже, чем в первой группе. Повышение содержания глюкозы в крови у животных первой и второй групп было сходным. Постепенное улучшение состояния животных к концу 3-й недели в обеих группах, по всей видимости, связано со спонтанной регенерацией β -клеток поджелудочной железы, выраженной у крыс, что подтверждается и литературными данными [4, 5].

Результаты биохимического исследования крови и органов, взятых после некропсии животных, представлены в табл. 1 и на рис. 1 и 2.

Уровень глюкозы (см. табл. 1) в крови животных в первой группе на 10-й день резко повысился и превышал показатели интактных животных на 370,7%, а на 21-й день — на 146,2%, тогда как во второй группе содержание глюкозы повысилось соответственно на 364,5% (на 6,2% меньше по сравнению с первой группой) и 151,5% (на 5,3% больше по сравнению с первой группой).

Состояние β -клеток панкреатических островков поджелудочной железы характеризует возможность секреции ими инсулина и С-пептида, служащих диагностическими маркерами СД [5].

Уровень инсулина (см. табл. 1) в крови животных первой группы на 10-й день был снижен на 95,8%, на 21-й день его содержание повысилось, однако по сравнению с интактными крысами потеря составляла 83,7%. Во второй группе потеря соответственно составляла 96,1 и 82,9%. Различия

между результатами групп составляет 0,3 и 0,8%.

Снижение уровня С-пептида в первой группе на 10-й день составило 96%, на 21-й день — 83,7%, а во второй группе — 96,0 и 83,7% соответственно.

Содержание липидов и жирных кислот в крови отражено на рис. 1. В первой группе содержание холестерина в крови животных, забитых на 10-й день, превышало показатель интактных животных на 11,9% ($p < 0,01$), триглицеридов — на 210,2% ($p < 0,001$), ЛПНП — на 22,1% ($p < 0,001$), ЛПОНП — на 59,1% ($p < 0,01$), СЖК — на 147,5% ($p < 0,001$). При этом содержание ЛПВП снизилось на 30,9% ($p < 0,001$). На 21-й день содержание триглицеридов превышало показатель интактных крыс на 97,2% ($p < 0,001$), холестерина — на 7,8% ($p < 0,05$), ЛПНП — на 15,0% ($p < 0,05$), ЛПОНП — на 27,8% ($p < 0,05$), СЖК — на 93,3% ($p < 0,001$), а потеря ЛПВП составляла 25,7% ($p < 0,01$). Как видно из полученных данных, в результате естественной реверсии диабетического статуса по сравнению с 10-м днём содержание триглицеридов снизилось на 36,4%, холестерина — на 3,6%, ЛПНП — на 5,8%, ЛПОНП — на 19,6%, СЖК — на 21,9%. При этом содержание ЛПВП повысилось на 7,5%.

Во второй группе содержание холестерина на 10-й день превышало показатель интактных животных на 13,7% ($p < 0,01$), триглицеридов — на 249,7% ($p < 0,001$), ЛПНП — на 29,2% ($p < 0,001$), ЛПОНП — на 59,2% ($p < 0,01$), СЖК — на 51,1% ($p < 0,001$). При этом содержание ЛПВП снизилось на 37,7%. На 21-й день по сравнению с интактным состоянием содержание триглицеридов увеличилось на 105,2% ($p < 0,001$), холестерина — на 6,0% ($p < 0,05$), ЛПНП — на 18,8% ($p < 0,05$), ЛПОНП — на 25,3% ($p < 0,05$), СЖК — на 68,7% ($p < 0,001$), количество ЛПВП снизилось на 25,8% ($p < 0,001$). В этой группе на 21-й день по сравнению

нию с 10-м днём содержание триглицеридов снизилось на 41,3%, холестерина — на 6,8%, ЛПНП — на 8,0%, ЛПОНП — на 21,3%, СЖК — на 17,5%, а ЛПВП — повысилось на 19,0% ($p < 0,01$).

Как видно из полученных результатов, при введении аллоксана крысам в обеих группах наряду с гипергликемией развивается умеренная гиперлипидемия, что связано как с нарушением гликолиза, так и с усилением свободнорадикального окисления липидов. Цифры, полученные в наших экспериментах, согласуются с данными литературы [3].

Результаты определения содержания первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в первой и второй группах представлены на рис. 2.

Как видно из рисунка, в первой группе на 10-й день содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов резко увеличивается. Так, в крови концентрация ДК и МДА увеличивалась на 348,8 и 398,7%, в печени — на 661,5 и 717,6%, в сердце — на 357,0 и 432,0%, в почках — на 727,2 и 1068,8%, в поджелудочной железе — на 1025,9 и 997,8% соответственно. На 21-й день эти показатели были выше по сравнению с интактными животными: в крови — на 116,7 и 177,5%, в печени — на 377,5 и 415,8%, в сердце — на 117,8 и 262,4%, в почках — на 460,7 и 948,4%, в поджелудочной железе — на 411,2 и 558,9%. Если сравнивать с показателями на 10-й день, содержание ДК и МДА на 21-й день снизилось: в крови — на 51,7 и 44,4%, в печени — на 37,3 и 36,9%, в сердце — на 52,4 и 31,9%, в почках — на 32,2 и 10,3%, в поджелудочной железе — на 54,6 и 40,0%.

Во второй группе на 10-й день концентрация ДК и МДА увеличивалась: в крови — на 296 и 389%, в печени — на 389 и 503%, в сердце — на 342 и 386%, в почках — на 536 и 811%, в поджелудочной железе — на 983 и 992% соответственно. На 21-й день эти показатели были выше, чем у интактных крыс: в крови — на 89,0 и 154%, в печени — на 218 и 276%, в сердце — на 99,0 и 176%, в почках — на 122 и 469%, в поджелудочной железе — на 381 и 514%. На 21-й день концентрация ДК и МДА относительно 10-го дня снизилась в крови на 48,9 и 48,1%, в печени на — 46,7 и 37,6%, в сердце — на 54,9 и 45,0%, в почках — на 49,4 и 37,5%, в поджелудочной железе — на 55,8 и 43,7%. Отличия всех показателей от значений, полученных у животных интактной группы, статистически значимы ($p < 0,001$).

Определение содержания продуктов перекисного окисления липидов у интактных и моделированных животных показало, что количество первичных и вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов в плазме крови и тканях в обеих группах резко возрастает и в зависимости от активности антиоксидантной системы ткани выражено в различной степени. Однако во второй группе этот процесс менее выражен, чем в первой группе.

Как известно, гипергликемия, дислипидемия, усиление перекисного окисления липи-

дов — классическая триада, сопровождающая СД, приводящая к развитию ангиопатий, являющихся причиной гипоксии и нарушения трофики тканей различных органов [6, 7, 11].

ВЫВОД

Исходя из полученных результатов, мы приходим к заключению, что при моделировании сахарного диабета аллоксаном в обеих группах все исследуемые биохимические показатели на 10-е сутки изменяются патологическим образом, развивается острая форма аллоксанового сахарного диабета. На 21-й день показатели из-за естественной реверсии смоделированного диабетического статуса животных начинают улучшаться, однако значительно уступают таковым у интактных животных (развивается хроническая форма аллоксанового сахарного диабета). При этом летальность животных в предлагаемой нами модифицированной модели аллоксанового сахарного диабета на 36% ниже по сравнению с «классической» моделью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аметов А.С., Богданова Л.Н. Гипергликемия и глюкозотоксичность — ключевые факторы прогрессирования сахарного диабета 2-го типа // РМЖ. — 2010. — №23. — С. 1416–1418. — http://www.rmj.ru/articles_7322.htm (дата обращения: 01.10.2013).
2. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. — М.: Медицина, 1969. — 28 с.
3. Инчина В.И., Букина С.Ю. Исследование нейропротективной активности мексидола и 3-оксипиридинацетилцистеина на фоне ишемии головного мозга в комплексе экспериментального сахарного диабета и экзогенной гиперхолестеринемии // Бюл. exper. биол. — 2008. — Т. 145, №6. — С. 685–687.
4. Статистические методы исследования в медицине и здравоохранении / Под ред. Л.Е. Полякова. — Л.: Медицина, 1971. — 199 с.
5. Экспериментальный сахарный диабет / Под ред. В.Г. Баранова. — Л.: Наука, 1983. — 240 с.
6. Bayens J.W., Thorpe S.R. Oxidative stress in diabetes. Antioxidants in Diabetes Management / Ed. Packer. — New York: M. Dekker Inc, 2000. — P. 58–66.
7. Bennett W.L., Maruthur N.M., Singh S. et al. Comparative effectiveness and safety of medications for type 2 diabetes: an update including new drugs and 2-drug combinations // Ann. Intern. Med. — 2011. — Vol. 155, N 1. — P. 67–68.
8. Davi G., Falco A., Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus // Antioxid. Redox. Signal. — 2005. — Vol. 7, N 1–2. — P. 256–268.
9. Eidi M., Eidi A., Saeidi A. et al. Effect of coriander seed (*Coriandrum sativum* L.) ethanol extract on insulin release from pancreatic beta cells in streptozotocin-induced diabetic rats // Phytother. Res. — 2009. — Vol. 23. — P. 404–406.
10. Uchiyama M., Michara M. Determination of malonaldehyd precursor in tissues by Thiobarbituric acid test // Biochem. — 1978. — Vol. 78, N 1. — P. 271–278.
11. Vergouwe Y., Soedamah-Muthu S., Zgibor J. et al. Progression to microalbuminuria in type 1 diabetes: development and validation of prediction rule // Diabetologia. — 2010. — Vol. 53. — P. 254–262.