

В.В. Рушак, В.М. Коваленко, А.К. Вороніна, В.О. Кітам, О.В. Максимчук,  
М.О. Чашин

## Оптимізація моделі гіперглікемії для вивчення розвитку метаболічного синдрому у тварин

*Нині цукровий діабет входить до тріади найпоширеніших хвороб. У дослідженні механізмів його розвитку використовують низку тваринних моделей, більшість яких відтворюють ознаки цукрового діабету 1-го типу. Вивчення патогенезу цукрового діабету 2-го типу ускладнене у зв'язку з відсутністю адекватних моделей. У нашій роботі, ґрунтуючись на відомій моделі гіперглікемії, запропоновано модель, що відтворює ознаки метаболічного синдрому – попередника цукрового діабету 2-го типу. Розвиток метаболічного синдрому викликали внутрішньом'язовим введенням морським свинкам впродовж 28 діб сульфату протаміну в дозі 15 мг/кг і утриманням їх на високовуглеводній дієті. У тварин спостерігали підвищення вмісту глюкози та холестерину в крові, зменшення вмісту глікогену в печінці, розвиток структурно-функціональних пошкоджень і зменшення кількості функціонально активних  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Отримані результати свідчать про розвиток у тварин ознак метаболічного синдрому, що дає можливість запропонувати такий методичний підхід для створення перспективної моделі цукрового діабету 2-го типу.*

*Ключові слова: метаболічний синдром, діабет, сульфат протаміну, тваринна модель, морські свинки.*

### ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) – це захворювання, зумовлене абсолютним або відносним дефіцитом інсуліну і порушенням усіх видів обміну речовин, в першу чергу – вуглеводного. Розрізняють два основних типи такої патології. ЦД 1-го типу є наслідком дисфункції  $\beta$ -клітин підшлункової залози, що призводить до зниження або відсутності продукції ними інсуліну [11]. Значно частіше спостерігається захворювання на ЦД 2-го типу. Ця патологія виникає внаслідок хронічного порушення обміну речовин, що спричинює стійку гіперглікемію та гіперінсулінемію. Остання, в свою чергу, викликає розвиток інсулінорезистентності [9], яка призводить до різноманітних розладів внутрішньоклітинних метаболічних процесів у тканинах майже всіх органів [6]. Попередником ЦД є метаболічний синдром (МС), розвиток якого супроводжується гіперглікемією, гіперліпідемією, змінами інших ланок обміну речовин. Основні патологічні

зміни при МС відбуваються в підшлунковій залозі та печінці. Порушення функціонування цих органів на фоні постійної гіперглікемії свідчить про розвиток МС [2]

Різке зростання частоти захворювання, тяжкі ускладнення та висока летальність, особливо серед працездатного населення, призвели до внесення ЦД до тріади найпоширеніших сучасних хвороб (після серцево-судинних та онкологічних захворювань). Так, в Україні кількість хворих на ЦД за останні 10 років підвищилася більш ніж у 1,5 раза, це близько 1 млн. чоловік, серед яких майже 90 % хворіє на ЦД 2-го типу. Отже, дослідження патогенезу ЦД 2-го типу надзвичайно важливе для профілактики, ранньої діагностики та лікування цього захворювання.

Сучасні моделі ЦД 2-го типу базуються на виведенні чистих ліній тварин зі спадковою схильністю до цього захворювання або на його індукції певними хімічними речовинами [19]. Проте всі ці моделі мають суттєві

© В.В. Рушак, В.М. Коваленко, А.К. Вороніна, В.О. Кітам, О.В. Максимчук, М.О. Чашин

недоліки: тривалий період розвитку, необхідність специфічних умов утримання тварин, висока вірогідність розвитку побічних патологічних процесів, нестійкість симптомів захворювання, складність екстраполяції отриманих даних на організм людини тощо.

Метою нашої роботи було розробити доступну, стійку та адекватну модель МС – попередника ЦД 2-го типу, яка дасть змогу досліджувати процеси, що відбуваються під час розвитку цього захворювання.

## МЕТОДИКА

Всі експерименти на тваринах були проведені відповідно до норм Європейської конвенції із захисту хребетних тварин при їх використанні в експериментах та інших наукових цілях [3]. У роботі було використано 15 чотиримісячних самців морських свинок із середньою масою 370 г.

При відтворенні у дослідних тварин симптомів МС було використано підхід, оснований на тривалому введенні сульфату протаміну, що призводить до розвитку гіперглікемії і, як наслідок, до інсулінорезистентності та гіперінсулінемії – визначальних ознак у патогенезі ЦД 2-го типу [10, 15, 17, 18]. Для ефективного розвитку симптомів МС у нашій роботі, порівняно з оригінальним підходом [10], було збільшено дозу сульфату протаміну (з 10 до 15 мг/кг) та тривалість його введення (з 3 до 4 тиж). Для прискорення розвитку гіперглікемії питну воду в раціоні дослідних тварин було замінено на 5%-й розчин глюкози.

Розвиток МС у морських свинок оцінювали через добу після останнього введення їм сульфату протаміну (1-ша група). В сироватці крові тварин за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора (Prestige 24i, «Токуо Воекі», Японія) визначали вміст загального білірубину, холестерину, глюкози, активність аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартамінотрансферази (АсАТ). Для перевірки стійкості симптомів захворювання ці показники аналізували у тварин, яких утримували

за стандартних умов ще 14 діб (2-га група). Як контроль використовували інтактних морських свинок. Результати представлено в таблиці у вигляді середніх значень відповідних показників із врахуванням середньо-квадратичних відхилень ( $M \pm m$ ).

Для оцінки структурно-функціонального стану тканин внутрішніх органів тварин проводили їх гістологічне дослідження. Зразки тканин печінки та підшлункової залози фіксували в 10%-му розчині формаліну та зневоднювали в серії зростаючої концентрації (80, 90, 95 та 96 %) спиртів етанолу та о-ксилолу [5]. Отриманий матеріал заливали очищеним парафіном і виготовляли зрізи товщиною 4 мкм. Для проведення загально-морфологічного аналізу тканин печінки їх фарбували гематоксилином і еозином [5]. Для дослідження функціонального стану  $\beta$ -клітин, препарати тканин підшлункової залози фарбували альдегід-фуксином [5]. Для оцінки вмісту глікогену в гепатоцитах у зразках тканин печінки проводили PAS-реакцію [5].

При статистичній обробці результатів дослідження використовували пакет статистичних програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc. 2004, США). Значення  $P \leq 0,05$  розглядали як критерій значущості різниці.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що визначальну роль у розвитку низки ускладнень МС і ЦД відіграє оксидативний стрес, викликаний виснаженням системи антиоксидантного захисту та накопиченням вільних радикалів [13]. Ефект оксидативного стресу проявляється в пошкодженні структури мембран, порушеннях ліпідного та вуглеводного обміну, розвитку структурно-функціональних змін у клітинах майже всіх органів [8, 14]. Найбільш активно такі патологічні процеси відбуваються у клітинах підшлункової залози та печінки [6]. Показано, що вітамін С є потужним антиоксидантом, який може справляти значний вплив на розвиток МС і ЦД [4, 16, 21]. Для запобігання

цьому ефекту в нашій роботі було використано саме морських свинок, в організмі яких, на відміну від інших гризунів, не синтезується вітамін С [12]. Слід зазначити, що в організмі людини також немає ендогенного вітаміну С, що дає змогу використовувати отримані результати як попередні при дослідженні МС і ЦД у людини.

Результати біохімічного аналізу сироватки крові (таблиця) показують, що на 28-ту добу введення сульфату протаміну у дослідних тварин (група 1) з'являються ознаки гіперглікемічного стану – підвищення в сироватці крові вмісту глюкози та холестерину на 15 та 40 % відповідно. Також підвищується відносно контролю індекс де Рітіса (співвідношення АсАТ до АлАТ) до значення 1,5 од., що є характерною ознакою розвитку запальних процесів у печінці. Водночас коефіцієнт корелює зі ступенем вираженості фіброзу цього органа [1]. Збільшення вмісту холестерину може свідчити про підвищений вміст інсуліну, який, як відомо, є індуктором його синтезу [19]. Через 2 тиж у групі контролю стійкості симптомів захворювання (група 2) спостерігається подальше зростання вмісту глюкози та індексу де Рітіса (див. таблицю). Повернення вмісту холестерину до контрольних значень може

вказувати на зниження синтезу інсуліну або на розвиток інсулінорезистентності [19]. Зменшення вмісту загального білірубину в сироватці крові дослідних тварин групи 2 більш ніж втричі відносно групи 1 імовірно свідчить про надлишок вільних радикалів і розвиток системного оксидативного стресу, характерного для ЦД 2-го типу [22]. Таким чином, можна зробити висновок, що після 4 тиж введення тваринам сульфату протаміну у них проявляються ознаки гіперглікемічного стану, в той час як ознаки МС – через 2 тиж після останнього його введення (група 2). Цей висновок підтверджується й тим, що в групі 1 вміст глюкози суттєво не відрізнявся від контрольних значень, а в групі 2 перевищував – майже вдвічі (див. таблицю). Таке зростання можна пояснити дисфункцією β-клітин, викликану процесами глюкозотоксичності, характерними для початкової стадії розвитку ЦД 2-го типу [19]. Ми вважаємо, що розвиток інсулінорезистентності у поєднанні з високовуглеводною дієтою надалі може викликати виснаження β-клітин підшлункової залози дослідних тварин та призводити до зменшення вмісту ендогенного інсуліну.

Для перевірки цих припущень було проведено гістологічний аналіз морфофункціо-

**Показники біохімічного аналізу сироватки крові тварин після 28-добового введення сульфату протаміну (M±n; n = 5)**

Група тварин, схема досліджу	Загальний білірубін, мкмоль/л	Холестерин, ммоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Аланінаміно-трансфераза, нмоль/(с . л)	Аспартатаміно-трансфераза, нмоль/(с . л)
Контроль	0,53±0,02	1,05±0,05	6,8±0,3	607,61±9,0	686,50±7,8
Група 1					
Через добу після останнього введення препарату	0,63±0,03*	1,44±0,07*	7,66±0,4	696,94±8,3*	1049,44±8.1*
Група 2					
Через 14 діб після останнього введення препарату	0,17±0,01*	0,99±0,045	12,65±0,6*	606,25±11,0	1390,25±12,0*

\*P ≤ 0,05 – достовірна різниця у порівнянні з інтактними тваринами.

нального стану печінки та підшлункової залози. Показано, що у тварин через 2 тиж після останнього введення сульфату протаміну (група 2) морфофункціональні зміни були значно більш виражені, ніж в групі 1. Саме тому порівнювали результати гістологічного дослідження тканин інтактних тварин і тварин групи 2.

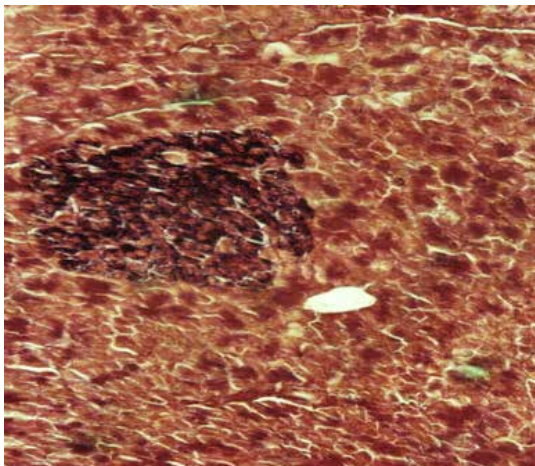
Інсулінпродукуючі клітини інтактних тварин виявлялися, в основному, в центральній частині острівців, дрібні секреторні гранули щільно заповнювали цитоплазму  $\beta$ -клітин та інтенсивно забарвлювалися, що вказує на нормальний функціональний стан клітин (рис. 1). У підшлунковій залозі дослідних тварин острівці були невеликих розмірів зі зменшеною кількістю  $\beta$ -клітин, цитоплазма деяких з них не забарвлювалась. Ядра в них деформовані та частково зазнавали лізису. Не було виявлено інсулінпродукуючих клітин поза межами панкреатичних острівців. Означені зміни свідчать про послаблення ендокринної функції підшлункової залози [7]

Морфофункціональний аналіз стану тканин печінки (рис. 2, 3) показав, що архітекtonіка печінки інтактних тварин не порушена.

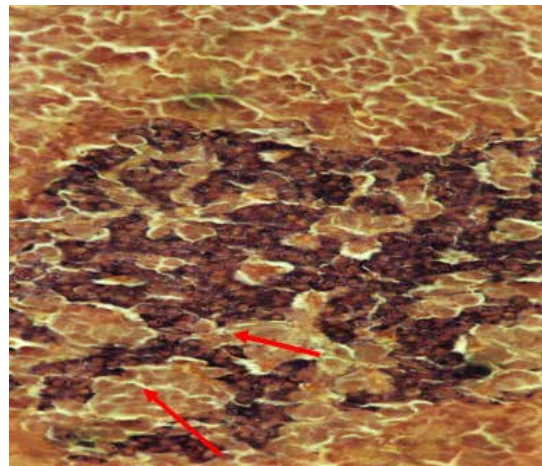
Гепатоцити багаті на ацидофільну цитоплазму та мають багатогранну форму з чітко означеними межами. Центральна зона клітин зайнята круглими ядрами з 1–2 ядерцями різних розмірів. У гепатоцитах дослідних тварин у цитоплазмі з'являються невеликі вакуолі. Ядра клітин, що оточують судини, мають неправильну форму (див. рис. 2). Такі зміни можуть свідчити про розвиток запальних процесів у печінці дослідних тварин [7].

За допомогою PAS-реакції нами було виявлено, що вміст глікогену в гепатоцитах дослідних тварин порівняно з контролем істотно знижувався (див. рис. 3). Такі зміни можуть бути пов'язані з розвитком інсулінорезистентності клітин печінки, оскільки цей процес призводить до посилення катаболізму глікогену та вивільнення глюкози [7]. Останнє спричиняє подальший розвиток гіперглікемії та посилення синтезу інсуліну і, як наслідок, може призводити до виснаження інсулінпродукуючого апарату та дисфункції підшлункової залози.

Отже, отримані результати свідчать про формування у дослідних тварин групи 2 стійких симптомів МС – розвитку гіперглікемії, інсулінорезистентності та появи патологіч-



а



б

Рис. 1. Мікрофотографії тканин підшлункової залози (фарбування альдегід-фуксином): а – інтактні тварини; б – дослідні тварини через 14 діб після останньої ін'єкції сульфату протаміну. Стрілками вказані дистрофічні зміни острівців Лангерганса. Н&Е,  $\times 290$



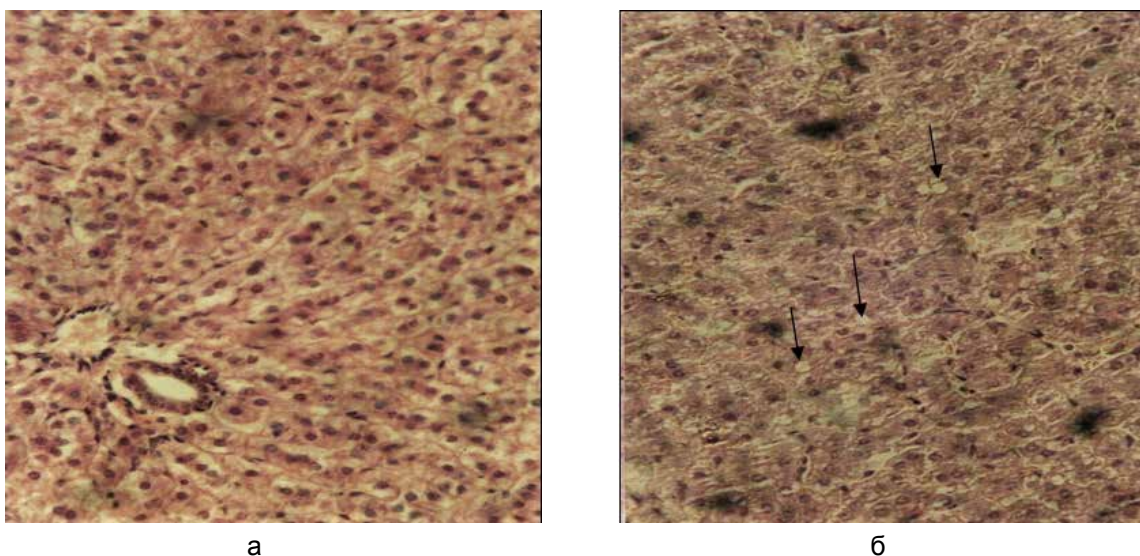


Рис. 2. Мікрофотографії тканин печінки тварин (фарбування гематоксилином-еозином): а – інтактні тварини; б – дослідні тварини через 14 діб після останньої ін'єкції сульфату протаміну. Стрілками вказаний мікроезичулярний стеатоз. Н&Е, x290

них процесів у печінці і підшлунковій залозі.

Таким чином, введення сульфату протаміну морським свинкам, які утримуються на високовуглеводній дієті, спричиняє появу таких ознак МС, як гіперглікемія, зменшення вмісту глікогену в печінці, розвиток структурно-функціональних пошкоджень гепатоцитів

і  $\beta$ -клітин підшлункової залози. Такі ознаки розвиваються на 2-й тиждень після останньої ін'єкції тваринам препарату, яке проводили протягом 28 діб. Отримані результати дають можливість запропонувати цей методичний підхід для створення перспективної моделі ЦД 2-го типу.

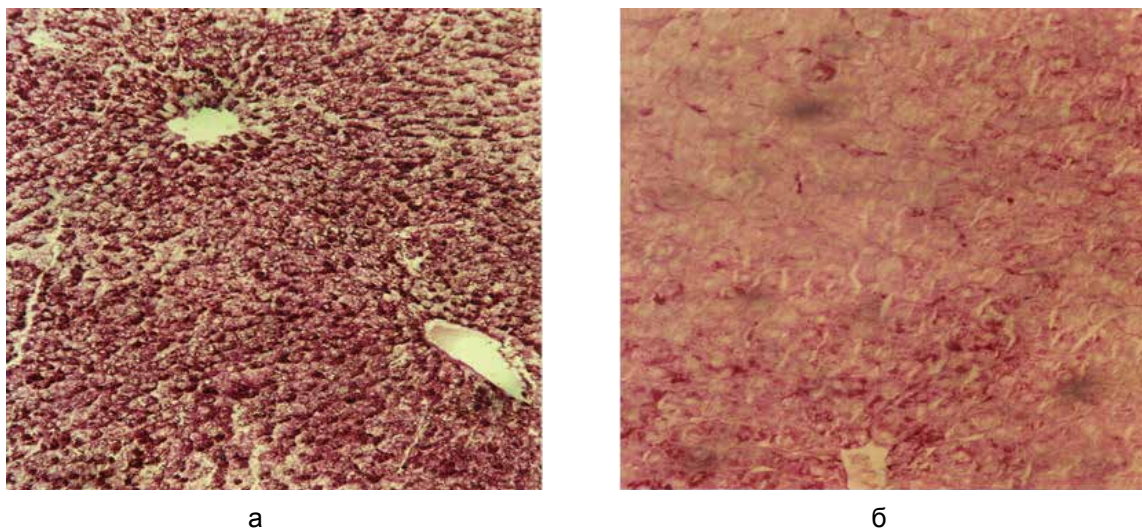


Рис. 3. Мікрофотографії тканин печінки (PAS-реакція на вміст глікогену): а – інтактні тварини; б – дослідні тварини через 14 діб після останньої ін'єкції сульфату протаміну. Н&Е, x180

**В.В. Рушчак, В.Н. Коваленко, А.К. Воронина,  
В.О. Китам, О.В. Максимчук, Н.А. Чашин**

## **ОПТИМИЗАЦИЯ МОДЕЛИ ГИПЕРГЛИКЕМИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗВИТИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА**

Сахарный диабет входит в триаду самых распространенных болезней. В исследовании механизмов его развития используют ряд животных моделей, большинство из которых воспроизводят признаки сахарного диабета 1-го типа. Изучение патогенеза сахарного диабета 2-го типа затруднено в связи с отсутствием адекватного моделирования этого заболевания. В данной работе, основываясь на существующей модели гипергликемии, предложено модель, которая воспроизводит признаки метаболического синдрома – предшественника сахарного диабета 2-го типа. Развитие симптомов диабета вызывали путем внутримышечного введения морским свинкам в течение 28 сут сульфата протамина в дозе 15 мг / кг и содержания их на высокоуглеводной диете. У экспериментальных животных наблюдали повышение концентрации глюкозы и холестерина в крови, уменьшение содержания гликогена в печени, развитие структурно-функциональных повреждений и уменьшение количества функционально активных β-клеток поджелудочной железы. Полученные результаты свидетельствуют о развитии у животных признаков метаболического синдрома, что дает возможность предложить такой методический подход для создания перспективной модели сахарного диабета 2-го типа.

Ключевые слова: метаболический синдром, диабет, сульфат протамин, животная модель, морские свинки.

**V. Rushchak, V. Kovalenko, A. Voronina, V. Kitam,  
O. Maksymchuk, M. Chashchyn**

## **OPTIMIZATION OF ANIMAL MODEL FOR INVESTIGATION OF PATHOGENESIS OF TYPE 2 DIABETES**

Diabetes mellitus is one of the three most common modern diseases. A number of animal models is used in investigations of the mechanisms of development of the disease. Most of these models replicate the symptoms of type 1 diabetes mellitus. The development of type 2 diabetes is caused by the insulin resistance, hyperglycemia, structural and functional disorders of the pancreatic cells. Investigation of pathogenesis of type 2 diabetes is complicated by the lack of adequate models of this disease. In this work, based on existing hyperglycemia model, we propose the model of metabolic syndrome as a precursor of type 2 diabetes. The development of metabolic syndrome symptoms was caused by 28 days long intramuscular injection of protamine sulfate to guinea pigs at a dose of 15 mg/kg along with keeping of animals on a high glucose diet. Increased blood glucose and cholesterol levels, reduction of glycogen in liver, the structural and functional damage and reduce in the number of functionally active β-cells in the

pancreas of the experimental animals were observed. The results confirm the development of the metabolic syndrome symptoms in experimental animals, which makes it possible to use such methodical approach in creation of promising type 2 diabetes model.

Key words: metabolic syndrome, diabetes, protamine sulfate, animal model, guinea pigs.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;*

*Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Бабак О.Я., Колесникова Е.В., Кравченко Н.А. Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения // Суч. гастроентерологія. – 2009. – № 2. – С. 5–17.
2. Боднар П.М., Кононенко Л.О., Михальчишин Г.П. Метаболічний синдром (огляд літератури) // Журн. АМН України. – 2000. – № 4. – С. 34–37.
3. Бухтіарова Т., Стефанов О., Коваленко В. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика // Наказ МОЗ України № 95 від 16.02.2009 р. – 27 с.
4. Занозина О.В., Боровков Н.Н., Балаболкин М.И.. Необходимость и достаточность использования антиоксидантов в терапии больных сахарным диабетом 2 типа // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2006. – Прил. 1. – С. 112–118.
5. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники – М.: СпецЛит, 2010. – 94 с.
6. Кузишин О.В., Ковалишин Н.В., Алмашина Х.В. Біохемія цукрового діабету: 1. Теоретична частина (огляд) // Мед. хімія. – 2010. – № 2. – С. 74–115.
7. Михайлов В.В. Основы патологической физиологии: руководство для врачей – М.: Медицина, 2001. – 704 с.
8. Подільчак М.Д., Вдовиченко В.І., Терлецька Л.М. Перекисне окислення ліпідів і пероксидазна активність сироватки крові при захворюваннях гепатобіліарної системи // Лік. справа. – 1996. – № 1. – С. 110–112.
9. Рунихин А.Ю., Новикова Ю.В. Современные аспекты патогенеза и лечения сахарного диабета 2 типа // Эндокринология. – 2007. – 15, № 27. – С.58–70.
10. Ульянов А.М., Тарасов Ю.А. Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина // Вопросы мед. химии. – 2000. – 46, № 2. – С. 149–154.
11. Чазова Т.Е. Основные принципы лечения сахарного диабета 1 типа // Рус. мед. журн. – 2003. – 11, №27. – С. 15–20.
12. Ahn T., Yun, C.H., Oh D.B., Tissue-specific effect of ascorbic acid supplementation on the expression of cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats // Toxicol. Lett. – 2006. – №166. – P. 27–36.
13. Dean–Roger T., Fu Schanlin, Stroker R.D.M. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation // Biochem. J. – 1997. – 324, № 1. – P. 1–18.

14. Folli F, Corradi D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach // *Curr. Diabetes Rev.* – 2011. – 7, № 5. – P. 313–334.
15. Horrow J. C. Protamine: a review of its toxicity // *Anesth. and Analg.* – 1985. – № 64. – P. 348–361.
16. Ischenko I.A., Milenkaya T.M. Efficacy of antioxidant usage in the treatment of diabetic retinopathy // *Clin. Ophthalm.* – 2007. – 8, №3. – P. 154–170.
17. Kudriashov B.A., Shapiro B.F., Ulyanov A.M. Protamine sulfate-induced resistance to the hypoglycemic effect of insulin // *Probl. Endokrinol.* – 1984. – 30, №1. – P. 51–69.
18. Kudrjashov B.A., Shapiro B.F., Ulyanov A.M. Role of heparin in realization of the hypoglycaemic action of insulin // *Acta Phys. Hung.* – 1987. – 69, №2. – P. 197–202.
19. Pihlajamäki, J.,H. Gylling, T.A Miettinen. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men // *J. Lipid Res.* – 2004. – №45. – P. 507–512.
20. Roep B.O., Atkinson M. Animal models have little to teach us about Type 1 diabetes: 1. In support of this proposal // *Diabetologia.* – 2004. – 47, №10. – P. 1650–1656.
21. Scott, J.A., King, G.L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes // *Annals N Y Acad. Sci.*– 2004.– №1031.– P. 204–213.
22. Yamaguchi T, Terakado M., Horio F. Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia –reperfusion of rat liver and induction of gene oxygenase // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – №223. – P.129–135.

*Ин-т мол. біології та генетики НАН України, Київ,*

*E-mail: v.v.rushchak@gmail.com;*

*Ин-т фармакології та токсикології НАН України, Київ,*

*E-mail: alla\_voronina@ukr.net*

*Матеріал надійшов до редакції 30.05.2012*