

МОДЕЛИРОВАНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА ТИПА 2 У КРЫС НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ С ИНДУКЦИЕЙ СТРЕПТОЗОТОЦИНОМ

А. А. Спасов, Д. А. Бабков, Д. Р. Мулеева, О. Ю. Майка

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии,
НИИ фармакологии ВолгГМУ*

Сахарный диабет типа 2 (СД2) является гетерогенным заболеванием со сложным патогенезом, которое связано с генетической предрасположенностью и образом жизни, особенно его диетическим компонентом. Создание экспериментальной животной модели СД2 необходимо для понимания его патогенеза и разработки новых методов лечения.

Ключевые слова: диабет типа 2, стрептозоточин, высокожировая диета.

MODELING STREPTOZOTOCIN-INDUCED TYPE 2 DIABETES MELLITUS IN RATS ON A HIGH-FAT DIET

A. A. Spasov, D. A. Babkov, D. R. Muleeva, O. Yu. Mayka

*Volgograd State Medical University,
Department of Pharmacology,
Research Institute of Pharmacology VolgGMU*

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex heterogeneous disease linked with genetic predisposition and lifestyle, especially dietary component. Developing an experimental animal model of T2DM is required to elucidate its pathogenesis and develop novel antidiabetic agents.

Key words: type 2 diabetes, streptozotocin, high-fat diet.

Сахарный диабет типа 2 (СД2) является гетерогенным заболеванием со сложным патогенезом, которое связано с генетической предрасположенностью и образом жизни, особенно его диетическим компонентом [1]. Существует несколько широко используемых животных моделей СД2. Спонтанные, такие как модели ZuckerDiabeticFatty (ZDF) крыс [2] и Goto-Kakizaki (GK) крыс [3], акцентированы на факторе генетической предрасположенности. Индуцированные модели, как правило, используют относительно высокие дозы стрептозоточина (STZ) (более 50 мг/кг) [4], что ведет к уменьшению синтеза и секреции инсулина в β -клетках и развитию патологической картины диабета типа 1, даже в комбинации 50 мг/кг STZ и высокожировой диеты [5]. Эти модели отличаются от типичного СД2 во многих отношениях, включая патогенез и клинические симптомы. В большинстве случаев СД2, нарушение липидного обмена и периферическая резистентность к инсулину предшествуют развитию гипергликемии [6]. По этой причине в литературе описан ряд методов моделирования СД2, сочетающих высокожировую диету с инъекцией низких доз STZ [7, 8].

В работе Yu и соавт. [9] показано, что высокие концентрации жирных кислот в плазме приводят к увеличению внутриклеточной концентрации ацил-КоА и диацилглицерола, приводя к активации PKC- θ и фосфорилированию Ser307 IRS-1. Эти изменения тормозят активацию IRS-1-ассоциированной PI3-киназы, подавляя стимулируемый инсулином захват глюкозы. В свою очередь, гипергликемия и оксидативный стресс исто-

щают пул инсулина в β -клетках поджелудочной железы и индуцируют их гибель, замыкая порочный круг патогенеза. Сокращение функциональной массы β -клеток до 50—75 % манифестирует развитие СД2 [10].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка доступной животной патологической модели, воспроизводящей ключевые компоненты метаболического синдрома, включая липотоксичность, глюкозотоксичность и периферическую инсулинорезистентность, и пригодную для фармакологического скрининга веществ, обладающих антидиабетическим потенциалом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе работы были использованы стрептозоточин (STZ, Sigma #S0130, США), 0.1 М цитратный буфер (pH 4.5).

Животные. Взрослых самцов крыс Wistar содержали в стандартных клетках по 4 особи при температуре 25 °С и стандартном световом режиме. До начала эксперимента предоставляли свободный доступ к комбикорму и воде.

Высокожировая диета. Комбикорм для крыс экструдированный (13000 кДж/кг; белок 19 %, жиры 5 %, клетчатка 4 %, лизин 1,2 %, метионин + цистеин 0,7 %, кальций 0,6—0,9 %, фосфор 0,6—0,9 %, натрий 0,20—0,25 %), жир свиной, казеин, метионин, витаминно-минеральный премикс «Ушастик» (Россия). В 1 кг премикса содержится витамина А — 1000000 МЕ, витамина D₃ — 300000 МЕ, витамина Е — 1,0 г, витамина В₂ —

0,6 г, витамина B₁₂ — 12 мг, железо — 20 г, медь — 4 г, марганец — 6 г, цинк — 10 г, кобальт — 0,08 г, йод — 0,4 г. Компоненты отвесить в соответствии с таблицей 1 из расчета 30 г смеси на 1 животное в сутки, измельчить и смешать до однородности. Хранить при +4 °С.

Таблица 1

Состав высокожировой диеты

Компонент	Масса, г/кг
Комбикорм	370
Жир свиной	313
Казеин	253
Витаминно-минеральная смесь	61
Метионин	3

Развитие патологии. Крысы были разделены на 2 группы. Опытная группа (12 особей) получала высокожировую диету (58 % жиров, 25 % белка, 17 % углеводов от общего количества калорий), контрольная группа (10 особей) получала нормальную диету в том же количестве при свободном доступе к воде.

Через 1 неделю регистрировали вес животных и уровень глюкозы крови.

Через 2 недели животным опытной группы ввели 35 мг/кг стрептозотоцина в цитратном буфере внутрибрюшинно, животным контрольной группы — 1 мл/кг цитратного буфера внутрибрюшинно.

Через 3 недели регистрировали вес животных и уровень глюкозы крови повторно.

Интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе и инсулину. Были отобраны по 4 животных из опытной и контрольной групп. За 3 часа до начала экспери-

мента они были лишены еды с сохранением свободного доступа к воде. Всем животным были введены 1 мг/кг глюкозы и 0,175 МЕ/кг инсулина в изотоническом растворе натрия хлорида интраперитонеально. Образцы крови забирали из хвостовой вены перед инъекцией, на 5-й, 10-й, 15-й и 30-й минутах.

Анализ образцов крови. Кровь отбирали из хвостовой вены мерным капилляром типа «end-to-end» объемом 20 мкл и гемолизировали в 1 мл раствора глюкоза/лактат гемолизующего. Уровень глюкозы в плазме крови определяли с помощью биохимического анализатора BiosenC_Line (EKF Diagnostics, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Вес и уровень глюкозы крови животных контрольной группы оставался стабильным на протяжении всего эксперимента. Для животных опытной группы после инъекции STZ отмечен существенный рост уровня глюкозы плазмы крови; смертность в течение первых 4 суток составила 33 %. В последующие дни показатели массы тела оставались стабильными в обеих группах, гибели животных не отмечено (табл. 2). Через 3 недели от начала эксперимента отмечено статистически значимое увеличение уровня инсулина, глюкозы, три-глицеридов и холестерина крови животных (рис. 1).

С целью определения инсулинорезистентности обеих групп животных был проведен интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе и инсулину. Показано, что уровень глюкозы крови крыс опытной группы статистически превышал уровень глюкозы контрольной группы во всех

Таблица 2

Эффект высокожировой диеты и стрептозотоцина на массу и уровень глюкозы крови животных

Показатель	До введения STZ		Через 7 дней после введения STZ	
	Контроль	HFD*	Контроль	HFD+STZ
Вес, г	353,8 ± 8,3	426,3 ± 13,3	353,6 ± 8,0	381,5 ± 17,5
Глюкоза крови, мМ	5,89 ± 0,12	5,64 ± 0,12	3,95 ± 0,12	13,06 ± 1,10

*HFD — высокожировая диета.

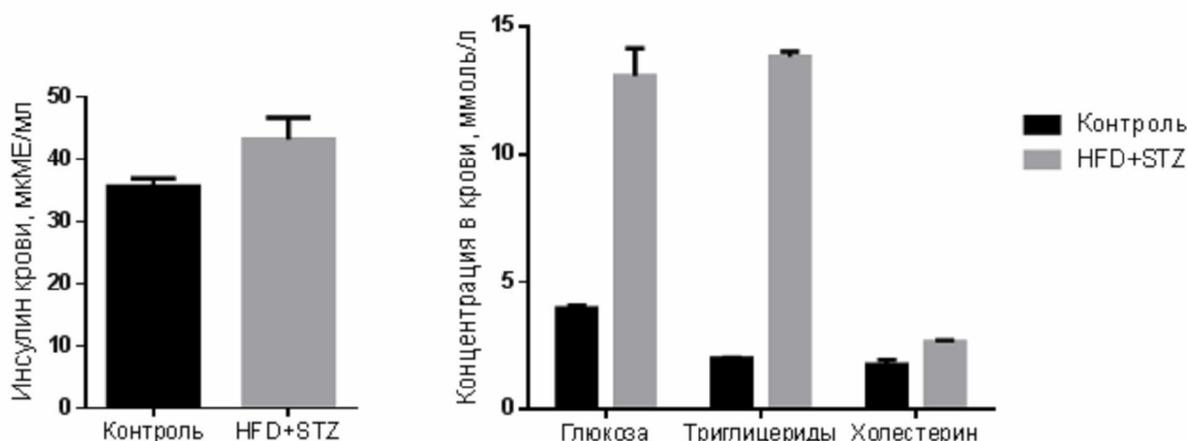


Рис. 1. Эффект 3-недельной высокожировой диеты и введения 35 мг/кг стрептозотоцина на биохимические параметры крови крыс

временных точках ($p < 0,0001$). Также для опытной группы уровень глюкозы на всем протяжении теста статистически значимо превышал базальный уровень до начала теста ($p = 0,032$), в то время как для контрольной группы таких отличий не наблюдалось (рис. 2).

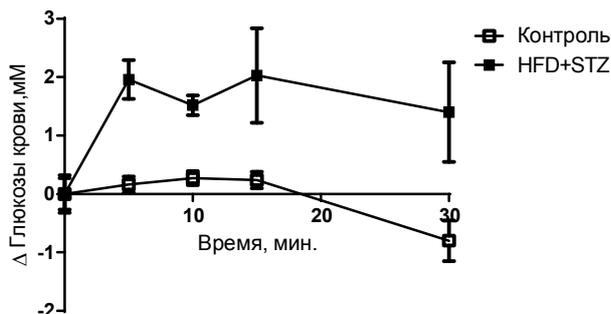


Рис. 2. Интраперитонеальный тест толерантности к глюкозе и инсулину для группы контроля и группы, получавшей высокожировую диету, спустя 7 дней после введения 35 мг/кг STZ. Средние значения \pm SEM, $n = 4$. Все данные статистически значимы по отношению к контролю ($p < 0,0001$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание 3-недельной высокожировой диеты с последующим введением 35 мг/кг стрептозотоцина внутрибрюшинно привело к развитию выраженной гипергликемии и повышению толерантности к инсулину и глюкозе у крыс Wistar. Необходимо отметить, что выявленная выраженность нарушения утилизации глюкозы уступает описанной авторами аналогичных методик.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-25-00139).

ЛИТЕРАТУРА

1. Spasov A. A., et al. [Fundamental bases of search of medicines for therapy of a diabetes mellitus type 2] // Vestn.

Ross. Akad. meditsinskikh Nauk. — 2013. — № 2. — P. 43—49.

2. Peterson R. G., et al. Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus // ILAR J. — 1990. — Vol. 32, № 3. — P. 16—19.

3. Cheng Z. J., et al. Endothelial Dysfunction and Salt-Sensitive Hypertension in Spontaneously Diabetic Go o-Kakizaki Rats // Hypertension. — 2001. — Vol. 37, № 2. — P. 433—439.

4. Kim B.-M., et al. Clusterin expression during regeneration of pancreatic islet cells in streptozotocin-induced diabetic rats // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44, № 12. — P. 2192—2202.

5. Reed M. J., et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat // Metabolism. — 2000. — Vol. 49, № 11. — P. 1390—1394.

6. Spasov A. A., et al. The experimental animal model of T2DM // Biomedizina. — 2011. — Vol. 3. — P. 12—18.

7. Srinivasan K., et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening // Pharmacol. Res. — 2005. — Vol. 52, № 4. — P. 313—320.

8. Zhang F., et al. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters // Exp. Anim. — 2003. — Vol. 52, № 5. — P. 401—407.

9. Yu C. Mechanism by Which Fatty Acids Inhibit Insulin Activation of Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1)-associated Phosphatidylinositol 3-Kinase Activity in Muscle // J. Biol. Chem. — 2002. — Vol. 277, № 52. — P. 50230—50236.

10. Tkachuk V. A., Vorotnikov A. V. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance Development // Diabetes Mellit. — 2014. — Vol. 17, № 2. — P. 29.

Контактная информация

Бабков Денис Александрович — к. х. н., младший научный сотрудник лаборатории антиоксидантных средств НИИ фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: denis.a.babkov@gmail.com