

Т. А. Дубилей, Т. В. Тушинская, С. А. Мигован, Т. Л. Литвиненко

*Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев*

ОСОБЕННОСТИ ДИАБЕТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ СТРЕПТОЗОТОЦИНА У СТАРЫХ МЫШЕЙ

Исследовали патофизиологические проявления диабетического состояния и изменения уровня инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1) в плазме крови, возникающие у взрослых и старых мышей линии *C57BL/6* через 10 недель после курсового введения малых доз стрептозотоцина. Результаты экспериментов показали возрастное снижение чувствительности к диабетогенному действию препарата, что проявлялось в увеличении доли резистентных особей и особей с отсроченной манифестацией заболевания, а также в меньшей выраженности патофизиологических изменений — гипергликемии, оксидативного стресса, уменьшения массы лимфоидных органов. Предполагается, что ослабление диабетогенного эффекта стрептозотоцина у старых мышей могло быть обусловлено возникающей у них активацией секреции ИФР-1.

Ключевые слова: стрептозотоцин, ИФР-1, мышцы, старение.

Более 50 лет стрептозотоциновая модель сахарного диабета I типа применяется для изучения патогенеза данного заболевания и разработки новых методов его лечения. Согласно двум существующим схемам стрептозотоцин вводится либо однократно в большой дозе, либо многократно в малой, в обоих случаях вызывая деструкцию β -клеток, гипoinsулинемию и гипергликемию. Механизм токсического действия однократной большой дозы стрептозотоцина подобен таковому соединений нитрозомочевины и обусловлен алкилированием белков и ДНК [12]. Курсовое введение малых доз препарата вызывает в островковой ткани поджелудочной железы воспалительный процесс и иммунную реакцию, индуцируемую освобождением аутоантигена декарбоксылазы глутаминовой кислоты, с инфильтрацией панкреатических

островков *T*-лимфоцитами и макрофагами и образованием т. н. инсулитов. Однако первичным фактором, вызывающим гипергликемию, является не инфильтрация островков, а апоптоз β -клеток, что подтверждается успешным моделированием стрептозотоцинового диабета у атипических мышей [3, 14].

Выраженность диабетогенного действия стрептозотоцина варьирует в зависимости от генотипа и фенотипа животных. Наиболее чувствительны к нему крысы и приматы: однократное введение стрептозотоцина из расчета 50 мг/кг массы тела вызывает у них необратимую деструкцию 97 % β -клеток. Для получения аналогичного эффекта у свиней требуется гораздо более высокая доза препарата (150 мг/кг), кроме того, вскоре после введения наблюдается частичная коррекция гипергликемии и гипoinsулинемии за счет дифференцировки стволовых и компенсаторной гипертрофии оставшихся β -клеток [16]. Среди лабораторных мышей высокочувствительными к стрептозотоцину считаются линии *C57BL/6* и *DBA/2*, низкочувствительными — *MRL/Mp*, *BALB/c* и *129SvEv* [18]. Диабетогенное действие стрептозотоцина у самок проявляется слабее, чем у самцов, что обусловлено способностью эстрадиола защищать β -клетки от апоптоза, вызванного окислительным стрессом [11]. Имеют значение также алиментарные факторы, в частности, панкреотоксичность стрептозотоцина существенно усиливается на фоне диеты с высоким содержанием жира [4]. Данные литературы о возрастных изменениях чувствительности к диабетогенному действию стрептозотоцина противоречивы, а механизмы этих изменений до сих пор малоизучены [15]. В частности, остается без внимания роль инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), который обладает глюкозопонижающим, ростстимулирующим и противовоспалительным действием [10].

Цель работы — сравнить патофизиологические проявления диабетического состояния, а также концентрацию в плазме крови ИФР-1 у взрослых и старых мышей после курсового введения малых доз стрептозотоцина.

Материал и методы. Работа выполнена на взрослых (6 мес) и старых (19–23 мес) самцах мышей линии *C57BL/6* с исходной массой ($22,4 \pm 0,3$) г и ($27,6 \pm 0,6$) г, соответственно. Животные содержались в условиях вивария при свободном доступе к воде и корму и естественном режиме освещения.

Инсулинзависимый сахарный диабет моделировали курсовым введением стрептозотоцина ("*Serva*", Германия). Препарат растворяли *ex tempore* в 0,01 М цитратном буфере (рН 4,5) и вводили внутривентриально из расчета 40 мг/кг массы тела один раз в сутки в течение 5 суток. Контрольным животным по той же схеме вводили цитратный буфер. Через 4 недели после последнего введения у всех животных определяли уровень глюкозы в крови, взятой из надреза кончика хвоста (глюкометр Глюкофот, Украина). Через 10 недель после начала эксперимента мышей подвергали эвтаназии под кетаминным наркозом. В сыворотке крови, полученной после декапитации, определяли концентрацию глюкозы

("Филисит диагностика", Украина), триглицеридов ("Лахема", Чешская Республика), ИФР-1 (*Rat/Mouse IGF-1 ELISA, IDF*, Великобритания), ТБК-активных продуктов (ТБКАП) [1], в лизате эритроцитов — концентрацию гликозилированного гемоглобина ("Реагент", Украина).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Через 4 недели после окончания курсового введения стрептозотоцина гипергликемия (концентрация глюкозы в крови выше 11 ммоль/л) была обнаружена у 89 % взрослых и 60 % старых мышей, а через 10 недель — у 100 % взрослых и у 90 % старых животных.

Через 10 недель после курса стрептозотоцина масса тела контрольных взрослых мышей увеличилась, а старых практически не изменилась (таблица). В обеих возрастных группах животных с диабетом масса тела уменьшилась: у взрослых на 6 %, у старых на 3 %. Масса лимфоидных органов у взрослых мышей с диабетом была меньше, по сравнению с контрольными животными: тимуса на 53 %, селезенки на 30 %. В группе старых животных с диабетом масса тимуса была меньше, чем в контроле, на 37 %, а масса селезенки практически не отличалась от контроля. Прирост уровня глюкозы в плазме крови относительно контрольной группы у взрослых особей составлял 145 %, у старых — 109 %, а гликозилированного гемоглобина, соответственно, 65 % и 40 %. В обеих возрастных группах мышей с диабетом концентрация ТБКАП в плазме крови была повышена, в большей мере у взрослых животных (27 % против 23 %). Существенных изменений концентрации триглицеридов в плазме крови у мышей с диабетом обеих возрастных групп не выявлено. Уровень ИФР-1 в плазме крови у взрослых мышей при диабете существенно не изменялся, а у старых повышался на 15 %.

Изменения массы тела, масса лимфоидных органов и биохимические показатели крови у мышей разного возраста со стрептозототиновым диабетом ($M \pm m$)

Показатель	Взрослые		Старые	
	Контроль (12)	Диабет (9)	Контроль (9)	Диабет (9)
Изменения массы тела, г	3,8 ± 0,5	-1,3 ± 1,0*	0,9 ± 0,5 [#]	-0,8 ± 0,5*
Масса тимуса, мг	32,3 ± 2,6	15,2 ± 3,3*	11,0 ± 2,0 [#]	6,9 ± 1,5
Масса селезенки, мг	72,8 ± 4,0	50,8 ± 3,6*	80,5 ± 5,7	83,8 ± 7,6 [#]
Глюкоза, ммоль/л	9,5 ± 0,4	23,3 ± 1,9*	8,2 ± 0,5 [#]	17,2 ± 1,6 [#]
Гликозилированный Hb, мкмоль фруктозы/г Hb	6,0 ± 0,1	9,9 ± 0,6*	6,0 ± 0,2	8,4 ± 0,6*
Триглицериды, ммоль/л	0,56 ± 0,04	0,55 ± 0,05	0,36 ± 0,02 [#]	0,38 ± 0,02 [#]
ТБКАП, мкмоль/л	7,7 ± 0,3	9,8 ± 0,4*	6,5 ± 0,1 [#]	8,0 ± 0,3 [#]
ИФР-1, мкг/л	381,6 ± 20,6	340,6 ± 20,1	345,6 ± 15,5	396,7 ± 5,0 [#]

Примечания: в скобках — количество животных, * — $P < 0,05$ по сравнению с контрольными мышами аналогичного возраста, [#] — $P < 0,05$ по сравнению со взрослыми мышами аналогичной группы.

Как видно из представленных данных, курсовое введение мышам малой дозы стрептозотоцина приводило к повышению в крови концентрации глюкозы и гликозилированного гемоглобина, что свидетельствует о развитии инсулиндефицитного состояния. Имело место также характерное для диабетического статуса уменьшение массы тела, лимфоидных органов и увеличение в крови продуктов ПОЛ. У старых мышей перечисленные изменения были в целом менее выражены, чем у взрослых, что может указывать на более легкую форму заболевания. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами ранее на крысах линии Вистар, согласно которым после однократного введения стрептозотоцина прирост в крови уровня гликозилированного гемоглобина и снижение показателей сократительной способности изолированного сердца у старых животных были выражены слабее, чем у взрослых [2].

Как известно, проникновение стрептозотоцина через плазматическую мембрану β -клеток происходит благодаря его структурному сходству с глюкозой и обеспечивается переносчиком *GLUT2*, уровень экспрессии которого определяет чувствительность к диабетогенному действию препарата [6, 12]. Показано, что экспрессия данного белка в поджелудочной железе у крыс и мышей при старении снижается на 20–30 % [8]. В силу этого повреждающее действие стрептозотоцина у старых животных может быть выражено слабее, чем у взрослых, что соответствует полученным нами результатам. Еще одним фактором, сдерживающим развитие стрептозототинового диабета у старых мышей в наших экспериментах, могло быть увеличение в плазме крови концентрации ИФР-1. Как известно, ИФР-1 стимулирует выживание и рост β -клеток, активирует регенерацию белой жировой ткани, которая секретирует гипогликемические адипокины, а также может оказывать глюкозоснижающее действие посредством взаимодействия с рецепторами инсулина [5, 7]. Данные экспериментальных работ и клинических наблюдений свидетельствуют о том, что введение ИФР-1 либо стимуляция его секреции оказывают положительный терапевтический эффект при сахарном диабете I типа [13].

Таким образом, согласно представленным результатам, в старости у мышей уменьшается чувствительность к диабетогенному действию стрептозотоцина. Это проявляется в увеличении с возрастом доли резистентных особей, особей с отсроченной манифестацией заболевания, а также в ослаблении патофизиологических проявлений диабетического состояния — гипергликемии, оксидативного стресса и уменьшения массы лимфоидных органов. В числе механизмов таких возрастных особенностей можно предположить известное из литературы снижение при старении экспрессии *GLUT2* в β -клетках поджелудочной железы, а также обнаруженное нами повышение концентрации ИФР-1 в крови старых животных в ответ на введение стрептозотоцина.

Список использованной литературы

1. Андреева Л. И., Кожемякин Л. А., Кишкун А. А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лабор. дело. — 1988. — № 11. — С. 41–43.

2. Дубилей Т. А., Бадова Т. А., Мигован С. А., Рушкевич Ю. Е. Влияние ишемии/реперфузии на функцию изолированного сердца у взрослых и старых крыс со стрептозотоциновым диабетом // Пробл. старения и долголетия — 2007. — **16**, № 1. — С. 11–20.
3. Beattie G., Lannon R., Lipsick J. et al. Streptozotocin-induced diabetes in athymic and conventional BALB/c mice // Diabetes. — 1980 — **29**, № 2. — P. 146–150.
4. Chen D., Wang M. W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes // Diabetes, obesity & metabolism. — 2005. — **7**, № 4. — P. 307–317.
5. Chowdhury S., Wang X., Srikant C. B. et al. IGF-I stimulates CCN5/WISP2 gene expression in pancreatic β -cells, which promotes cell proliferation and survival against streptozotocin // Endocrinology. — 2014. — **155**, № 5. — P. 216–226.
6. Dufrane D., van Steenberghe M., Guiot Y. et al. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs, primates): role of GLUT2 transporter and β -cell plasticity // Transplantation. — 2006. — **81**. — P. 36–45.
7. Gunawardana S. C., Piston D. W. Insulin-independent reversal of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice with brown adipose tissue transplant // Physiol. Endocrinol. Metab. — 2015. — **308**, № 12. — P. 1043–1055.
8. Gurley S. B., Clare S. E., Snow K. P. et al. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice // Amer. J. Physiol. — 2006. — **290**, № 1. — P. 214–222.
9. Ihm S. H., Moon H. J., Kang J. G. et al. Effect of aging on insulin secretory function and expression of beta cell function-related genes of islets // Diabetes Res. Clin. Pract. — 2007. — **77**, № 1. — P. 150–154.
10. Kim M. S., Lee D. Y. Insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding proteins axis in diabetes mellitus // Ann. Pediatr. Endocrinol. Metab. — 2015. — **20**, № 2. — P. 69–73.
11. Le May C., Chu K., Hu M. et al. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice // Proc. Natl Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**, № 24. — P. 9232–9237.
12. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes // Diabetologia. — 2008. — **51**, № 2. — P. 216–226.
13. Mohamed-Ali V., Pinkney J. Therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in patients with diabetes mellitus // Treat. Endocrinol. — 2002. — **1**, № 6. — P. 399–410.
14. O'Brien B. A., Harmon B. V., Cameron D. P., Allan D. J. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model // J. Pathol. — 1996. — **178**, № 2. — P. 176–181.
15. Rodrigues B. Mc Neill J. H. Streptozotocin-induced diabetes: induction, mechanisms(s), and dose dependency. — Experimental models of diabetes. — Boca Raton. Fl.: CRC Press LLC, 1999. — P. 3–14.

Поступила 20.03.2017

ОСОБЛИВОСТІ ДІАБЕТОГЕННОЇ ДІЇ СТРЕПТОЗОТОЦИНУ У СТАРИХ МИШЕЙ

Т. О. Дубілей, Т. В. Тушинська, С. А. Мигован, Т. Л. Литвиненко

Державна установа "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ

Досліджували патофізіологічні прояви діабетичного стану й зміни рівня інсуліноподібного фактору росту (ІФР-1) у плазмі крові, що виникають у дорослих і старих мишей лінії C57Bl/6 через 10 тижнів після курсового введення малих доз стрептозоточину. Результати експериментів показали вікове зниження чутливості до діабетогенної дії препарату, що проявлялося у збільшенні частки резистентних особин і особин з відстроченою маніфестацією захворювання, а також у меншій вираженості патофізіологічних змін — гіперглікемії, оксидативного стресу, зменшенні маси лімфоїдних органів. Можна припустити, що ослаблення діабетогенного ефекту стрептозоточину у старих мишей могло бути зумовлене виникаючою в них активацією секреції ІФР-1.

PECULIARITIES OF DIABETOGENIC ACTION OF STREPTOZOTOCINE IN OLD MICE

T. A. Dubiley, T. V. Tushynskaia, S. A. Migovan, T. L. Lytynenko

State institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology
NAMS Ukraine", 04114 Kyiv

The pathophysiological manifestations of the diabetic state and the changes in IGF-1 level in the blood plasma that occurred in adults and old C57Bl/6 mice 10 weeks after the administration of small doses of streptozotocin were studied. The results of the experiments showed an age-related decrease in sensitivity to the diabetic action of the drug, which was manifested in an increase in the proportion of resistant individuals and individuals with delayed manifestation of the disease, as well as a less pronounced pathophysiological changes — hyperglycemia, oxidative stress, and decrease in the mass of lymphoid organs. It is assumed that the weakening of the diabetic effect of streptozotocin in old mice could be due to the activation of IGF-1 secretion.

Сведения об авторах

Лаборатория эндокринологии

Т. А. Дубилей — зав. лабораторией, к.б.н. (tdubiley@gmail.com)

Т. Л. Литвиненко — м.н.с.

С. А. Мигован — н.с.

Т. В. Тушинская — н.с.