

**Министерство здравоохранения Российской Федерации
(Минздрав России)
Федеральное медико-биологическое агентство
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации
Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

Создание биомодели сахарного диабета 1 типа

Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 40 - 2017

Москва 2017

Предисловие

1. Настоящие рекомендации разработаны в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) под редакцией д.м.н., профессора Н.Н. Каркищенко.

Директор – д.м.н., профессор В.Н. Каркищенко.

Заместитель директора по науке – д.м.н., профессор Е.Б. Шустов

2. Исполнители:

научный руководитель – доктор медицинских наук, профессор	Н.Н. Каркищенко
директор – доктор медицинских наук, профессор	В.Н. Каркищенко
заместитель директора по научной работе – доктор медицинских наук, профессор	Е.Б. Шустов
начальник научно-организационного отдела – доктор биологических наук	Г.Д. Капанадзе
заведующая лабораторией – кандидат биологических наук	О.И. Степанова
ученый секретарь – кандидат экономических наук	Е.Л. Матвеевко
научный сотрудник	Р.А. Клесов

3. Рецензенты:

М.Р. Хаитов, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, и.о.директора института иммунологии ФМБА России, 115478, Москва, Каширское ш., 24, тел 8 (499) 616-49-25, <http://www.nrcii.ru/>.

С.В. Оковитый, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова д.4/6, тел (812) 234-13-29, e-mail: pharmacology.dept@pharminnotech.com, <http://pharm-spb.ru/>.

4. В настоящем документе реализованы требования Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

5. Введение в действие – с момента утверждения.

6. Введены впервые.

Содержание

Предисловие.....	1
Введение.....	4
1. Область применения.....	7
2. Аннотация.....	8
3. Нормативные документы.....	9
4. Обозначения и сокращения.....	10
5. Требования нормативных документов.....	11
5.1. По работе с животными.....	11
5.2. По утилизации биологических отходов (биоматериалов).....	12
6. Материально-техническое обеспечение.....	12
6.1. Характеристика животных.....	12
6.2. Необходимое оборудование.....	12
6.3. Реагентика и расходные материалы.....	12
7. Методика получения животных – биомоделей СД1.....	13
7.1. Цитотоксически-аутоиммунная модель.....	13
7.2. Аутоиммунная модель.....	14
8. Методика оценки динамики патологического процесса (клинические, лабораторные, морфологические).....	15
9. Возможные осложнения при проведении моделирования и способы их устранения.....	17
10. Критерии оценки сформированности сахарного диабета.....	17
11. Результаты апробации методики моделирования сахарного диабета.....	19
11.1. Этап цитотоксически-аутоиммунного СД 1 типа.....	19
11.2. Этап аутоиммунной модели.....	22
Заключение.....	26
Библиография.....	27

Введение

Сахарный диабет – группа заболеваний, проявляющихся повышенным уровнем сахара в крови, обусловленным нарушением способности поджелудочной железы вырабатывать инсулин в количестве, необходимом для удовлетворения метаболической потребностей организма, или эффективности его действия. Он сопряжен с опасностью диабетического кетоацидоза, гипергликемической комы, а также поздних осложнений (ангиопатии, ретинопатии, нефропатии, периферической и вегетативной полинейропатии, атеросклероза коронарных и периферических артерий, частые или генерализованные гнойно-воспалительные процессы). Подразделяется на отдельные типы по принципу специфики патогенеза и потребности в инсулине. Основными являются инсулинзависимый сахарный диабет (тип 1), инсулиннезависимый сахарный диабет (тип 2) и вторичный сахарный диабет (например, сахарный диабет гестационный).

Сахарный диабет 1 типа – метаболическое заболевание, характеризующееся гипергликемией, в основе которого лежит деструкция β -клеток, приводящая к абсолютному дефициту инсулина. Разрушение β -клеток в большинстве случаев имеет аутоиммунную природу (с участием клеточного и гуморального звена иммунной системы) [9].

При манифестации СД 1 типа почти всегда обнаруживается воспалительная реакция в поджелудочной железе – инсулит. Иммуногистохимическое исследование показало [12], что в островках Лангерганса (ОЛ) поджелудочной железы крыс с аутоиммунным СД 1 типа среди клеток инфильтрата преобладают Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллеры и макрофаги. При этом инфильтрат образуется только в тех островках, в которых есть β -клетки. В островках, продуцирующих глюкагон, соматостатин, но не содержащих β -клеток, нет и инфильтрата. Такая локальность, точечность реакции указывает на то, что причиной ее являются компоненты и свойства, присущие только β -клеткам. Как показывают многие наблюдения, специфичность повреждения β -клеток может быть следствием клеточной аутоиммунной реакции.

Известно, что в условиях хронического патологического процесса во всех органах иммунной системы (костный мозг, тимус и селезенка) [2] наступают морфофункциональные изменения, которые характеризуются развитием вторичного иммунодефицитного состояния с ослаблением клеточного и гуморального иммунитета, цитокиновым дисбалансом, перераспределением иммунных клеток в организме и нарушением их информационной и миграционной активности [3]. При хроническом заболевании в тканеспецифическом повреждении органов активно участвуют Т-лимфоциты. Именно Т-лимфоцитам присуща способность активно участвовать в переносе иммунной информации о патологическом процессе [1].

Таким образом, по современным представлениям, СД 1 типа – это хроническое аутоиммунное воспаление ОЛ, при котором происходит постепенная деструкция и гибель инсулинпродуцирующих β -клеток (преимущественно путем апоптоза с развитием абсолютной инсулиновой недостаточности и стойкой гипергликемии), что сопровождается ранним возникновением и прогрессирующим течением структурных изменений в микроциркуляторном русле организма с развитием повреждения внутренних органов [6].

Обычно используемые на практически здоровых (без генетической предрасположенности) животных экспериментальные модели СД 1 типа – аллоксановая и стрептозотоциновая, являются цитотоксическими, используемые агенты избирательно повреждают β -клетки поджелудочной железы, что сопровождается фиброзирующей регенерацией поджелудочной железы без сопутствующего развития в ней аутоиммунного повреждения [7, 8, 10]. Недостатком этих моделей является высокая смертность (около 65%) среди экспериментальных животных от введения активных действующих веществ, что вызывает необходимость модификации стандартных методик [4]. В то же время, для стрептозотоциновой модели у выживших животных с сформировавшимся сахарным диабетом характерно отсроченное по времени повреждение иммунокомпетентных клеток тимуса и селезенки, что позволяет рассматривать эту модель как имеющую двойной патогенетический механизм – цитотоксический и аутоиммунный.

Для усиления аутоиммунного компонента в формировании экспериментального сахарного диабета стрептозотцин вводится на фоне применения неполного адьюванта Фрейнда.

Целью методических рекомендаций является формирование стандартизированного протокола биомоделирования аутоиммунного СД 1 типа.

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя Федерального
медико-биологического агентства



М.В. Забелин

2017 г.

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 21 Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

Создание биомодели сахарного диабета 1 типа

Методические рекомендации

ФМБА России МР.21. 40 –2017

1. Область применения

Настоящие рекомендации распространяются на порядок выполнения доклинических исследований в области исследований патогенеза и разработки методов лечения сахарного диабета 1 типа.

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биомедицинских исследований, фармакологов и эндокринологов (диабетологов) и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области разработки способов лечения сахарного диабета 1 типа.

Настоящий документ предназначен для применения в учреждениях и предприятиях ФМБА России, осуществляющих деятельность в области разработки новых лекарственных средств и медицинских технологий.

2. Аннотация

Методические рекомендации предназначены для специалистов в области биомедицинских исследований, фармакологов и эндокринологов (диабетологов) и посвящены стандартизации доклинических (биомедицинских) исследований в области разработки способов лечения сахарного диабета 1 типа.

Рекомендации содержат описание алгоритма исследований, создание модели исследования, требования к животным и работе с ними, методики динамической оценки проявлений патологического процесса в ходе исследования, перечень нормативных документов, основную научно-методическую библиографию.

3. Нормативные документы

Ветеринарно-санитарные правила сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов, (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

Европейская Конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasburg, 1986).

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 51849-2001 «Продукция комбикормовая. Информация для потребителя. Общие требования» (Приказ Госстандарта РФ от 25.12.2001 № 582-ст).

Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2.12.2009 № 544-ст).

Правила надлежащей лабораторной практики таможенного союза. Решение Комиссии Таможенного союза от 02.03.1999 № 564.

Правила проведения работ с использованием лабораторных животных (приложение к Приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755).

Приказ Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Приказ МЗ СССР 06.07.73 г. № 1045-73 об утверждении санитарных правил по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, Часть 2. М.: Гриф и К, 2012.- 944 с.

СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию, и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Утверждены постановлением Главного Государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. № 51.

4. Обозначения и сокращения

ОК – островковые клетки

ОЛ – островки Лангерганса

ПЖ – поджелудочная железа

СД 1 – сахарный диабет 1 типа

HbA1c – гликозилированный (гликированный) гемоглобин

STZ – стрептозотоцин

5. Требования нормативных документов

5.1. По работе с животными

Эксперименты выполняются на лабораторных крысах и мышах. Животные должны поступать из сертифицированных питомников, и сопровождаться ветеринарным сертификатом.

Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляет 14 дней. В течение карантина проводят ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдают в клетках (заболеваемость и смертность). Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределяют на группы с помощью метода рандомизации. Животные, не соответствующие критериям, исключают из исследования в течение карантина. Критерии включения/исключения животных определяются дизайном эксперимента.

Животных содержат в соответствии с требованиями ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» и Правилами надлежащей лабораторной практики Таможенного Союза.

Животных содержат в вентилируемых клетках типа RairIsoSystem, группами, мыши – по 5 голов в клетке, крысы – по 3 головы в клетке. В качестве подстила используют стерильные древесные опилки из нехвойных пород деревьев. В качестве корма – стандартный комбикорм, гранулированный полнорационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001. Кормление животных осуществляется по нормативам в соответствии с видом животных. Водопроводная очищенная вода всем животным дается *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержатся в контролируемых условиях окружающей среды: температура воздуха 22-24°C и относительная влажность: 60-70%. Освещение в помещениях – естественно-искусственное. В комнатах содержания животных поддерживается 12 часовой цикл освещения (СП 2.2.1.3218-14).

В течение исследования каждое животное осматривается ежедневно. Осмотр включает в себя оценку общего поведения и общего состояния животных.

Все работы с животными осуществляются в соответствии с утвержденным Протоколом, одобренным биоэтической комиссией учреждения. Протокол исследования должен учитывать требования Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей, и Правил проведения работ с использованием лабораторных животных (1977).

5.2. По утилизации биологических отходов (биоматериалов)

Утилизация биологических отходов (биоматериалов) осуществляется в соответствии с требованиями Ветеринарно-санитарных правил сбора, утилизации и уничтожения биологических отходов (в ред. Приказа Минсельхоза России от 16.08.2007 № 400).

6. Материально-техническое обеспечение

6.1. Характеристика животных

В исследовании используются крысы породы Wistar (самцы массой 230-270 г) в возрасте 2-3 месяца.

6.2. Необходимое оборудование

Глюкометр (типа Ассу-СНЕК).

Глюкометр для измерения HbA1c (типа Nycocard READER II).

Весы электронные для животных.

Мерный стаканчик на 300 мл.

Стеклянный гомогенизатор на 15 мл.

Центрифуга лабораторная на 500 и более об/мин.

Микроскоп лабораторный.

6.3. Реагентика и расходные материалы

Стрептозоцин.

Неполный адьювант Фрейнда.

Вода для инъекций.

Физиологический раствор.

Раствор Ficoll-Paque (1,077 г/см³).

Шприцы: одноразовые на 1, 2, 5 мл.

Пипетки автоматические.

Пробирки на 5, 10, 15 и 25 мл.

7. Методика получения животных – биомоделей СД1

Моделирование аутоиммунного СД 1 типа осуществляется в два этапа. На первом этапе у здоровых крыс формируется цитотоксически-аутоиммунный СД 1 типа путем введения стрептозотоцина на фоне применения неполного адьюванта Фрейнда. На втором этапе у животных с сформированным цитотоксически-аутоиммунным СД 1 типа осуществляют забор клеток селезенки, которые затем трансплантируют здоровым животным, не подвергшимся токсическому действию стрептозотоцина. В результате индукции спленоцитами аутоиммунного процесса, формируется собственно аутоиммунный СД 1 типа, в патогенезе которого отсутствует цитотоксический компонент.

Для контроля динамики развития СД 1 типа используются группы здоровых крыс той же линии и возраста.

Для подтверждения сформированности сахарного диабета у лабораторных животных применяется комплекс клинических и биохимических исследований. Проводятся динамические измерения уровня гликемии, уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), массы тела, суточного количества выпитой воды.

7.1. Цитотоксически-аутоиммунная модель

Двукратно поочередно в течение 2 недель с интервалом 24 часа вводят в первый день неполный адьювант Фрейнда (А.), во второй день навеску стрептозотоцина (Stz.), растворённого в 1 мл воды для инъекций в возрастающих дозах (15, 20 и 25 мг/кг массы животного) [4]. Дозировки и объёмы введения представлены в таблице 1. Введение осуществляют внутрибрюшинно. Стрептозотоцин вводится после 24-часового голодания животных.

Таблица 1 – Схема введения препаратов крысам при моделировании СД1

	1 введение		2 введение		3 введение	
внутрибрюшинно с интервалом в 7 дней						
	1 день	2 день	1 день	2 день	1 день	2 день
Экспериментальная группа	1 мл А.	15 мг/кг Stz.	1 мл А.	20 мг/кг Stz.	1 мл А.	25 мг/кг Stz.

Верификация СД1 должна быть подтверждена на клинических, биохимических и (на отдельных животных) гистологических методами (разделы 4 и 6).

Стрептозотонин – противоопухолевое средство алкилирующего действия из группы производных нитрозомочевины, вещество, токсичное для β -клеток поджелудочной железы. По структуре достаточно напоминает молекулы сахара, чтобы захватываться и транспортироваться внутрь клеток. Ингибирует митоз, преимущественно G2-фазу. Механизм противоопухолевого действия полностью не изучен, но, вероятно, обусловлен образованием метилкарбониевых ионов, которые вызывают алкилирование или связываются с различными внутриклеточными структурами, включая нуклеиновые кислоты. Образует поперечные сшивки между нитями ДНК, что и приводит к ингибированию её синтеза; на синтез РНК и белка влияет в незначительной степени. Оказывает выраженный гипергликемический эффект, вызывая необратимое повреждение β -клеток поджелудочной железы [11].

Неполный адъювант Фрейнда представляет собой водно-жировую эмульсию, содержащую вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Депонирует антиген и усиливает его захват фагоцитами. Используется для неспецифической активации иммунной системы.

7.2. Аутоиммунная модель

Для проведения аллотрансплантации спленоцитов под эфирным наркозом у крыс с сформированной моделью СД 1 типа (интегральная оценка не менее 50 баллов в соответствии с критериями раздела 6) проводят лапаротомию и

спленэктомии. Селезенку переносят в стерильный стеклянный гомогенизатор с физиологическим раствором в объеме 15 мл. Тщательно гомогенизируют селезенку до практически полного ее разрушения, затем этот раствор наслаивают на раствор Ficoll-Paque (1,077 г/см³). Пробирку центрифугируют в течение 40 мин при 500 об/мин. После центрифугирования супернатант удаляют, клетки (спленоциты) из интерфазы собирают и ресуспендируют в физиологическом растворе для отмывки от раствора Ficoll-Paque. Производят подсчет выделенных клеток. Выделенные спленоциты вводят внутрибрюшинно в количестве 450-550 тыс. клеток в 0,5 мл физиологического раствора [5].

Для выявления клинических, биохимических и гистологических признаков СД 1 типа у экспериментальных животных проводят исследования в динамике (разделы 4 и 6).

Из ткани селезенки одного животного с сформированной цитотоксически-аутоиммунным СД1 можно выполнить трансплантацию спленоцитов в количестве, достаточном для формирования аутоиммунного СД 1 типа, двум лабораторным животным.

8. Методика оценки динамики патологического процесса (клинические, лабораторные, морфологические)

Все биохимические исследования проводят в 45 мкл цельной крови, полученной пункцией из хвостовой вены у крыс после 16-18 часов голодания.

Гликозилированный гемоглобин (HbA1c) в крови (5 мкл) определяют на приборе типа Nycocard REDER II (Норвегия), который предназначен для быстрого определения *in vitro* HbA1c. Данный тест основан на методе боратного аффинного анализа. Диапазон измерения от 3 до 18%.

Содержание глюкозы в крови измеряют на приборе типа Ассу-СНЕК (Швейцария). Принцип работы прибора основан на фотометрическом определении уровня глюкозы в свежей капиллярной (венозной) крови. Каплю крови (2-5 мкл) наносят на тест-полоску. Диапазон измерения составляет от 0,6 ммоль/л до 33,3 ммоль/л.

Стандартизацию и контроль качества лабораторных исследований проводят в соответствии с требованиями Федеральной системы внешней оценки качества клинических лабораторных исследований.

Массу тела животных измеряют на электронных весах с погрешностью измерения 10 мг. Количество выпитой воды измеряют с помощью мерного стаканчика на 300 мл.

Изучение структурных нарушений в паренхиме внутренних органов проводят морфологическими методами. Для этого после выведения из исследования и 12-часового голодания животных декапитируют под эфирным наркозом, извлекают поджелудочную железу, которую затем фиксируют в растворе Буэна. Состояние ОЛ поджелудочной железы и их функциональную активность оценивают на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Тимус, селезенку и почки каждого животного фиксируют в 10% формалине, затем готовят парафиновые срезы и окрашивают гематоксилином и эозином для последующего выявления и оценки степени тяжести структурных нарушений в органах.

Материал для исследования поджелудочной железы забирается из средней части тела железы. Морфологические исследования проводят с учетом всех обнаруженных ОЛ в поле зрения (от 0 до 30). Проводят подсчет средней площади ОЛ, среднего количества клеток в островках ОЛ. В селезенке осуществляют измерение средней площади лимфоидных фолликулов. В тимусе рассчитывают процентное соотношение объемной плотности коркового и мозгового слоев. Эти расчеты проводят под микроскопом при увеличении $\times 200$ в микрометрах (мкм^2) на персональном компьютере с использованием специальной программы типа τ -Морфология (автоматизированные комплексные решения «Телемедсистемы», Россия, 2004 г.).

9. Возможные осложнения при проведении моделирования и способы их устранения

Осложнения	Способы устранения
Неправильное введение препаратов для моделирования	Отработка внутрибрюшинного введения
Инфицирование места введения препаратов	Соблюдение правил асептики и антисептики
Отсутствие формирования признаков СД 1 типа	Дополнительные инъекции STZ в дозировке 25 мг/кг и неполного адъюванта Фрейнда 1 мл

10. Критерии оценки сформированности сахарного диабета

Для оценки выраженности признаков сахарного диабета оцениваются значения показателей глюкозы и гликированного (гликозилированного) гемоглобина, динамика массы тела животных, выраженность полиурии, полидипсии, полифагии, снижения двигательной активности, наличие признаков трофических поражений. Выраженность признаков сахарного диабета переводится в 10-бальную шкалу в соответствии с таблицей 2, набранные баллы суммируются.

Сахарный диабет считается сформированным, если сумма набранных баллов превышает 50.

При применении сахароснижающих (антидиабетических) препаратов или медицинских технологий значимым считается снижение выраженности сахарного диабета на 20 и более баллов.

Таблица 2 – Шкала оценки выраженности признаков сахарного диабета (баллы)

Признак	Баллы										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Глюкоза в венозной крови, ммоль/л	менее 6.0	6.0 – 6.9	7.0 – 7.9	8.0 – 8.9	9.0 – 9.9	10.0 – 11.9	12.0 – 13.9	14.0 – 17.9	18.0 – 21.9	22.0 – 26.9	27.0 и более
HbA1c, %	менее 5.0	5.0 – 5.9	6.0 – 6.9	7.0 – 7.9	8.0 – 8.4	8.5 – 8.9	9.0 – 9.4	9.5 – 9.9	10.0 – 12.9	13.0 – 15.9	16.0 и более
Потеря массы тела, % от нормы	менее 5,0	5,0 – 9,9	10,0 – 14,9	15,0 – 19,9	20,0 – 22,9	23,0 – 25,9	26,0 – 29,9	30,0 – 34,9	35,0 – 39,9	40,0 – 44,9	45,0 и более
Полиурия	отсутствует		слабо выражена		умеренно выражена			выражена			резко выражена
Полидипсия	отсутствует		слабо выражена		умеренно выражена			выражена			резко выражена
Полифагия	отсутствует		слабо выражена		умеренно выражена			выражена			резко выражена
Снижение двигательной активности	отсутствует		слабо выражена		умеренно выражена			выражена			резко выражена
Раны и трофические язвы	отсутствуют		одиночные, способные к заживлению		одиночные, не заживающие			множественные			гангрена хвоста, лап, других участков тела

11. Результаты апробации методики моделирования сахарного диабета

11.1. Этап цитотоксически-аутоиммунного СД 1 типа

Уже на вторую неделю после введения препаратов (стрептозотоцина и неполного адьюванта Фрейнда) у животных экспериментальной группы отмечается повышение уровня глюкозы в крови до $10,9 \pm 0,84$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c остается в пределах нормы $3,9 \pm 0,22\%$. Далее на третью неделю после введения препаратов отмечается достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $18,4 \pm 0,68$ ммоль/л. Уровень HbA1c повышается до $9,2 \pm 0,28\%$ начиная с 4 недели. На девятую неделю эксперимента средние значения уровня глюкозы у животных экспериментальной группы составляют $31,6 \pm 0,45$ ммоль/л, а значения HbA1c составляют $9,7 \pm 0,36\%$.

В течение эксперимента проводят наблюдения за изменениями массы тела у животных из контрольной и экспериментальной групп. Уже к концу второй недели возникает отчетливое расхождение в динамике массы тела животных, при этом в опытной группе оно снижается на 10%, к концу третьей недели превышает 20%, а к концу седьмой недели снижение массы достигает 40% от средней массы контрольных животных.

Суточный мониторинг объемов выпитой воды, также показывает различия между контрольной и экспериментальной группами. Так на вторую неделю после моделирования у животных из экспериментальной группы отмечается увеличение суточного объема выпитой воды до $120 \pm 4,44$ мл, в то время как у контрольной группы этот показатель составляет $40 \pm 6,66$ мл. Такое явление длится на протяжении всего эксперимента, на девятую неделю после введения средний суточный объем выпитой воды у животных из экспериментальной группы достигает до $365 \pm 25,5$ мл, по сравнению с контрольной группой $40 \pm 3,33$ мл.

Признаки полиурии начинают проявляться к концу первой недели, достигая степени резкой выраженности к концу пятой недели моделирования

сахарного диабета. Эти два признака (полиурия и полидипсия), наряду с уровнем гликемии, относятся к категории самых ранних и наиболее динамичных клинически значимых признаков сахарного диабета. Полифагия отмечается начиная с четвёртой недели, и не бывает резко выраженной. Близкая динамика характерна и для такого признака, как снижение двигательной активности. Оно начинается на 2-3 неделе, и выраженным становится, начиная с 8 недели экспериментального сахарного диабета.

Важно отметить, что у 20% животных, которым моделировали сахарный диабет, начиная с восьмой недели, отчетливо отмечаются признаки трофических поражений хвоста (в зонах взятия крови из хвостовой вены), доходя на девятой неделе до уровня очаговой гангрены тканей. Причём первые признаки гангренозных процессов проявляются на 52 сутки эксперимента, что соответствует 6 годам течения СД 1 типа у человека, и имеют динамику воспалительного процесса, переходящего в некроз. Подобные изменения наблюдаются только у животных в экспериментальной группе, и в контрольной группе отсутствуют. Появление гангренозных поражений хвостов лабораторных крыс позволяет говорить о создании аналога синдрома диабетической стопы у человека на экспериментальной биологической модели при создании метаболического синдрома СД 1 типа.

На рисунке 1 представлена динамика суммарной оценки выраженности признаков сахарного диабета при моделировании СД 1 типа введением стрептозотоцина на фоне применения адьюванта Фрейнда.

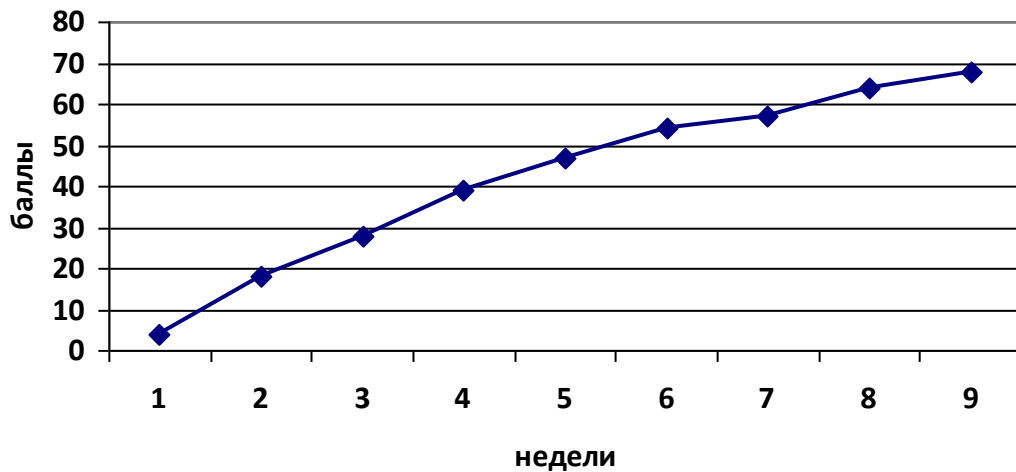


Рисунок 1 – Динамика интегральной оценки выраженности симптомов сахарного диабета при его моделировании введением стрептозотоцина на фоне применения адьюванта Фрейнда.

Стабильно высокий уровень глюкозы в крови свидетельствует о развитии структурных нарушений в эндокринной части ПЖ. Для их выявления через 3 месяца после моделирования аутоиммунного СД 1 типа проведено морфологическое и морфометрическое изучение ОЛ ПЖ в сравнении с результатами изучения их у здоровых животных.

Животные с аутоиммунным сахарным диабетом 1 типа через 3 месяца после начала моделирования обнаруживают следующие изменения. Разбросанные среди ацинарной части островки Лангерганса – преимущественно небольшого размера, без четких границ, что связано с явлениями выраженного отека межклеточного вещества и гидропической дистрофией их β -клеток. β -клетки в ОЛ располагаются по периферии (в норме в центре), окружая обширные зоны некроза, в некоторых островках отмечаются признаки тотального некроза клеток, окруженного клетками воспалительного инфильтрата. Количество клеток в относительно сохранных островках резко снижено, а сами β -клетки таких островков с явлениями коагуляционного некроза, ядра клеток в состоянии кариорексиса и кариопикноза, цитоплазма вакуолизирована. Также отмечается выраженная воспалительная инфильтрация островков, с замещением воспалительными

элементами большей их части. Клетки инфильтрата представлены преимущественно зрелыми Т-лимфоцитами, с небольшим количеством макрофагов и плазматических клеток.

Распространенность и степень выраженности дистрофии клеток в ацинарной части ПЖ также носит выраженный характер. В участках, соприкасающихся с воспалительным инфильтратом, отмечают отек, выраженную вакуолизацию и зернистость части клеток. Межацинарные и внутридольковые протоки резко расширены, заполнены эозинофильным секретом разной интенсивности окрашивания. Сосуды всех калибров резко расширены, полнокровны, с участками выраженного отека перивезикальной соединительной ткани. Отмечаются явления набухания эндотелия сосудов, местами сладж-синдром.

При морфометрическом исследовании поджелудочной железы отмечают, что после окончания моделирования аутоиммунного СД 1 типа происходит достоверное уменьшение размеров (площади) ОЛ, контуры ОЛ становятся размытыми, снижается и количество в них клеток. Так, площадь ОЛ составляет 12054 ± 697 мкм² (норма – 62790 ± 461 мкм²), а количество клеток в ОЛ снижается до 92 ± 32 (норма – 243 ± 51).

Гибель ОЛ происходит на фоне глубокой иммунной дисрегуляции в организме. Так в селезенке крыс с аутоиммунной моделью СД 1 типа отмечаются явления прогрессирующей гипоплазии. Лимфоидные фолликулы селезенки с явлениями гипоплазии и атрофии, в большинстве наблюдений рисунок строения их стерт, фолликулы не имеют центров размножения. Площадь лимфоидных фолликулов в селезенке достоверно снижается более чем в два с половиной раза и равняется 31825 ± 943 мкм² при норме – 79651 ± 486 мкм².

11.2. Этап аутоиммунной модели

Уже на третью-четвертую недели после введения спленоцитов у животных экспериментальной группы отмечается развитие клинических признаков СД 1 типа (полиурия, полифагия, снижение веса). На четвертую

неделю эксперимента замечают достоверное снижение массы тела животных экспериментальной группы ($219 \pm 7,2$ г) по сравнению с животными контрольной группы ($276 \pm 9,6$ г).

Через 3 недели после аллотрансплантации спленоцитов клинические и морфологические показатели животных экспериментальной группы имеют достоверные отличия от таковых, полученных в контрольной группе (повышение уровня глюкозы в крови до $13,5 \pm 0,76$ ммоль/л, в то время как уровень HbA1c остается в пределах нормы – $4,1 \pm 0,34\%$). К пятому месяцу исследования отмечается достоверное и значительное повышение уровня глюкозы в крови до $26,3 \pm 0,88$ ммоль/л и повышение уровня HbA1c до $9,4 \pm 0,25\%$.

Масса животных экспериментальной группы уменьшается на протяжении всего эксперимента: так, к пятому месяцу она составляет $174 \pm 12,5$ г, в то время как у животных контрольной группы – $364 \pm 18,4$ г (рисунок 4).

При гистологическом исследовании органов, участвующих в патогенезе СД 1 типа, получают следующие результаты.

Дольковое строение поджелудочной железы экспериментальных животных сохранено. Экзокринная часть представлена панкреатическими ацинусами, вставочными внутри- и междольковыми протоками, между ацинусами отмечаются сосуды умеренного кровенаполнения (кровеносные капилляры, междольковые артериолы и артерии), единичные нервные стволы. Инсулиновые островки не просматриваются. Протоки поджелудочной железы выстланы однорядным кубическим эпителием с базально-расположенными небольшими ядрами без видимых ядрышек. В некоторых полях зрения умеренное разрастание соединительной ткани в строме с ее разволокнением, перекалибровкой долек.

Гепатоциты всех отделов долек печени в состоянии выраженной, преимущественно мелкокапельной, жировой дистрофии, с признаками пылевидного ожирения. Отмечаются признаки гибели части гепатоцитов,

преимущественно центральных отделов долек, с кариопикнозом и фрагментацией ядер, появлением гиперплазированных двуядерных клеток.

В почках выраженное полнокровие капиллярных петель клубочков, коллапс капиллярных петель клубочков, некроз эпителия дистальных и проксимальных канальцев экспериментальных животных. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев некротизирован, слущен в просвет (плазморексис, плазмолизис, кариорексис, кариолизис), отмечаются участки фокального и тотального тубулорексиса. Выраженный отек стромы мозгового вещества, полнокровие сосудов с мелкими и крупными перитубарными кровоизлияниями.

Выявляется нарушение гистологической структуры селезёнки за счёт обширных участков некрозов без полиморфноклеточной инфильтрации, обширных участков апоптоза. По периферии селезёночной артерии отмечаются остаточные скопления малых лимфоцитов, полнокровие сосудов красной пульпы, гиалиноз трабекул.

Полученные биохимические и морфологические показатели животных экспериментальной группы соответствуют типичной картине СД 1 типа.

Динамика выраженности и полноты формирования СД 1 типа по критериям раздела 10 представлена на рисунке 2.

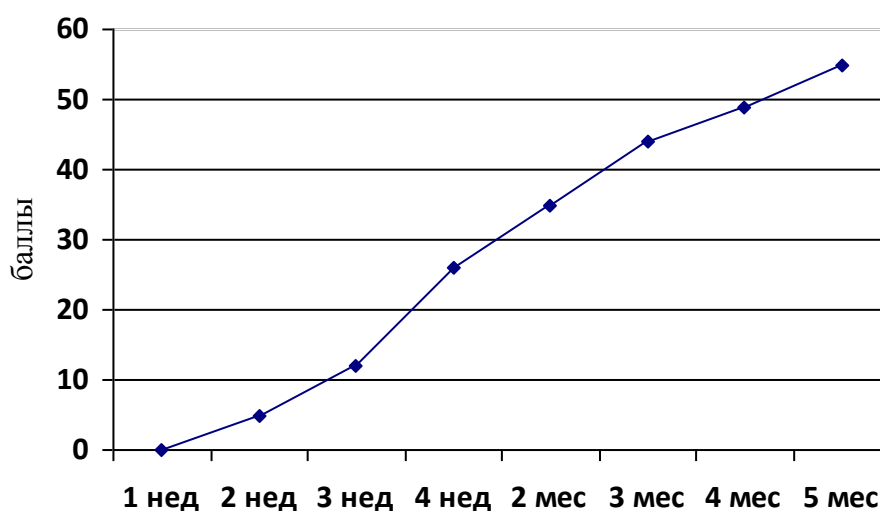


Рисунок 2 – Динамика выраженности сахарного диабета после трансплантации спленоцитов от животных с сформированным цитотоксически-аутоиммунным СД 1 типа.

Анализ рисунка 2 показывает, что на формирование аутоиммунного СД 1 типа в рамках модели с трансплантацией спленоцитов от животных с сформированным цитотоксически-аутоиммунным сахарным диабетом 1 типа требуется 4-5 месяцев.

Заключение

Представленные материалы позволяют стандартизировать протокол формирования экспериментального СД 1 типа у крыс по двум методикам: формирование цитотоксически-аутоиммунного СД 1 типа при введении стрептозотоцина на фоне применения неполного альяванта Фрейнда и последующее формирование собственно аутоиммунной модели СД 1 типа за счет трансплантации здоровым животным спленоцитов от крыс с сформированным цитотоксически-аутоиммунным СД 1 типа.

Первая модель формируется в более короткие сроки, чем вторая. Несомненным достоинством аутоиммунной модели является отсутствие цитотоксического действия стрептозотоцина на экспериментальных животных, что особенно важно при применении указанной модели в интересах оценки новых медицинских технологий и лекарственных средств, предназначенных для лечения СД 1 типа.

Клинические и биохимические исследования, проводившиеся на крысах, перенесших аллотрансплантацию спленоцитов от животных с сформированным аутоиммунным СД 1 типа, выявили стойкие изменения исследуемых показателей, свидетельствующие о развитии СД 1 типа, проявлявшиеся в стабильной гипергликемии, полидипсии и полиурии, снижении массы животных, формировании отчетливой морфологической картины повреждения островковых клеток поджелудочной железы.

Библиография

1. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. – М.: Изд. РАМН, 2009, 107 с.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2006, № 3, с. 123-127.
3. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О., Князькин И.В. Нейроиммуноэндокринология тимуса. – СПб, 2005. 157 с.
4. Клёсов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Ревякин А.О. Оптимизация биомодели сахарного диабета 1 типа // Биомедицина, 2014, № 4, с. 25-30.
5. Клесов Р.А., Каркищенко В.Н., Степанова О.И., Шустов Е.Б. Влияние аллотрансплантации лимфоцитов селезенки на развитие сахарного диабета 1 типа // Биомедицина, 2015, №4, с. 16-22.
6. Юшков П.В., Опаленов К.В. Морфогенез микроангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет, 2001, №1, с. 53-56.
7. Carvalho V. F. Mast cell changes in experimental diabetes: focus on attenuation of allergic events / V. F. Carvalho, E. O. Barreto, R. S. Cordeiro, V. Lagente- M. A: Martins, P. M. Silva // Memorias do Instituto Oswaldo.
8. Etuk E.U. Animals models for studying diabetes mellitus // Agriculture and biology journal of North America / ISSN Print: 2151-7517, ISSN Online: 2151-7525 © 2010, Science Hub, <http://www.scihub.org/ABJNA>.
9. Genuth S. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus // Diabetes Care, 2003, No. 26, p. 3160-3167.
10. Nir T., Melton D.A., Dor Y. Recovery from diabetes in mice by β cell regeneration // The Journal of Clinical Investigation, 2007; 117(9): 2553-2561.
11. Vavra J.J., Deboer C., Dietz A., Hanka L.J., Sokolski W.T. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic // Antibiot. Annu., 1959, № 7, p. 230-235.
12. Yoon J.W., Jun H.S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells // Am. J. of Therapeutics, 2005, No. 12(6), p. 580-591.