

УДК 615.61.616–018

**МОДЕЛИРОВАНИЕ НА ЖИВОТНЫХ «ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ»
НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-
ИНДУЦИРОВАННОГО ДИАБЕТА****¹Ковалева М.А., ¹Макарова М.Н., ¹Горячева М.А., ¹Гущин Я.А., ¹Макаров В.Г.,
²Хомутников Е.А.***¹ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Ленинградская область, п. Кузьмоловский,
e-mail: spbpharm@mail.ru;**²ФКУЗ «1 военный госпиталь внутренних войск министерства внутренних дел России»
Министерства внутренних дел Р.Ф., Новочеркасск*

Ежегодно количество пациентов с диагнозом сахарный диабет возрастает. Ангиопатии и нейропатии по-прежнему являются ведущими осложнениями данной патологии, которые приводят к инвалидизации пациента. В связи с чем, моделирование диабетических осложнений на экспериментальных животных является актуальной задачей. В статье обсуждены основные методологические подходы формирования экспериментальной модели «диабетической стопы» на фоне длительно текущего стрептозотацин-индуцированного диабета. Проведена оценка развития микроангиопатий и нейропатий с применением биохимических и гистологических методов. Установлено, что 14 недель течения экспериментального стрептозотацин-индуцированного диабета достаточно для формирования сосудистых осложнений, а также изменений в тканях периферических нервов. Модель может быть рекомендована для проведения доклинических исследований, с целью выявления ангио- и нейропротекторных эффектов противодиабетических препаратов.

Ключевые слова: экспериментальный диабет, «диабетическая стопа», микроангиопатия, нейропатия, глюкоза

**ANIMAL MODEL «DIABETIC FOOT» ON THE BACKGROUND OF
EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES****¹Kovaleva M.A., ¹Guschin J.A., ¹Goryacheva M.A., ¹Makarova M.N., ¹Makarov V.G.,
²Homutnikov E.A.***¹RMC «HOUM OF PHARMACY», Leningradskiy region, Kuzmolovskiy, e-mail: spbpharm@mail.ru;**²1 Military Hospital internal troops of the Russian Interior Ministry, Ministry of Internal Affairs of
Russian Federation, Novocherkassk*

The annual number of patients in which diagnosed diabetes mellitus is increasing. Angiopathia and neuropathy are still the leading complications of this disease, leading cause patients disability. In this connection, simulation of diabetic complications in experimental animals is an important task. The article discussed the basic methodological approaches to the formation of an experimental model of «diabetic foot» on the background of the current long-term streptozotocin-induced diabetes. The evaluation for microvascular and neuropathies using biochemical and histological methods. It was found that 14 weeks of experimental streptozotocin-induced diabetes flow sufficient for the formation of vascular complications, as well as changes in the tissues of the peripheral nerves. The model can be recommended for preclinical studies in order to identify angiogenic and neuroprotective effects of antidiabetic medicines.

Keywords: experimental diabetes, «diabetic foot», microangiopathy, neuropathy, glucose

На сегодняшний день сахарный диабет является достаточно изученной патологией, существует множество лекарственных препаратов и современных схем терапии данного заболевания, однако, болезнь продолжает прогрессировать особенно в развитых странах [4]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, количество пациентов с диагностированным сахарным диабетом составляет около 160 млн., к 2025 г. прогнозируется удвоение количества пациентов с этим диагнозом. Следует отметить, что диабет является социально значимым заболеванием, поскольку сосудистые осложнения приводят к ранней инвалидизации пациентов и летальности [1, 3]. Одним из осложнений диабета является

синдром «диабетической стопы». При данном состоянии наблюдается комплекс анатомо-функциональных изменений на фоне длительной гипергликемии, приводящей к развитию нейропатии, микро- и макроангиопатий, остеоартропатии, что приводит к повышенной травматизации и инфицированию мягких тканей стопы. В связи с чем, разработка мероприятий (в том числе фармакологической терапии), направленных на снижение возникновений осложнений при диабете является актуальной задачей.

Большое значение для определения вопросов патогенеза, клиники и терапии заболевания имеет экспериментальная диабетология. Экспериментальные модели диабета и его осложнений позволяют получить важ-

ные сведения не только для понимания патофизиологии заболевания, но и механизма антидиабетического действия лекарственных препаратов с целью их направленного применения [8, 10]. К настоящему времени разработан ряд моделей экспериментального диабета [11], основными из которых являются: хирургическая (полное или частичное удаление поджелудочной железы); химическая модель (используется введение химических веществ, избирательно воздействующих на β -клетки островков: аллоксан, стрептозотонин), генетические модели (получение трансгенных животных). Моделирование «диабетической стопы», как правило, проводится на фоне стрептозотонин-индуцированного диабета с принудительным инфицированием лапы Синегнойной палочкой (*Pseudomonas aeruginosa*) и Золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*) [12, 13].

Целью данной работы стала разработка неинфекционной экспериментальной модели «диабетической стопы», с развитием ангио- и нейропатии.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на 30 крысах-самцах популяции линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных РАМН «Рапполово».

Кормление животных осуществлялось стандартным полнорационным гранулированным комбикормом приготовленным по ГОСТ Р 50258–92. Доступ к воде и корму был свободный. Крысы-самцы содержались в поликарбонатных клетках по 5 особей, при температуре 20–22°C. Содержание животных осуществлялось в соответствии с Правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) и Приказом Минздрава России от 23.09.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были разделены на контрольную (n=15) и опытную группы (n=15).

Формирование экспериментальной патологии у животных опытной группы проводили введением стрептозотонина (Sigma, США) в дозе 60 мг/кг однократно внутривентриально, спустя 15 минут после введения никотинамида (Sigma, США) в дозе 230 мг/кг (внутрибрюшинно).

С целью выявления биохимических и гистологических признаков диабета и его поздних осложнений у экспериментальных животных были проведены исследования в динамике. Концентрацию глюкозы в периферической крови измеряли глюкометром OneTouch Horizon («Lifescan», США). Линейный диапазон измерения 1,1 – 33,3 ммоль/л. Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови определяли с использованием набора «Диабет-тест» (Фосфорсорб, Россия). Метод основан на аффинной хроматографии гликозилированной и негликозилированной фракций гемоглобина в гемолизате крови. Линейный диапазон измерения 2,0 – 20,0%. Подсчет ретикулоцитов проводился согласно унифицированной методике после их окраски готовым красителем – бриллиантовым крезиловым синим (Диахим-Гемистейн-РТС) в пробирке (суправитальный пробирочный метод).

Для гистологического и иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, и по общепринятой методике заливали в парафин [5]. Затем изготавливали срезы толщиной 5–7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Иммуногистохимическое исследование включало в себя определение экспрессии нейронального маркера PGP 9.5 с использованием моноклональных антител производства фирмы Abcam. Постановка реакции проводилась непрямым трехступенчатым иммуноферментным LSAB (Labeled streptavidin–Biotin, DakoCytomation, LSAB 2 System – HRP) методом визуализации; выявление пероксидазной активности осуществляли с помощью 3,3-диаминобензидина, препараты докрашивали гематоксилином Майера. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось при помощи светооптического микроскопа CarlZeiss (Германия). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры AxioScoreA1 (Германия).

Результаты исследования и их обсуждение

Как известно механизм действия стрептозотонина связан с наличием в его химической структуре сахарозного остатка (гексозы), за счет которого, через транспортную систему ГЛЮТ-2, он включается β -клетками островков Лангерганса в обменные процессы вместо глюкозы. Попадая в клетку, стрептозотонин разрушается с образованием свободных радикалов и NO^{\cdot} , в результате происходит алкилирование ядерной ДНК и гибель клетки [14]. Предварительное введение никотинамида приводит к снижению диабетогенного действия стрептозотонина.

В ходе исследования было установлено, что спустя 5 недель у животных опытной группы наблюдали клинические проявления диабета, которые нашли отражение в статистически значимом увеличении концентрации глюкозы по отношению к контрольным животным более чем в 4 раза (рис. 1).

К концу исследования (14 неделя) у животных опытной группы сохранялась гипергликемия, которая дополнительно сопровождалась статистически значимым увеличением концентрации гликозилированного гемоглобина (HbA1c) более чем в 2 раза ($7,4 \pm 0,1\%$). Увеличение концентрации HbA1c характерно для течения гипергликемии, длительность имеет положительную корреляцию с частотой развития осложнений при диабете. Данный показатель отражает риск развития осложнений диабета.

Спустя 10 и 14 недель после моделирования экспериментального стрептозотонин-индуцированного диабета у животных опытной группы наблюдали статистически значимое увеличение уровня ретикулоцитов более чем в 3 раза (табл. 1).

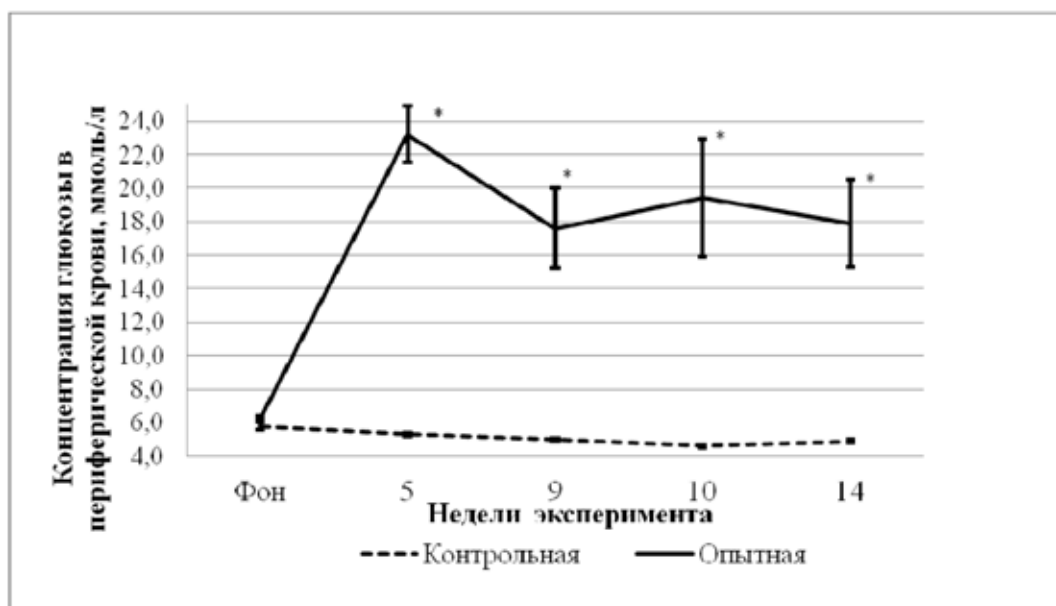


Рис. 1. Динамика изменения концентрации глюкозы в периферической крови крыс-самцов, ммоль/л

Таблица 1

Уровень ретикулоцитов в крови крыс-самцов, спустя 10 и 14 недель развития патологии, $M \pm m$ (n=15)

Группа	10 неделя	14 неделя
	Ретикулоциты, %	Ретикулоциты, %
Контрольная	15,5±1,4	14,2±1,7
Опытная	55,6±14,2*	57,0±5,4*

* – различия статистически значимы по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

На фоне хронического диабета в тканях возникает дефицит кислорода и компенсаторно происходит увеличение эритропоэза [6, 7], что сопровождается выходом в системный кровоток молодых эритроцитов и ретикулоцитов. Уровень ретикулоцитов в периферической крови при окислительном стрессе отражает степень гипоксии тканей [2, 9].

Гистологическая оценка подтвердила наличие изменений характерных для диабетической патологии. В опытной группе наблюдали типичные проявления микроангиопатии, характерные для отсроченных осложнений диабета (рис. 2–6). У животных данной группы наблюдали продуктивный капиллярит со слабо выраженным периваскулярным склерозом, а также скле-

роз стенок артериол. В тканях выявляли периваскулярную лимфо-гистиоцитарную инфильтрацию от слабой до умеренной выраженности, частично затрагивающую периневральные зоны. Кроме того была выявлена аксональная дегенерация, демиелинизация и очаговый некробиоз аксонов. Трофические нарушения приводили к дистрофическими нарушениям в коже, где отмечался выраженный гиперкератоз и слабо выраженный акантоз, местами с вовлечением в процесс придатков кожи (волосяных фолликулов, сальных и потовых желез). Патологический процесс частично затрагивал костно-суставную структуру в виде дистрофических изменений хрящевой ткани. В тканях крыс-самцов контрольной группы отличий от нормы не выявлено.

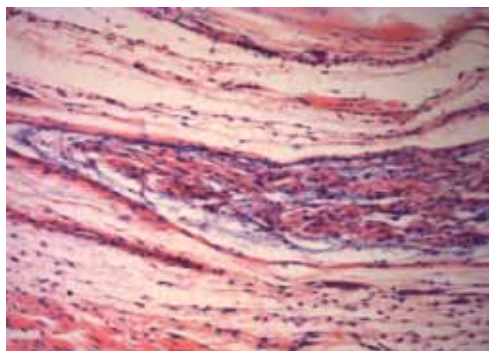


Рис. 2. Аксональная дегенерация и очаговый некробиоз аксонов в нервном стволе. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

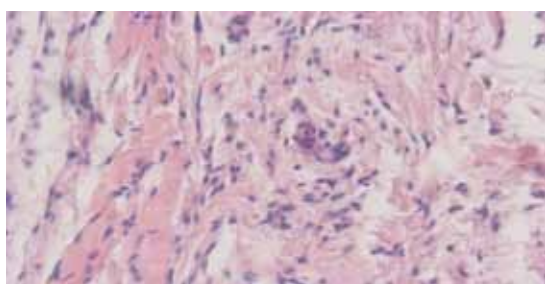


Рис. 3. Умеренно выраженная диффузная лимфоплазмоцитарная инфильтрация, преимущественно периваскулярных и периневральных зон, соединительнотканые «муфты» в периневральных зонах (стрелка). Увеличение 200

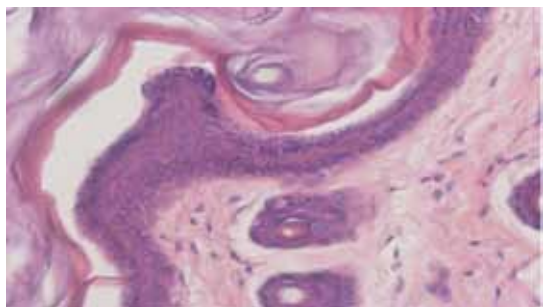


Рис. 4. Выраженный гиперкератоз и слабо выраженный акантоз, вовлечение в патологический процесс придатков кожи (волосяных фолликулов). Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение 200

При иммуногистохимическом исследовании с применением маркера PGP 9.5 в опытной группе крыс-самцов наблюдалась диабетическую нейропатию, которая выражалась в снижении плотности нервных волокон за счет аксональной дегенерации, демиелинизации и очагового некробиоза (рис. 5). В контрольной группе животных отличий от нормы не выявлено (рис. 6).

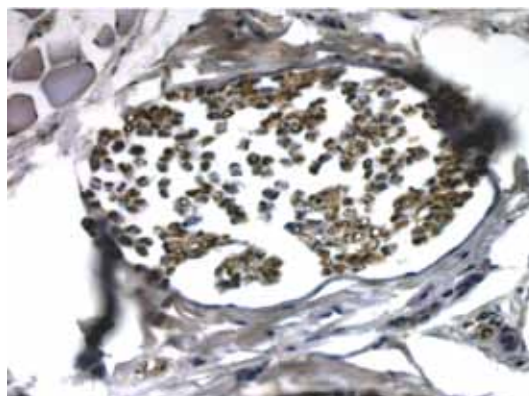


Рис. 5. Кожа стопы крысы контрольной группы. Нервные волокна без отклонения от нормы. Иммуногистохимическое окрашивание. Экспрессия нейронального маркера PGP 9.5 в осевых цилиндрах. Увеличение 200

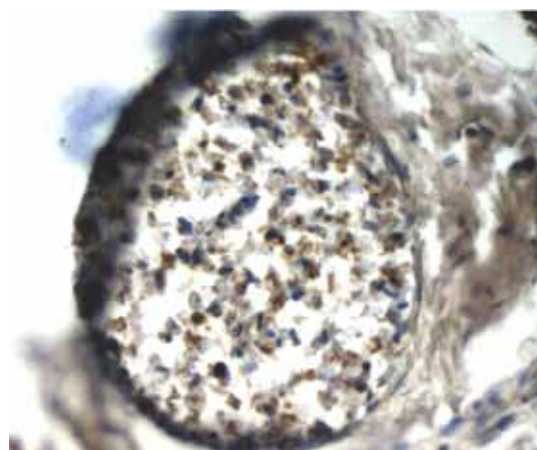


Рис. 6. Кожа стопы крысы опытной группы. Нервные волокна с очагами демиелинизации, дегенерации тигроидной субстанции осевых цилиндров. Иммуногистохимическое окрашивание. Снижение экспрессии нейронального маркера PGP 9.5 в осевых цилиндрах. Увеличение 200

Таким образом, данные гистологического и иммуногистохимического исследования подтверждают развитие ангио- и нейропатий у лабораторных животных.

Выводы

Биохимические исследования крови лабораторных крыс-самцов с модельной патологией стрептозотоцин-индуцированного диабета выявили стойкие изменения углеводного обмена (гипергликемия (концентрация глюкозы в крови опытных животных находилась в диапазоне 17–23 ммоль/л), повышение концентрации HbA1 (в два раза по сравнению с контрольной группой)), увеличение уровня ретикулоцитов более

чем в 3 раза, свидетельствующие о развитии диабета у животных.

Спустя 14 недель исследования у лабораторных животных определяются структурно-морфологические изменения, свидетельствующие о развитии ангио- и нейропатии.

Модель длительно-текущего стрептозоцин-индуцированного диабета может быть рекомендована для изучения специфической активности новых препаратов, для терапии отсроченных осложнений диабета.

Список литературы

1. Доскина, Е.В. Причины неудач в компенсации пациентов с сахарным диабетом 2 типа. Роль постпрандиальной гликемии // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 129–135.
2. Кондрагьев Я.Ю., Носиков В.В., Дедов И.И. Полиморфные генетические маркеры и сосудистые осложнения сахарного диабета // Проблемы эндокринологии. – 1998. – Т. 44. № 1. – С. 43–51.
3. Маслова О.В., Сунцов Ю.И. Эпидемиология сахарного диабета и микрососудистых осложнений // Сахарный диабет. 2011. – №3. – С. 6–12.
4. Можейко Л.А. Экспериментальные модели для изучения сахарного диабета часть I. Аллоксановый диабет // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2013. – № 3. – С. 26–29.
5. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. – 2014. – №2. – С.103–109.
6. Погорелов В.М., Медовый В.С., Балабуткин В.А. и др. Методы компьютерной цитологии в гематологических исследованиях // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – № 11. – С. 40–44.
7. Пятницкий А.М., Соколинский Б.З., Бетрзова М.В. и др. Анализ эритроцитов в системе МЕКОС-Ц // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №10. – С. 8–9.
8. Спасов А.А., Воронкова М.П., Снигур Г.Л., Чепляева Н.И., Чепурнова М.В. Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2 // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 12–18.
9. Bessis M., Mochendas N. Blood Cells // Hematology. – 1975. Vol. 1. – P. 315–321.
10. Chatzigeorgiou A., Halapas A., Kalafatakis K., Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus // In Vivo. – 2009. Vol. 23. – P. 245–258.
11. Etuk E.U. Animals models for studying diabetes mellitus // Agriculture and Biology Journal of North America. – 2010. – Vol. 1 (2). – P. 130–134.
12. Hirsch T., Spielmann M., Zuhaili B. et al. Enhanced susceptibility to infections in a diabetic wound healing model // BMC Surgery. – 2008. Vol. 8(5). – P.1–8.
13. Mendes J., Leandro C., Bonaparte D. et al. A Rat Model of Diabetic Wound Infection for the Evaluation of Topical Antimicrobial Therapies // Comparative Medicine. – 2012. Vol. 62 (1). – P.37–48.
14. Okamoto H. Regulation of proinsulin synthesis in pancreatic islets and a new aspect to insulin dependant diabetes // Molecular Cell Biochemistry. – 1981. – N 37. – P. 43–61.