

ОПТИМІЗАЦІЯ СПОСОБУ МОДЕЛЮВАННЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ І ТИПУ У СТАТЕВОЗРІЛИХ САМЦІВ-ЩУРІВ ЛІНІЇ W1STAR*

Якименко О. Г., Сучок С. О., Михальчук Т. І., Моравська О. А.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова,

м. Вінниця, Україна

svitlana_suchok@ukr.net

За даними Міжнародної Діабетичної Асоціації спостерігається глобальне зростання рівня первинної захворюваності на цукровий діабет (ЦД) І типу серед дітей та підлітків [1].

Клінічний перебіг гнійно-запальних захворювань у дітей на тлі ЦД І типу має свої особливості, наукове дослідження яких потребує розробки ефективних експериментальних моделей ЦД І типу. Моделювання цієї патології дозволяє проводити оцінку лікувальної ефективності медикаментозних засобів, вивчати перебіг хірургічної патології та її ускладнень на тлі хронічної гіперглікемії, морфологічні та патофізіологічні зміни в органах-мішенях [2].

Відомі експериментальні моделі передбачають хірургічний, хімічний та генетичний способи індукції ЦД І типу. До недоліків існуючих підходів належить необхідність

тотальної панкреатектомії, що порушує фізіологічний процес травлення та загрожує розвитком зовнішнього інфікування й 90–100% летальністю серед піддослідних тварин [3].

Генетичні інбредні лінії щурів, зокрема LETL мають генетичну схильність до розвитку діабету, але його початок не контролюваний у віковому аспекті та обмежений 30% всередині популяції [4]. Хімічні агенти (алоксан, стрептозотонин) селективно ушкоджують β -клітини підшлункової залози та викликають діабет дозозалежно, що дозволяє уникнути системних токсичних проявів та високої летальності [5]. Проте оптимальний шлях введення та дозування досі залишається невирішеним.

Метою нашої роботи була комплексна оптимізація способу індукції стрептозотонинового (ЦД) І типу у статевозрілих

* Роботу виконано в межах планової наукової тематики Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова «Розробка та вдосконалення сучасних технологій діагностики, лікування, профілактики та реабілітації хірургічних захворювань у дітей» (державний реєстраційний № 018U00391).

Установою, що фінансує дослідження, є МОЗ України.

Автори гарантують повну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів і власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи та написанні статті.

Рукопис надійшов до редакції 4.07.2020.

щурів-самців лінії Wistar з комбінацією заходів щодо зниження загальнотоксичного впливу реагентів, запобігання транзи-

торної гіпоглікемії та, як наслідок, високої летальності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для проведення експерименту використовували 40 піддослідних тварин: статевозрілих щурів-самців лінії Wistar віком $9,33 \pm 0,91$ тижнів та масою тіла — $219,92 \pm 12,75$ грамів. Тварин утримували в умовах науково-дослідної лабораторії ВНМУ ім. М. І. Пирогова в окремих чистих клітках зі сталим температурним ($24\text{--}25^\circ\text{C}$) та світловим режимом (12/12). Раціон годування — комбінований, з вільним доступом до води. Період голодування перед виконанням процедури — 12 год. Було створено дві групи: контрольна — 20 та експериментальна — 20 тварин.

Експеримент здійснювався з дотриманням положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та згідно дозволу комітету біоетики ВНМУ ім. М. І. Пирогова.

Розроблений протокол моделювання цукрового діабету I типу (заявка на корисну модель № 202001475 від 02.03.2020) включав три ключові компоненти:

- 1) використання мінімально токсичного дозування препарату;
- 2) підвищення чутливості лабораторних тварин до введення десструктивного агента;
- 3) запобігання транзиторній гіпоглікемії.

За 30 хв до оперативного втручання проводилась седація: метамізол натрію 50% — 0,1 мл/кг + хлорпромазину гідрохлорид 2,5% — 0,1 мл/кг внутрішньом'язово та вимірювання глікемії. Порошок стрептозотцину (Streptozocin, S0130, Sigma-Aldrich), що зберігався у морозильній камері при -20°C розчиняли в цитратному буфері (0,1 М; рН = 4,5). Свіжоприготований розчин стрептозотцину (10 мг/мл) вводили інтраперитонеально з розрахунку 60 мг/кг в перші 10 хв після приготування для запобігання деградації діючої речовини. Для інтраперитонеальної ін'єкції застосовували інсуліновий шприц 1,0 мл з голкою 29G.

Перед ін'єкцією тричі здійснювали обробку правої здухвинної ділянки 10% розчином бетадину. Голка вводилась під кутом 45° до поверхні передньої черевної стінки до відчуття її «провалювання». Після ін'єкції тварина поміщалась в окремих вольєр, де протягом перших 24 год отримувала per os 10% розчин глюкози ad libitum (експериментальна група тварин) для запобігання транзиторної гіпоглікемії. У контрольній групі тварини протягом вказаного періоду отримували 0,9% розчин натрію хлориду ad libitum.

Через 48 годин визначали рівень глікемії глюкометром Accu Check (Roche, Germany). Лабораторний критерій ЦД I типу — рівень глюкози $> 14,0$ ммоль/л [6]. Через 48/96/168 годин здійснювали моніторинг глікемії для виключення можливої реверсії до нормоглікемії та порівняння між експериментальною та контрольною групами.

Тварини також підлягали якісному моніторингу поведінки з використанням елементів тесту «відкритого поля» протягом 7 діб (168 год) після індукції стрептозотцинового діабету I типу.

Маса тіла повторно визначалась на 7 добу експерименту.

Глікемія тварин медикаментозно не корегувалась. Щурі продовжували отримувати стандартний корм.

Всі тварини зі стрептозотциновим ЦД I типу підлягали подальшій участі в суміжних експериментах з метою оцінки патоморфологічних змін внутрішніх органів.

Для статистичної обробки використовували стандартний пакет STATISTICA v. 10.0 (StatSoft, USA).

Дані подано у вигляді $M \pm m$, де M — середнє значення показників, m — середня стандартна похибка, якщо не вказано інше.

Перевірку на нормальність змінних здійснювали за непараметричними критеріями Колмогорова–Смірнова та Шапіро–Уїлка. Параметричний статистичний

аналіз включав аналіз із використанням t-критерію Стьюдента для залежних та незалежних вибірок. Значення $p < 0,05$ вважалось достовірним. Категоріальні змінні

представлені у вигляді % або часток від цілого, для їх аналізу використано точний критерій Фішера.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Протягом перших 4 год після експерименту тварини знаходились в стані помірної седації. Звична рухова активність та явища грумінгу повністю відновились протягом 6 год після ін'єкції. У 2 тварин відмічалось щадіння лівої задньої кінцівки. Харчова поведінка залишилась без змін.

При контрольному огляді через 24 год виявлено 1 тварину експериментальної групи — 5% (1/20) без ознак життєдіяльності. Тварина виключена з дослідження. Летальність у контрольній групі через 24 год — 40% (8/20), у 3 тварин рухова активність знижена, грумінг протягом 30 хв активного спостереження не відмічали; 48 год — 55% (11/20), $p = 0,0166$.

Летальність у подібному дослідженні Duan et Qin [7] (лабораторні тварини — щури-самці лінії Sprague-Dawley, період голодування — 12 год, дозування стрептозотоцину — 60 мг/кг, верифікація гіперглікемії через 72 год) становила 6/50 щурів, ще 4 тварини не досягли порогового показника гіперглікемії, який, на нашу думку, дещо завищений ($> 16,7$ ммоль/л). Цікавим з цього погляду є експеримент Ramos-Lobo et al. [8], що ставить критерієм включення глікемію $> 11,0$ ммоль/л в терміні 24 год після ін'єкції. Враховуючи трифазну дію стрептозотоцину при індукції діабету [5], а саме наявність гіпоглікемічної фази, що може бути помилково сприйнята як негативний результат індукції діабету в перші 24–48 год, ми вважаємо доцільним 48-годинний інтервал для верифікації ЦД I типу з обов'язковим призначенням 10% розчину глюкози ad libitum протягом 48 год після ін'єкції замість води.

Враховуючи потребу в ефективному моделюванні деструктивного процесу в β -клітинах з мінімальним токсичним ураженням інших систем організму, ми використали проміжні показники дозування — 60 мг/кг для ЦД I типу, які є безумовно вищими в порівнянні з класичними моделями для ви-

вчення перебігу ЦД II типу — 35 мг/кг [8]. Доза стрептозотоцину для індукції ЦД I типу у різних дослідженнях коливається від 55 до 65 мг/кг маси тіла, тоді як 100% летальність спостерігається уже при 70 мг/кг та вище [5]. Для захисту β -клітин від раптової тотальної деструкції з метою зниження ранньої летальності окремі автори також пропонують введення нікотинаміду в першу годину після індукції ЦД [5, 9]. У нашому дослідженні жодних допоміжних препаратів протекторної дії не використовувалось. Низька летальність в експериментальній групі, на нашу думку, зумовлена короткою тривалістю дослідження та запобіганням гіпоглікемічної фази при індукції, тому ми не виключаємо можливості використання нормоглікемізуючих та захисних ад'ювантів для моделювання хронічного ЦД I типу тривалістю більше 7–14 діб.

Через 48 год у щурів обох груп було відмічено типові стійки та активність у центральній площині «відкритого поля». У окремих тварин відмічалась незначна неохайність у вигляді скуйовдженої шерсті. Тварини залишались активними, тривалість перебування біля поїлки становила 20–30 с.

Чергове контрольне вимірювання глікемії (96 год) виявило її зниження до 11,2 та 9,6 ммоль/л у двох тварин експериментальної групи, що було ідентифіковано як реверсію [5]. Тварини були вилучені з подальшого моніторингу в рамках дослідження.

Тривалий період голодування сприяє ефективнішій індукції, зокрема Karan et al. (2013) описує процедуру індукції, якій передують 14 год голодування [10], у нашій роботі такий період становив 12 год, чого виявилось достатньо для успішного експерименту.

Через 168 год експерименту тварини обох груп дещо летаргічні, проте типові патерни харчової та дослідницької поведінки

зберігаються. При подразненні тактильним чинником характерне «завмирання», припинення дії чинника супроводжується відновленням активності (пооява стійок та грумінгу).

Зміни маси тіла тварин експериментальної групи представлено на рисунку 1.

Через 48 год верифіковано рівень глікемії > 14 ммоль/л у 95% (19/20) тварин експериментальної групи та 40% (8/20) тварин контрольної групи (1 щур з глікемією 12,8 ммоль/л — був вилучений з подальшого дослідження). Середні показники перевищували порогові майже удвічі. Динамічне вимірювання глікемії показало вірогідне підвищення рівня глікемії (табл. 1). Максимально зафіксований показник — 28,4 ммоль/л; 30,2 ммоль/л та 33,14 ммоль/л через 48 /96 / 168 годин, відповідно у експериментальній групі.

У роботі Karan et al. (2013) (дозування — 50 мг/кг) на 5 день експерименту рівень глюкози становив — $326,5 \pm 1,87$ мг/дл

($18 \pm 0,1$ ммоль/л) з довірчим інтервалом — 95%, а достовірне зростання глікемії в порівнянні з першим виміром відмічалось на 15-ий день дослідження, проте не досягало показника 20 ммоль/л [10].

Збільшення дози стрептозотоцину призводило до середнього значення глікемії, зокрема в дослідженні Saleh (2013) (дозування — 55 мг/кг), середній рівень глюкози становив — $429,00 \pm 8,08$ мг/дл ($23,81 \pm 0,45$ ммоль/л) [11].

Akbarzadeh et al. (2007) використовував подібну методику індукції стрептозотоцинового діабету з внутрішньовенним введенням розчину в дозі 60 мг/кг, середній рівень глюкози в цьому випадку становив $500,0 \pm 20,0$ мг/дл ($27,75 \pm 1,11$ ммоль/л) [12]. З нашого погляду процедура інтраперитонеальної ін'єкції позбавлена окремих недоліків при налагодженні венозного доступу, особливо у щурів з масою тіла менше 200 г, хоча й відрізняється шляхом циркуляції та розподілу реагента в організмі.

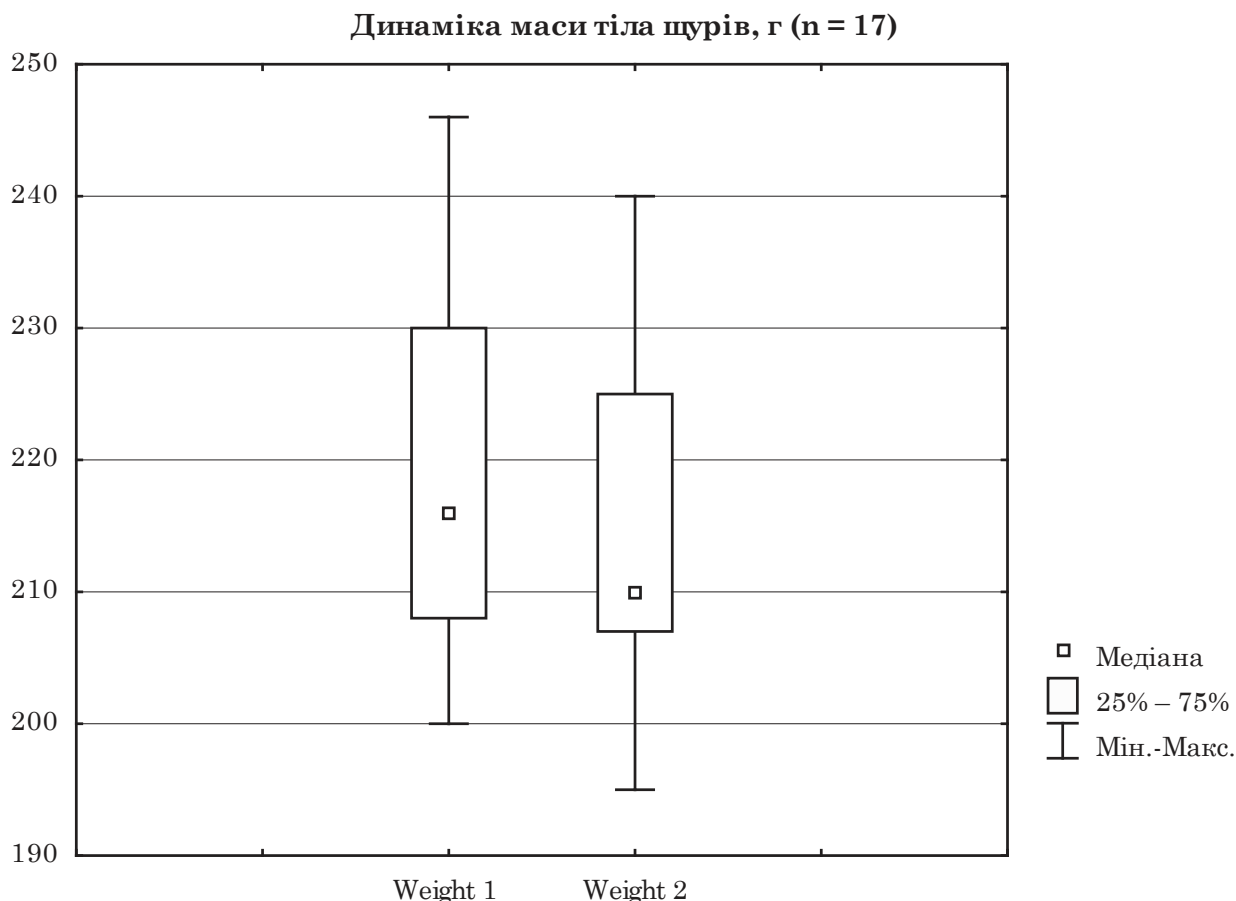


Рис. 1. Динаміка маси тіла статевозрілих щурів-самців до (Weight 1) та після індукції Стрептозотоцинового ЦД I типу (Weight 2) через 168 год; $p = 0,11206$.

Динаміка глікемії у статевозрілих щурів-самців лінії Wistar, $M \pm m$

Показник	(G-1) Показники глікемії натще до STZ-ін'єкції, ммоль\л	n (%)	(G-2) Показники глікемії через 48 год після ін'єкції, ммоль\л	n (%)	(G-3) Показники глікемії через 96 год після ін'єкції, ммоль\л	n (%)	(G-4) Показники глікемії через 168 год після ін'єкції, ммоль\л	n (%)
Тварини								
Експериментальна група (ЕГ)	4,72 ± 0,73	20 100,0	25,03 ± 2,45 p = 0,00000*	19 1† (95,0)	26,54 ± 1,87 p = 0,00000* p = 0,02982**	17 2‡ (85,0)	28,6 ± 2,49 p = 0,00000* p = 0,00063**	17 (85,0)
Контрольна група (КГ)	4,94 ± 0,78	20 100,0	25,93 ± 1,46 p = 0,00000*	9 11† (45%)	27,17 ± 1,74 p = 0,00000* p = 0,15908**	8 1^ (40%)	28,33 ± 2,64 p = 0,00000* p = 0,04851**	8 (40%)
Достовірність різниці (p) між показниками ЕГ та КГ	0,36305		0,33931		0,42375		0,803273097	

Примітка:

† — тварина загинула;

‡ — у тварини зареєстровано реверсію;

^ — порогова глікемія не досягнута;

* — у порівнянні з показниками G-1 для залежних вибірок;

** — у порівнянні з показниками G-2 для залежних вибірок.

Завдяки використанню мінімально токсичної дози стрептозотоцину в комбінації з тривалим голодуванням та запобігання транзиторної гіпоглікемії шляхом призначення перорального розчину глюкози в гру-

пі самців лінії Wistar нам вдалось створити ефективну модель ЦД I типу, що може широко застосовуватись для моделювання гострих ускладнень даної патології.

ВИСНОВКИ

1. Оптимізований протокол індукції цукрового діабету I типу у статевозрілих щурів-самців лінії Wistar введенням Стрептозотоцину (60 мг/кг) шляхом інтраперитонеальної ін'єкції з дотриманням 12-годинного періоду голодування та запобігання гіпоглікемії шляхом перорального введення 10% розчину глюкози є ефективним способом моделювання вказаної патології, що зумовлює розвиток клінічно значимої гіперглікемії (> 14 ммоль/л) через 48 годин.
2. Забезпечення перорального прийому 10% розчину глюкози в перші 24 год після індукції ЦД I супроводжуються нижчою летальністю — 5% (1/20) лабораторних тварин у порівнянні з контрольною групою — 55% (11/20), p = 0,0166.
3. Важливим аспектом є своєчасне виявлення та фіксація спонтанного відновлення нормоглікемії шляхом моніторингу рівня глюкози у тварин після лабораторної верифікації ЦД I типу.

ЛІТЕРАТУРА (REFERENCES)

- Patterson CC, Karuranga S, Salpea P, et al. *Diab Res Clin Pract* 2019; 157. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107842.
- Qinna NA, Badwan AA. *Drug design, development and therapy* 2015; 9: 2515-2525. doi: 10.2147/DDDT.S79885.
- Mozhejko LA. *Zhurn Grodnen gos med un-ta* 2013; 4(44): 5-10, available at: <http://elib.grsmu.by/handle/files/2350>.
- Kawano K, Hirishima T, Mori S, et al. *Rat News Lett* 1989; 22: 14-15.
- Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, et al. *Chemico-Biological Interactions* 2016; 244: 49-63. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.032.
- Stoeniu MS, De Vriese AS, Brouet A, et al. *Kidney Int* 2002; 62(2): 668-678. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00487.x.
- Duan X, Qin G. *Mol Med Rep* 2020; 21(2): 583-588. doi: 10.3892/mmr.2019.10857.
- Ramos-Lobo AM, Buonfiglio DC, Cipolla-Neto J. *Diabetol Metab Syndr* 2015; 7: 39. doi: 10.1186/s13098-015-0035-2.
- Szkudelski T. *Exp Biol Med* 2012; 237(5): 481-490. doi: 10.1258/ebm.2012.011372.
- Karan SK, Mondal A, Mishra SK. *Pharm Biol* 2013; 51(3): 369-375. doi: 10.3109/13880209.2012.730531.
- Saleh D, Bayoumi A, El-Eraky W, El-Khatib A. *Bull Faculty Pharm, Cairo University* 2013; 51. doi: 10.1016/j.bfopcu.2013.03.002.
- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, et al. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22(2): 60-64. doi: 10.1007/BF02913315.

ОПТИМІЗАЦІЯ СПОСОБУ МОДЕЛЮВАННЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ І ТИПУ У СТАТЕВОЗРІЛИХ САМЦІВ-ЩУРІВ ЛІНІЇ W1STAR

Якименко О. Г., Сучок С. О., Михальчук Т. І., Моравська О. А.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова,
м. Вінниця, Україна
svitlana_suchok@ukr.net

Моделювання цукрового діабету (ЦД) І типу дозволяє проводити оцінку лікувальної ефективності медикаментозних засобів, вивчати перебіг хірургічної патології та її ускладнень на тлі хронічної гіперглікемії, морфологічні та патофізіологічні зміни в органах-мішенях.

Метою дослідження була комплексна оптимізація способу індукції стрептозотоцинового ЦД І типу у статевозрілих щурів-самців лінії Wistar з комбінацією заходів щодо зниження загальнотоксичного впливу реагентів, запобігання транзиторної гіпоглікемії та, як наслідок, високої летальності.

Дослідження проведено на статевозрілих щурів-самців лінії Wistar: контроль — 20 тварин, експериментальна група — 20 тварин. Індукцію ЦД І типу всім щурам проводили інтраперитонеально ін'єкцією свіжоприготованого розчину стрептозотину (60 мг/кг). В перші 24 год після ін'єкції контрольна група отримувала per os 0,9% розчин натрію хлориду, експериментальна — 10% розчин глюкози ad libitum.

Через 48 годин визначався рівень глікемії глюкометром Accu Check (Roche, Germany). Критерій ЦД І типу — рівень глюкози >14,0 ммоль/л. Через 48/96/168 годин здійснювався моніторинг глікемії для виключення можливої реверсії до нормоглікемії. Через 48 год верифіковано рівень глікемії > 14 ммоль/л у 95% (19/20) тварин експериментальної групи та 40% (8/20) тварин контрольної групи; летальність склала 5% та 55% відповідно. Через 96 год реверсія глікемії спостерігалась в 2 щурів експериментальної групи.

Таким чином оптимізований протокол індукції ЦД І типу у статевозрілих щурів-самців лінії Wistar введенням стрептозотину (60 мг/кг) шляхом інтраперитонеальної ін'єкції з дотриманням 12-годинного періоду голодування та запобігання гіпоглікемії шляхом перорального введення 10% розчину глюкози є ефективним способом моделювання вказаної патології, що зумовлює розвиток клінічно значимої гіперглікемії (> 14 ммоль/л) через 48 годин. Важливим аспектом є своєчасне виявлення та фіксація спонтанного відновлення нормоглікемії шляхом моніторингу рівня глюкози у тварин після лабораторної верифікації ЦД І типу.

Ключові слова: щури Wistar, цукровий діабет І типу, модель цукрового діабету, стрептозотин.

**IMPROVEMENT OF STREPTOZOCIN-INDUCED
TYPE I DIABETES MELLITUS PROTOCOL
IN ADULT MALE WISTAR RATS**

Yakymenko O. G., Suchok S. O., Mikhalechuk T. I., Moravska O. A.

National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya,

Vinnytsya, Ukraine

svitlana_suchok@ukr.net

Animal model of type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a useful tool to test the efficacy of the modern medicines, study the course of surgical comorbidities and complications on the background of chronic hyperglycemia and pathology of the target organs.

We aimed to improve streptozocin-induced T1DM protocol in adult male Wistar rats by combination of the approaches to decrease the toxic effect of the chemical agents, prevent hypoglycemia and, as a result, reduce the animal mortality rate.

Adult male Wistar rats were divided into 2 groups: control — 20 animals and experimental — 20 animals. Protocol of streptozocin-induced T1DM (for both groups) consisted of the single intraperitoneal injection of the streptozocin solution (60 mg/kg). In order to prevent transitional hypoglycemia, animals (experimental group) were supplied with 10% Glucose solution or normal saline (control group) per os ad libitum for 24 h immediately after the injection.

Glycaemia was measured by blood sugar monitor Accu Check (Roche, Germany). Blood sugar > 14 mmol/l was considered as the criterium of T1DM. Continuous monitoring of glycemia was used (48/96/168) to detect the risk of possible reversion. Hyperglycemia > 14 mmol/l was detected in 9% (19/20) of animals (experimental group) and 40% (8/20) control animals 48 h after induction; mortality rate was 5% and 55%, respectively. Reversion was identified in 2 rats of the experimental group 96 h after induction.

Hence, improved T1DM induction protocol which included single intraperitoneal injection of the streptozocin solution (60 mg/kg), 12 h fasting period prior to the procedure and prevention of the transient hypoglycemia by administration of 10% glucose solution is an effective method to induce T1DM in adult male Wistar rats which induces clinically significant hyperglycemia (> 14 mmol/L). It is necessary to control blood glucose after T1DM confirmation in order to detect spontaneous reversion.

Key words: Wistar rat, diabetes mellitus type I, diabetes mellitus model, streptozocin.