

УДК 616.379-008.64, 57.084.1, 612.349.1, 612.349.7

Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на лабораторных грызунах

И. Г. Гвазава^{1,2*}, О. С. Роговая^{1,2}, М. А. Борисов^{1,2}, Е. А. Воротеяк^{1,2,3}, А. В. Васильев^{1,3}¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: gvazava.inessa@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2017

Принята к печати 26.10.2017

РЕФЕРАТ Сахарный диабет и его осложнения представляют собой самую распространенную эндокринную патологию в большинстве стран мира. Изучение патогенетических механизмов возникновения и прогрессии этого заболевания, а также поиск новых терапевтических средств и способов терапии остаются актуальными на сегодняшний день. Важнейшее значение для изучения сахарного диабета имеют экспериментальные модели. В обзоре обобщены данные о наиболее часто используемых животных моделях. Проанализированы и обсуждены механизмы стрептозотоцинового диабета как наиболее адекватной и легко воспроизводимой экспериментальной модели диабета. Рассмотрены значимые преимущества и недостатки описанных моделей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бета-клетки, гипергликемия, патогенез, сахарный диабет, стрептозотцин, экспериментальные лабораторные животные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СД1 – сахарный диабет 1 типа, СТЗ – стрептозотцин.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время среди так называемых «болезней цивилизации» одно из лидирующих мест по темпам роста заболеваемости, инвалидизации и смертности продолжает занимать сахарный диабет (СД). По последним данным, в 2013 году в мире насчитывалось 382 млн больных диабетом, а по прогнозам количество таких больных к 2035 году может увеличиться до 592 млн, т.е. на 55% [1]. СД – хроническое заболевание, которое характеризуется относительным или абсолютным отсутствием инсулина, что приводит к гипергликемии. Хроническая гипергликемия способствует развитию различных осложнений, таких, как нейропатия, нефропатия и ретинопатия, повышается также риск сердечно-сосудистых заболеваний. В соответствии с современной классификацией выделяют два основных типа СД, которые имеют многочисленные клинические, иммунологические и генетические различия. Предрасположенность к СД опосредуется несколькими группами генов. Следует подчеркнуть, что для развития заболевания необходимо наличие определенных аллелей генов системы главного комплекса гистосовместимости

(МНС) класса II. Помимо генетических факторов в генезе сахарного диабета участвуют факторы внешней среды, поэтому эту патологию относят к многофакторным заболеваниям [2].

Известно, что СД1 – это аутоиммунное заболевание, при котором происходит разрушение продуцирующих инсулин β -клеток поджелудочной железы. СД1 чаще всего диагностируется у детей и молодых людей, и к моменту постановки диагноза у пациентов существенно снижена выработка эндогенного инсулина, поэтому, чтобы уменьшить риск развития гипергликемии, необходимы регулярные инъекции инсулина и постоянный контроль содержания глюкозы в крови. Наиболее популярной теорией патогенеза СД1 является теория, предложенная G.S. Eisenbarth [3]. Согласно этой теории, СД1 развивается у генетически предрасположенных лиц. Аутоиммунные процессы при СД1 инициируются факторами внешней среды. Начальная стадия СД1 – гибель островковых клеток – протекает бессимптомно, но может быть выявлена с помощью определения аутоантител. Клинические признаки появляются только на последних стадиях процесса, когда подавляющее боль-

шинство β -клеток погибает и возникает абсолютная недостаточность инсулина [3, 4]. Изначально генетика СД1 представлялась относительно простой. Считалось, что при наличии определенных аллелей генов системы HLA доминирование заболевания было практически полным [5].

На сегодняшний день известно более 20 локусов и 100 генов-кандидатов, имеющих различную степень влияния на развитие СД1 [6]. Однако широкая распространенность этого заболевания и отсутствие значимых корреляций с генетическими отклонениями позволяют предполагать, что СД1 могут заболеть также люди, генетически не предрасположенные к данному заболеванию. Так, показано, что в 85–90% случаев СД1 встречается в семьях без первичной истории СД1 среди родственников первой линии. V. Nuytinen и соавт. считают, что генетическая предрасположенность составляет около 30% [7].

Современная теория патогенеза СД1, предложенная M.A. Atkinson и G.S. Eisenbarth, предполагает, что развитию этого заболевания способствует или препятствует взаимодействие между генами, а не генетическая предрасположенность [8]. Кроме того, считается, что эти гены влияют на восприимчивость и сопротивляемость к СД1 не только в период, предшествующий индукции аутоиммунной реакции, но и в течение всего периода, предшествующего заболеванию.

Считается, что симптомы СД1 обычно проявляются, когда погибло 90–95% β -клеток [4]. Однако по этому поводу существует много расхождений. Не до конца понятен также феномен потери β -клеток. Предполагается, что выраженность этого феномена будет существенно меняться в зависимости от типа инсулита, степени гибели β -клеток и их способности к регенерации [9].

В настоящее время не до конца ясен механизм аутоиммунной реакции, предвещающей распад β -клеток, особенно реакции β -клетки на аутоиммунные антитела.

Согласно современным представлениям о патогенезе СД1, гибель β -клеток может происходить в результате разных патологических процессов. Один из них – деструкция или некроз β -клеток, другой – апоптоз, или генетически запрограммированная гибель клеток [10]. В присутствии избыточного количества свободных радикалов (кислородные радикалы или оксид азота) или под действием провоспалительных цитокинов β -клетки подвергаются некрозу [3, 11].

В последние годы показали, что процессы некроза и апоптоза не противостоят друг другу. Важную роль в процессе клеточной гибели играют цитокины. Такие цитокины, как IFN и IL-2, рассматриваются в качестве триггеров инсулита, способных активировать

механизм сигнализации, ведущей к гибели β -клеток поджелудочной железы [11].

Как все эндокринные расстройства, СД представляет собой довольно сложное заболевание, в которое вовлечены разные системы организма. Несмотря на огромный прогресс молекулярно-генетических исследований, вопросы профилактики и патогенетического лечения диабета до сих пор не разработаны на должном уровне. Основным инструментом патофизиологии на сегодняшний день остаются исследования, проведенные на экспериментальных моделях; при этом от выбора модели, ее этиологического и патогенетического соответствия заболеванию человека зависит успех не только теоретических исследований, но и разработка методов профилактики и терапии. Экспериментальные модели СД позволяют получить ценные сведения для понимания механизма антидиабетического действия различных агентов с целью направленного их применения. К настоящему времени разработано множество моделей экспериментального СД [12–16]. Чтобы избежать ошибочных результатов, важно объективно оценить достоинства и недостатки каждой модели в соответствии с поставленной целью.

Более 50 лет единственной моделью экспериментального сахарного диабета был диабет, вызываемый удалением поджелудочной железы. Для развития в послеоперационный период диабетических нарушений большое значение имеет количество сохраненной ткани поджелудочной железы. В зависимости от этого диабет развивается в период от нескольких часов (при полном удалении) до 9 месяцев (удалено 80% органа). Для получения хронического диабета с длительно существующим высоким уровнем глюкозы в крови часто прибегают к субтотальной панкреатэктомии. Основной причиной развития диабета в данном случае является дефицит инсулина, т.е. абсолютная инсулиновая недостаточность. Использование этой модели на первом этапе развития экспериментальной диабетологии позволило понять многое в механизмах действия инсулина, изменении обмена веществ при его дефиците, патогенезе нарушений, развивающихся при СД. Однако целый ряд причин, осложняющих применение оперативного удаления поджелудочной железы, стимулировал поиск новых моделей. С появлением неоперативных моделей СД применение этого метода резко снизилось. В последнее время его использовали в некоторых случаях с целью изучения механизма влияния ряда природных соединений на резистентность к инсулину и его секрецию у различных животных: крыс, морских свинок, собак. Изучен эффект усвоения глюкозы различными тканями при удалении 90% железы и значительная гипоинсулинемия при субтоталь-

ной резекции органа с последующей дополнительной резекцией [17, 18].

В данном обзоре существующие экспериментальные модели проанализированы с целью выявления наиболее адекватной и доступной животной модели СД1.

Основной характеристикой сахарного диабета 1 типа является аутоиммунное разрушение панкреатических β -клеток, что приводит к недостаточной продукции инсулина. В животных моделях недостаточная продукция инсулина обусловлена действием множества различных механизмов, начиная от химической абляции β -клеток до спонтанного развития аутоиммунного СД.

В зависимости от поставленной задачи используют генетические и негенетические экспериментальные модели. За последнее время благодаря прогрессу в области геномной инженерии получено большое количество животных с генетически детерминированным развитием сахарного диабета.

СПОНТАННЫЕ АУТОИММУННЫЕ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

В 1974 году в Японии получили линию мышей *NOD* – это так называемые *Non Obese Diabetic mice* – мыши с диабетом без ожирения. Эти мыши, наряду с другими грызунами, такими, как мыши *AKITA*, биобридинговые (*BB*) крысы, крысы *LEW.1AR1* и др., характеризуются способностью к спонтанному развитию аутоиммунного диабета [16, 19, 20]. В основе спонтанного развития сахарного диабета, по всей видимости, лежит генетическая мутация, влияющая на селекцию Т-лимфоцитов и приводящая к нарушению механизмов контроля аутоагрессивности. Последние 25 лет в качестве модели спонтанного аутоиммунного сахарного диабета 1 типа наиболее широко используются мыши линии *NOD*, иммунологические характеристики которых сходны с характеристиками при инсулинзависимом СД1 у человека [21–26]. Через 3–4 недели после рождения у этих мышей развивается инсулит. На этой преддиабетической стадии панкреатические островки инфильтрированы преимущественно CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитами [27]. Инсулит вызывает разрушение β -клеток, но еще на 10–14 неделе поджелудочная железа этих животных вырабатывает до 90% инсулина, и диабет у них может развиваться до 30-недельного возраста. У мышей *NOD* диабет чаще встречается у самок (60–90%), в то время как в большинстве колоний заболевают 10–30% самцов [28]. Для мышей линии *NOD* характерно проявление типичных клинических симптомов СД (гипергликемия, глюкозурия, полидипсия и полиурия), но у них не развивается кетоацидоз и, если не вводить эндогенный инсулин, то через 2–4 недели

после заболевания животные погибают в результате обезвоживания, а не от кетоацидоза [23, 29]. У мышей *NOD* многие гены связаны с предрасположенностью к СД1, и важную роль в этом процессе, как и у людей, играют аллели МНС. Однако МНС класса II, придающие устойчивость или восприимчивость к заболеванию, у мышей линии *NOD* отличаются по структуре от МНС класса II человека [27, 30, 31].

Мыши линии *NOD* являются полезной моделью для изучения генетики и механизма СД1. Эти мыши потенциально пригодны для тестирования лекарственных средств, действие которых направлено на модуляцию аутоиммунной реакции [23]. К преимуществам мышей *NOD* относится возможность блокады цитокинов специфическими антисыворотками и изучение изменений в развитии и течении заболевания [11, 32, 33]. Именно таким методом получены многие данные о роли отдельных цитокинов (интерлейкинов, фактора некроза опухолей, интерферона- γ) в патогенезе аутоиммунного инсулита при диабете [34]. Следует, однако, отметить, что, несмотря на высокую чувствительность мышей линии *NOD* к стрептозотоцину (СТЗ), гибель β -клеток у них происходит в отсутствие активации поли(ADP-рибоза)полимеразы (ПАРП) [35]. Этот факт может существенно влиять на корректность исследований чувствительности β -клеток этих животных к диабетогенным факторам [25, 26].

Первоначальный оптимизм, касающийся идентификации метода предупреждения заболеваемости СД1 с использованием животных моделей, привел как к открытиям, так и к разочарованиям в отношении применения аналогичных методов у человека. Опубликовано более 192 методов, которые могут быть использованы для предупреждения заболевания СД1 у мышей *NOD* [36–38]. Процесс предупреждения заболеваемости диабетом у мышей оказывается относительно простым, а у людей он чрезвычайно сложен [5]. Одной из причин может быть то, что большее значение придается сходству заболеваний СД1 у мышей *NOD* и человека, чем различиям [39]. В действительности и у мышей, и у человека диабет имеет полигенную этиологию, характеризуется нарушением регуляции иммунного ответа и способностью к ремиссии после трансплантации костного мозга. Выявлены различия в действии материнских аутоантител у мыши и у человека. Различия наблюдаются также в частоте заболеваний и половой принадлежности. У мышей *NOD* инсулит протекает в легкой форме, доброкачественно [19]. Наконец, функционирование иммунных систем мыши и человека имеет значительные различия [40].

Другая распространенная модель аутоиммунного диабета – крысы линии *BB*, полученные в 70-е годы

в Канаде (BioBreeding Laboratories) на колонии аутбредных крыс Wistar. У 90% крыс линии *BB* (самцы и самки 8–16-недельного возраста) после полового созревания, как правило, развивается спонтанный СД1 с довольно тяжелым фенотипом и необходимостью инсулинотерапии [41]. У животных наблюдается инсулит с наличием Т-клеток, В-клеток, макрофагов и клеток НК, но с резким сокращением числа CD4⁺ Т-клеток и почти полным отсутствием CD8⁺ Т-клеток. Свойственная этим животным Т-клеточная лимфопения не характерна для СД1 у людей и мышей линии *NOD* и рассматривается как недостаток модели. Следует отметить, что у крыс линии *BB* инсулиту не предшествует периинсулит [42]. Тем не менее крысы *BB* используются в качестве модели на малых животных при индукции толерантности после трансплантации островков [41], а также при изучении диабетической нейропатии.

ГЕНЕТИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫЙ ДИАБЕТ

Мыши линии *AKITA* были получены в Японии от мышей *C57BL/6NSIc* со спонтанной мутацией в гене *ins 2*, предотвращающей правильный процессинг проинсулина и приводящей к стрессу эндоплазматической сети (ER-стрессу). У мышей с такой мутацией, начиная с 3–4-недельного возраста, развивается инсулинзависимый диабет, который характеризуется гипергликемией, гипоинсулинемией, полиурией и полидипсией. Отсутствие β-клеточной массы в этой модели делает ее альтернативой индуцированной СТЗ модели, используемой в исследованиях по трансплантологии [22]. Мыши линии *AKITA* применяются также в качестве модели СД1 при изучении макрососудистых заболеваний [43] и нейропатии [44]. Эта модель широко используется для исследования потенциальных супрессоров ER-стресса в островковых клетках поджелудочной железы, в связи с чем мыши линии *AKITA* могут применяться при изучении некоторых патологий при СД2 [45].

Однако результаты, полученные на грызунах, невозможно использовать в клинической медицине, поскольку существуют как специфические различия в иммунной системе грызунов и человека, так и видоспецифические особенности островков Лангерганса поджелудочной железы. Островки человека и мыши, которые предполагается использовать в качестве мишени для аутоиммунной атаки, отличаются во многих отношениях, включая архитектуру и состав клеток, пролиферативную активность, восприимчивость к травмам, способность образовывать островковый амилоид, а также в экспрессии белков теплового шока, островковых факторов транскрипции, антиоксидантных ферментов и основного переносчика

глюкозы (GLUT-1 или GLUT-2). Так, у грызунов не β-эндокринные клетки окружают внутреннюю β-клеточную массу, тогда как у человека эндокринные клетки островков более перемешаны. Кроме того, в отличие от β-клеток грызунов, способных восстанавливаться или регенерировать в ответ на ряд стимулов (резистентность к инсулину, абляция β-клеток и частичная панкреатэктомия), пролиферативный потенциал β-клеток человека либо очень мал, либо отсутствует [46].

Отличия иммунной системы грызунов и человека связаны, в первую очередь, с главным комплексом гистосовместимости (МНС). Пересадка человеческих иммунных клеток и тканей иммунодефицитным мышам позволяет получать перспективные мышинные модели, используемые для изучения естественных человеческих иммунных реакций. Экспериментальные модели сахарного диабета пытались улучшить, используя для этой цели «гуманизированных» трансгенных мышей, экспрессирующих предрасполагающие к диабету человеческие молекулы МНС класса II. Созданы новые линии мышей с иммунодефицитом, в которых приживаются трансплантированные функциональные ткани человека, включая гемопоэтические стволовые клетки, зрелые лимфоциты и островки поджелудочной железы. Так, на основе мышей *NOD-SCID* получены уникальные линии мышей *NSG*, с целенаправленной мутацией рецептора *IL2ry^{null}* общей γ-цепи. Мыши *NSG* считаются идеальными для исследования функций иммунной системы человека *in vivo* и определения механизмов действия лекарственных средств при СД1 [47–50].

Модели, в которых используют мышей с иммунодефицитом, имеют ряд недостатков. Во-первых, в них активны естественные киллерные клетки (НК), а островки поджелудочной железы человека очень чувствительны к НК-клеткам. Во-вторых, они не поддерживают приживание функциональной иммунной системой человека [37, 39]. Дефицит рецептора *IL2ry^{null}* общей γ-цепи полностью блокирует НК-клетки, вызывая дополнительные дефекты врожденного иммунитета. Мыши *NSG* полностью лишены НК-клеток. *NSG*-мыши служат удобной моделью для изучения функции трансплантированных островков поджелудочной железы человека при отсутствии потенциальных токсических эффектов глюкозы, несмотря на то, что эугликемия (120–160 мг/дл) у этих животных характеризуется большим содержанием глюкозы в крови, в отличие от человека (80–100 мг/дл). Нормогликемические мыши *NSG* доступны в неограниченном количестве, трансплантированные ими клетки не подвергаются воздействию высоких уровней глюкозы, для анали-

за функции требуется меньше клеток, чем для регулирования гипергликемии у реципиентов с диабетом [47–50]. Таким образом, показано, что мышцы *NSG* легко доступны, у них по желанию возможно вызвать гипергликемию и восстановить нормогликемию с помощью трансплантации островков Лангерганса, а также суспензии клеток поджелудочной железы человека и мыши, и, основное, этим мышам может быть привита функционирующая иммунная система человека. Однако при воздействии на этих мышей СТЗ, несмотря на ряд вышеописанных преимуществ, существуют и недостатки: неустойчивая индукция гипергликемии, возможность использования эндогенных мышечных островков для восстановления нормогликемии и токсичность СТЗ.

С целью индукции гипергликемии без использования токсических соединений были созданы генетические модели гипергликемии [47, 48]. К ним относятся модели мыши *NOD-Rag1^{null} Prf1^{null} Ins2^{Alkita}*, *NOD-Rag1^{null} IL-2^{ry null} Ins2^{Alkita}* и др. Преимущества этих моделей: 1) спонтанное развитие гипергликемии без использования токсичных лекарственных средств; 2) постоянная и тяжелая гипергликемия; 3) нет возврата к нормогликемии за счет эндогенных островков мыши; 4) нет необходимости во введении экзогенного инсулина, чтобы предотвратить развитие метаболической декомпенсации и смерти. Эти модели способны поддерживать приживание функциональной иммунной системы человека, поэтому они могут использоваться для изучения аллоиммунитета и аутоиммунитета.

Несмотря на значительный вклад исследований, выполненных на линиях генетически модифицированных животных, в понимание механизма патогенеза сахарного диабета, их роль не следует переоценивать. При использовании этих моделей вне поля зрения могут остаться вопросы приобретенной предрасположенности, играющие не меньшую роль в возникновении сахарного диабета 1 типа. Известно, что СД1 генетически жестко детерминирован лишь в 6–7% случаев, в то время как в остальных случаях заболевание развивается без существенной наследственной предрасположенности [51]. Установлено, что заболевание развивается далеко не у всех носителей аллелей, ассоциированных с диабетом [52]. Таким образом, перспективным представляется экспериментальное изучение механизмов действия неблагоприятных факторов внешней среды. При этом механизмы гибели β -клеток в значительной мере универсальны и во многом не зависят от действующего фактора, что позволяет экстраполировать на человека результаты, полученные на экспериментальных моделях [52].

ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1 ТИПА

При химически индуцированном СД1 наблюдается разрушение большого числа эндогенных β -клеток, что ведет к снижению выработки эндогенного инсулина с последующим развитием гипергликемии и потерей веса. Диабет, химически индуцируемый у грызунов и высших животных, представляет собой простую и относительно дешевую модель этого заболевания [53].

СД1, индуцированный с помощью химических веществ (СТЗ, аллоксан, дитизон), целесообразно использовать для оценки лекарственных средств или терапевтических подходов, при которых снижение уровня глюкозы в крови не зависит от β -клеток; например, для тестирования новых форм инсулина [54, 55]. Эта модель подходит и для оценки эффективности трансплантационной терапии, которая также приводит к снижению уровня глюкозы в крови [56, 57]. Считается, что необходимо исключить спонтанную регенерацию β -клеток при трансплантации [58, 59], а также провести гистологическое исследование эндогенной поджелудочной железы для определения инсулин-положительных клеток и измерения количества инсулина [59]. Однако с использованием химически индуцируемой модели СД1 было показано, что присутствие β -клеток не обязательно коррелирует с их функцией [60].

Один из недостатков сахарного диабета, индуцируемого химическими веществами, – их возможная токсичность для других органов. Следует отметить, что после введения СТЗ и аллоксана были зарегистрированы изменения уровня экспрессии изоферментов P450 в печени, почках, легких, кишечнике, семенниках и головном мозге. Этот факт необходимо учитывать при тестировании лекарственных препаратов на животных моделях [61].

Наиболее широко используется СТЗ-индуцируемая модель СД1, пришедшая на смену аллоксановой модели [36, 40], существенные недостатки которой связаны, в том числе, с нейро- и нефротоксичностью аллоксана и с отсутствием четкой зависимости доза–эффект.

Природный антибиотик СТЗ вырабатывается актиномицетами *Streptomyces achromogenes* и представляет собой N-ацетилглюкозамин(2-дезоксид-2-(3-метил-3-нитрозомочевина)-1-D-глюкопираноза), содержащий на месте ацетата остаток нитрозомочевина [36, 37]. СТЗ обладает антибактериальной и противоопухолевой активностью, поэтому его начали применять в терапии опухолей. Однако вскоре обнаружили, что применение СТЗ приводит к развитию гипогликемических состояний. Была показана способность СТЗ вызывать специфический некроз

β -клеток у лабораторных животных. Наблюдаемый инсулинемический синдром назвали «стрептозотоциновым диабетом», а СТЗ стали использовать для получения экспериментального СД1. Рассмотрим подробнее эту модель.

СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

В настоящее время стрептозотоциновый диабет получен у большинства лабораторных животных: крыс, мышей, морских свинок, кроликов, собак и обезьян. Однако различные виды животных, даже в пределах одного семейства, зачастую значительно различаются по чувствительности к СТЗ. Изучение межвидовых и межгрупповых различий в резистентности к СТЗ является одной из важных задач экспериментальной диабетологии. Считается, что наиболее чувствительны к СТЗ грызуны, особенно крысы, а человек и рыбы максимально резистентны [62], при этом β -клетки человека значительно более устойчивы к СТЗ, чем β -клетки остальных человекоподобных приматов [62]. Данная закономерность имеет генетическую природу, она обусловлена экспрессией различных видов транспортеров глюкозы на плазматической мембране, особенностями ферментативных систем окисления глюкозы в митохондриях и различиями в системе репарации ДНК [63].

ВНУТРИВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ

В пределах одного вида также существуют значительные межгрупповые различия в резистентности к СТЗ. Инбредные линии крыс и мышей могут отличаться по чувствительности к СТЗ в несколько раз [64, 65]. Диабетогенное действие СТЗ усиливается андрогенами и угнетается эстрогенами, что приводит к значительным различиям в чувствительности к СТЗ у самцов и самок [66]. Существенную роль в чувствительности к диабетогенным факторам играют не только связанные с полом различия, но и определенные индивидуальные особенности. Так, среди крыс Wistar можно выделить три группы животных с различной резистентностью к диабетогенным факторам, что проявляется в количестве β -клеток, гибнущих при воздействии СТЗ. Эта неоднородность обусловлена не шириной нормы реакции, а существованием изолированных групп животных с различной резистентностью. Животные первой группы характеризуются быстрым развитием гипергликемии и значительной деструкцией панкреатических островков уже на начальных стадиях диабета. Для второй группы характерно длительное латентное течение патологического процесса, когда при эугликемии натощак наблюдается нарушение толерантности к глюкозе. Третья группа занимает промежуточное положение с периодически возникающей гипергликемией [63].

СПОСОБЫ И ДОЗЫ ВВЕДЕНИЯ СТЗ

Однократное введение высокой дозы СТЗ приводит к развитию гипергликемии, и экспериментальные модели лабораторных грызунов, полученные таким путем, могут быть полезными при трансплантации и тестировании препаратов инсулина. Для моделирования СД1 используют также множественные введения низких доз СТЗ. Тем не менее получить модель СД1 за счет развития аутоиммунного инсулита удается лишь на немногих линиях мышей с генетической предрасположенностью [62, 67]. Этот метод не позволяет получить адекватную модель СД1 человека на других видах животных [62]. В этих случаях для развития самопрогрессирующего патологического процесса с аутоиммунным компонентом желательнее использовать однократную инъекцию диабетогенной дозы СТЗ (зависящей от вида животного) [62].

Диабетогенные дозы СТЗ, как и способы их введения, различны для разных видов животных. Субдиабетогенная доза СТЗ для крыс составляет 25 мг/кг при оптимальной диабетогенной дозе порядка 50–75 мг/кг [62, 68, 69]. У большинства животных эта доза приводит к манифестации диабета с гипергликемией, гипоинсулинемией, дислипидемией и значительной деструкцией панкреатических островков в сочетании с их лимфоидной инфильтрацией. Следует отметить, что для других видов грызунов диабетогенные дозы значительно выше и находятся в диапазоне от 100 до 200 мг/кг [62, 70]. β -Клетки рыб проявляют высокую резистентность к действию СТЗ, который даже в высоких дозах (350 мг/кг) вызывает лишь кратковременное нарушение синтеза и секреции инсулина без деструкции панкреатических островков. Этот феномен связан не с ускоренной деградацией СТЗ в печени или почках, а с особенностями метаболизма β -клеток у этих животных. В связи с неустойчивостью и коротким периодом полураспада СТЗ самым надежным считается его внутривенное введение. Однако существуют также и другие способы введения препарата для получения экспериментального диабета: внутрибрюшинный метод и прямая инфузия в сосуды поджелудочной железы. СТЗ устойчив лишь при низкой температуре в кислой среде, в то время как в нейтральных и щелочных условиях он быстро (в течение нескольких минут) деградирует до неактивных метаболитов, не обладающих диабетогенным эффектом [71]. В связи с этим СТЗ, растворенный *ex tempore*, рекомендуют вводить в цитратном буфере при кислых значениях (рН 4.5) [66].

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В ответ на изменение концентрации плазменного инсулина после введения СТЗ изменяется концен-

трация глюкозы в крови [72]. Эти изменения носят трехфазный характер. В отличие от аллоксана, СТЗ не угнетает глюкокиназу. Через 1 ч после введения начинается первая гипергликемическая фаза, которая достигает пика через 2 ч и продолжается до 4 ч. Считается, что развитие ранней гипергликемии обусловлено угнетением секреции инсулина в результате токсического воздействия СТЗ на β -клетки поджелудочной железы [73]. Некоторые авторы связывают ее с повышением скорости печеночного гликогенолиза или рассматривают как вторичную по отношению к повышению содержания свободных жирных кислот [13, 74]. Ультраструктурные изменения синтетического и энергетического аппарата β -клеток, сопровождаемые нарушениями биосинтеза проинсулина и инсулина, наблюдали в период гипергликемической фазы [75]. Через 4–8 ч наступает следующая гипогликемическая фаза, которая продолжается в течение нескольких часов (до суток) и считается следствием высвобождения инсулина из поврежденных β -клеток. Потеря секреторных гранул развивается на фоне необратимых изменений субклеточных оргanelл и ядра. Финальная фаза гликемической кривой характеризуется устойчивой гипергликемией и развитием перманентного диабета через 24 ч после введения СТЗ. Морфологический и ультраструктурный анализы свидетельствуют о полной дегрануляции и потере целостности β -клеток. Вторичная гипергликемия рассматривается как результат абсолютной инсулиновой недостаточности.

Согласно другим авторам, формирование гипергликемии при развитии экспериментального СТЗ-диабета также происходит за несколько последовательных этапов, но они более растянуты по времени. Так, первичная гипергликемическая реакция (в течение 1–4 сут); период эугликемии на фоне нарушенной толерантности к глюкозе (5–9-е сут); период стабильной гипергликемии, гиперфагии, полиурии (10 сут и далее) [66]. Через 12 ч после введения СТЗ наблюдается первичная гипергликемическая реакция, обусловленная гибелью значительной части β -клеток в панкреатических островках. Пик гипергликемии приходится на 2–3-и сут, затем наступает короткий период эугликемии. Причиной этого является то, что β -клетки потенциально способны вступать в митоз под действием высокой концентрации глюкозы [5]. Активация пролиферации β -клеток, как полагают, наступает на 3-и сут развития диабета [63]. Увеличение массы β -клеток в дальнейшем ведет к быстрому снижению гликемии до физиологических значений (до окончания 9-х сут) и соответствует состоянию неполной компенсации функции инсулярного аппарата поджелудочной железы. Неполноценность компенсаторной реакции проявляется нарушенной

толерантностью к глюкозе. К 10–14-му дню у животных наблюдается повторное повышение уровня гликемии [63]. Вероятно, в этот период происходит формирование развернутого аутоиммунного ответа на неоантигены панкреатических островков, ведущие к гибели основной массы β -клеток, фиброзу и склерозу островков, пролиферации альфа-клеток. В сохранившихся β -клетках в значительной степени нарушена индуцированная глюкозой секреция инсулина. Это вызвано рядом причин: неспецифической реакцией β -клеток на любые повреждающие факторы (в том числе СТЗ) и специфическим действием IL-1В и NO на метаболизм глюкозы в митохондриях, что нарушает нормальную активацию β -клеток [75, 76]. Помимо этого активированные островковые макрофаги и Т-лимфоциты продуцируют нейропептид- γ (NPY), который подавляет секрецию инсулина [76].

ФАКТОРЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ РАЗЛИЧИЯ В УСТОЙЧИВОСТИ К СТЗ

Различия в чувствительности к СТЗ обусловлены в большей мере внутриклеточными событиями, происходящими после переноса СТЗ через плазматическую мембрану в цитозоль и перед истощением запасов NAD⁺ [63]. Согласно опубликованным данным, резистентность к СТЗ определяет ряд факторов.

1. Чувствительность к диабетогенному действию зависит в первую очередь от физиологических свойств β -клеток. От этого зависят различия в скорости инактивации и выведения СТЗ [62, 71].

2. Различная степень экспрессии транспортеров глюкозы второго типа (GLUT-2), которые являются специфическими переносчиками СТЗ в цитоплазму β -клеток. Высокая резистентность β -клеток человека к СТЗ обусловлена преимущественной экспрессией на их поверхности GLUT-1, а не GLUT-2 [62].

3. Различия в активности систем окисления, например, более низкая активность ферментов гликолиза обуславливает большую восприимчивость и степень токсичности СТЗ у полевок в сравнении с мышами.

4. Внутриклеточное накопление различных метаболитов СТЗ, часть которых, как и СТЗ, способствует генерации свободнорадикальных продуктов и возникновению мутаций [77, 78].

5. Различная чувствительность инбредных линий мышей к СТЗ обусловлена разницей в активности поли(ADP-рибоза)полимеразы (ПАРП) [77].

6. Экспрессия белков теплового шока, которые являются мощными факторами резистентности панкреатических β -клеток к токсическому действию СТЗ. Уровень их экспрессии как при неспецифическом (действие СТЗ) воспалении, так и при аутоиммунном считается одним из наиболее важных пара-

метров, определяющих жизнеспособность β -клеток при инсулите [79, 80].

7. Различия в активности антиоксидантных систем, в частности, более высокая активность глутатионпероксидазы у мышей, являются одним из факторов, определяющих высокую устойчивость мышей к СТЗ [63].

8. Трансгенные линии мышей, экспрессирующие в β -клетках интерферон- γ , значительно более резистентны к индукции диабета, чем исходная линия [81]. Этот пример, как полагают, свидетельствует о роли внутриостровковых паракринных факторов [81]. Однако молекулярные механизмы этого феномена остаются не до конца изученными.

9. Также причиной, обуславливающей различия в устойчивости к СТЗ, считается кумулятивное действие повреждающих факторов. Неблагоприятные факторы внешней среды (особенно действующие в период раннего онтогенеза), вызывающие стресс-реакцию через высокий уровень глюкокортикоидов и изменения нейроэндокринной регуляции функции панкреатических островков, способны приводить к эндокринному импринтингу, связанному со значительной перестройкой внутриклеточных систем регуляции функции β -клеток [63]. У взрослых животных, перенесших в пренатальном периоде стресс, нарушена стимулированная глюкозой секреция инсулина и толерантность к глюкозе, а также существенно повышена чувствительность β -клеток к токсическому действию СТЗ [5].

Тропность СТЗ к β -клеткам определяется остатком глюкозы в составе его молекулы [82], благодаря которой он селективно связывается с переносчиком глюкозы GLUT-2 и транспортируется в цитоплазму [83]. Таким образом, чувствительность клеток к СТЗ зависит от экспрессии переносчиков GLUT-2, которые у большинства животных экспрессируются исключительно β -клетками панкреатических островков. Это подтверждается также следующими наблюдениями: инсулинпродуцирующие клетки, не экспрессирующие переносчик глюкозы, устойчивы к СТЗ, они становятся чувствительными к токсическому действию препарата только после экспрессии GLUT-2 в плазматической мембране [84]. Кроме того, другие клетки, экспрессирующие этот переносчик, такие, как гепатоциты и эпителиоциты канальцев почек, также подвергаются токсическому воздействию СТЗ. Поэтому введение животным СТЗ приводит к развитию не только диабета, но и повреждений печени и почек [63].

ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

СТЗ способен неферментативно высвобождать свободный NO, с которым связывают токсический эффект СТЗ [39, 85]. При этом в островковых β -клетках

накапливается большое количество СТЗ и возникает высокая концентрация NO, который, находясь в жидкой среде, быстро превращается в пероксинитрат, что ведет к активации процессов свободнорадикального окисления [39]. В результате нарушается целостность клеточных мембран, снижается эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях [37, 67], возникают точечные мутации в ДНК, такие, как ковалентная модификация пуриновых оснований и появление N-7-метилгуанина, O-6-метилгуанина и 3-метиладенина. СТЗ и его метаболиты являются алкилирующими агентами, которые метилируют остатки гуанина и, в меньшей степени, аденина в ДНК [86]. Следствием повреждения ДНК становится активация систем репарации. Ключевым ферментом, вовлеченным в репарацию при точечных мутациях, является ПАРП, которая замещает дефектное основание хвостом из поли-ADP-рибозы [59, 77]. Для осуществления репарации требуется NAD, что, учитывая огромное количество мутаций, индуцируемых NO и СТЗ, ведет к истощению клеточного пула NAD и гибели клетки [71, 87, 88]. При этом трансгенные мыши с дефицитом ПАРП устойчивы к действию диабетогенных факторов. Исследования последних лет показали, что, хотя СТЗ метилирует также белки, за гибель β -клеток отвечает, в конечном счете, метилирование ДНК [73]. Показано, что решающую роль в токсическом эффекте СТЗ в отношении β -клеток играет его способность вызывать энергетический дефицит в клетках [71, 87, 88].

ПАРП является ключевым фактором, участвующим в гибели β -клеток [37, 62], который активируется вне зависимости от того, вызвано ли повреждение ДНК действием химических факторов (СТЗ, аллоксан), факторами воспаления (NO, цитокины, активные формы кислорода) или β -цитотропными вирусами [62, 89].

С другой стороны, специфическое действие NO на β -клетки заключается также в активации гуанилатциклазы, повышении уровня cGMP и ингибировании митохондриальной аконитазы, что ведет к нарушению аэробного окисления глюкозы и, как следствие, подавлению стимулированной глюкозой секреции и синтеза инсулина [67, 90, 91]. При этом угнетение аконитазы, участвующей в цикле Кребса, на фоне гиперактивации ПАРП, ведет к полному истощению внутриклеточных запасов NAD и АТФ, что и является непосредственной причиной некроза β -клеток. При индуцированной СТЗ гибели β -клеток процессы апоптоза оказываются также блокированными из-за полного истощения внутриклеточных запасов АТФ и NAD [92, 93].

Генерация NO ответственна как за инициацию, так и за развитие СД, обусловленного как действием

вирусов [89] и токсических веществ [94], так и аутоиммунным ответом. Алкилирующий агент метилметансульфонат, будучи самым токсичным соединением, не является донором NO, доказывая тем самым, что NO не обязателен для токсического действия алкилирующих агентов, в том числе диабетогенного стрептозотоцина. NO и свободные нитроксильные радикалы могут усиливать токсичность СТЗ, но NO, несомненно, не является решающим фактором токсичности для β -клеток [51]. Однако способность СТЗ вызывать истощение пула АТР и, следовательно, дефицит энергии имеет важное значение для токсического действия на β -клетки. Биологические эффекты СТЗ на гомеостаз глюкозы и инсулина обусловлены повреждением β -клеток. С одной стороны, очевидно нарушение гомеостаза глюкозы (потребление кислорода и окисление глюкозы) и угнетение биосинтеза и секреции инсулина. С другой стороны, установлено, что СТЗ не оказывает непосредственного и прямого действия на транспорт глюкозы или ее фосфорилирование глюкокиназой [33, 95]. Предполагается, что первоначально угнетение биосинтеза и секреции инсулина может быть вызвано индуцированным СТЗ истощением NAD⁺ [96].

Показано, что такие цитокины, как IL-1, в иммунокомпетентных и эндокринных клетках панкреатических островков вызывают экспрессию индуцируемой синтазы оксида азота (иНОС) [85, 97], которая продуцирует значительные количества главного биологического медиатора и тем самым обуславливает гибель β -клеток [39, 98].

Таким образом, СТЗ активирует те же патогенетические механизмы (угнетение окисления глюкозы, мутации ДНК, истощение запасов NAD), как и другие токсичные для β -клеток яды и вирусы, а ключевыми агентами, реализующими эти процессы, вне зависимости от повреждающего фактора, являются NO и ПАРП. Таким образом, следует заключить, что стрептозотоциновая модель диабета этиологически и патогенетически в значительной степени близка к СД1 человека.

Несмотря на разнообразие описанных на сегодняшний день экспериментальных животных моделей СД, предпочтение отдается СТЗ-индуцированному диабету. Преимущество этой модели заключается в относительной простоте воспроизведения, высокой избирательности воздействия, возможности получения диабета различной степени тяжести и длительности, что позволяет смоделировать как постепенно развивающуюся дисфункцию β -клеток, так и нарушение толерантности к глюкозе, и развитие связанных с ней расстройств. Ряд недостатков негенетических СТЗ-моделей диабета (возможность разброса данных по уровню гликемии, возможность спонтан-

ной нормализации инсулинсекретирующей функции) может быть устранен путем правильного подбора диабетогенной дозы препарата и адекватного планирования эксперимента.

Экспериментальные модели СД на лабораторных грызунах, несомненно, считаются очень полезным инструментом для изучения патофизиологии и клинических аспектов заболевания и используются в качестве первого шага для исследования перспективной новой терапии. Однако животные модели в целом и модели СД 1 типа на грызунах в частности являются несовершенными и обладают некоторыми недостатками, когда результаты экстраполируются на человека. Более того, иногда результаты, полученные на грызунах, могут вводить в заблуждение при изучении профилактики СД1 [64, 99]. Чтобы избежать ошибочных результатов, требуется определенная осторожность при выборе модели и дозы препарата для получения экспериментального диабета. Необходимо специально для исследований по профилактике СД стандартизировать модели и эксперименты, получив достоверные результаты, четко их интерпретировать и создавать базу данных, после многократных повторов экспериментов.

Вопрос о том, в какой степени результаты, полученные на моделях, можно экстраполировать на организм человека, является одновременно и важнейшим и сложнейшим при использовании лабораторных животных [100, 101]. Однако вопрос о соответствии той или иной модели процессам, протекающим в организме человека, остается открытым. Оценка адекватности экспериментальных моделей включает систему доказательств, показывающих, что результаты, полученные на животных, с определенной степенью вероятности могут быть экстраполированы на человека.

Приведенные данные не отражают весь спектр разработанных на сегодняшний день моделей СД1. Количество моделей постоянно растет, но они недостаточно изучены. При этом следует учитывать, что каждая экспериментальная модель воссоздает лишь определенные звенья патогенеза СД1 и не имеет полного соответствия с развитием и течением этого заболевания у человека. Поэтому продолжают работы по модификации имеющихся и созданию новых более совершенных моделей, наиболее полно отражающих изменения, присущие СД1 у человека.

Следует подчеркнуть, что адекватное моделирование СД1 является необходимой основой доклинических испытаний антидиабетических средств, а использование разнообразных моделей дает возможность для обоснований экстраполяции экспериментальных результатов на больных СД1. ●

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБР РАН им. Н.К. Кольцова «Механизмы

клеточной дифференциации в морфогенезе и процессах восстановления» (№ 0108-2018-0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень ВОЗ № 312., апрель 2016 г.
2. Балаболкин М.И., Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2000. № 3. С. 2–10.
3. Eisenbarth G.S. // N. Engl. J. Med. 1986. № 314. P. 1360–1368.
4. Daaboul J., Schtz D. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2003. № 4. P. 317–323.
5. Никонова Т.В. // Сахарный диабет. 2006. № 3. С. 59–64.
6. Ide A., Eisenbarth G.S. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2003. № 4. P. 243–253.
7. Hyttinen V., Kaprio J., Kinnunen L., Koskenvuo M., Tuomilehto J. // Diabetes. 2003. № 52. P. 1052–1055.
8. Atkinson M.A. // Diabetes. 2005. V. 54. № 5. P. 1253–1263.
9. Homo-Delarche F., Drexhage H.A. // Trends Immunol. 2004. № 25. P. 222–229.
10. Мохорт Т.В., Мельнов С.В., Горанов В.А. // Пробл. эндокринологии. 2000. Т. 46. № 2. С. 8–13.
11. Kawasaki E., Abiru N., Eguchi K. // Diabetes Res. Clin. Practice. 2004. № 66. P. 27–32.
12. Rees D.A., Alcolado J.C. // Diabetic Medicine. 2005. № 4. P. 359–370.
13. Баранов В.Г. Экспериментальный сахарный диабет. М.: Наука, 1983. 240 с.
14. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2004. 608 с.
15. Lukačínová A., Hubková B., Rácz O., Ništiar F. // Diabetes Mellitus – Insights and Perspectives / Ed. Oluwafemi O. Oguntibeju. L.: InTech, 2013. Ch. 13.
16. King A.J. // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 166. № 3. P. 877–894.
17. Choi S.B., Park C.H., Choi M.K., Jun D.W., Park S. // J. Biotech. Biochem. 2004. V. 68. P. 2257–2264.
18. Masiello P. // Internat. J. Biochem. Cell Biol. 2006. V. 38. № 5–6. P. 873–893.
19. Green E.A., Flavel R.A. // Immunol. Rev. 1999. V. 169. P. 11–22.
20. Yang Y., Santamaria P. // Clin. Sci. (London). 2006. V. 110. № 6. P. 627–639.
21. Lenzen S., Tiedge M., Elsner M., Lortz S., Weiss H., Jörns A., Klöppel G., Wedekind D., Prokop C.M., Hedrich H.J. // Diabetologia. 2001. № 44. P. 1189–1196.
22. Wallis R.H., Wang K., Marandi L., Hsieh E., Ning T., Chao G.Y., Sarmiento J., Paterson A.D., Poussier P. // Diabetes. 2009. № 58. P. 1007–1017.
23. Todd J.A., Wicker L.S. // Immunity. 2001. V. 15. № 3. P. 387–395.
24. Driver J.P., Serreze D.V., Chen Y.G. // Semin. Immunopathol. 2011. № 33. P. 67–87.
25. Niens M., Grier A.E., Marron M., Kay T.W., Greiner D.L., Serreze D.V. // Diabetes. 2011. № 60. P. 1229–1236.
26. Herrath M.G., Nepom G.T. // J. Exp. Med. 2005. V. 202. № 9. P. 1159–1162.
27. Herrath M.G., Nepom G.T. // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 2. P. 129–132.
28. Chan O., Inouye K., Akirav E.M., Park E., Riddell M.C., Matthews S.G., Vranic M. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2005. V. 289. № 1. P. 235–246.
29. Mathews C.E. // Pediatr. Diabetes. 2005. V. 6. № 3. P. 165–177.
30. Yoon J.W., Jun H.S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. № 928. P. 200–211.
31. Wicker L.S., Clark J., Fraser H.I., Garner V.E., Gonzalez-Munoz A., Healy B., Howlett S., Hunter K., Rainbow D., Rosa R.L., et al. // J. Autoimmun. 2005. № 25 (Suppl.). P. 29–33.
32. Toyoda H., Formby B. // Bioessays. 1998. V. 20. № 9. P. 750–757.
33. O'Reilly L.A., Gu D., Sarvetnick N. // Diabetes. 1997. V. 46. P. 4599–4606.
34. Brown G.R., Silva M.D., Thompson P.A., Beutler B. // Diabetologia. 1998. V. 41. № 12. P. 1502–1510.
35. Gonzalez C., Ménissier De Murcia J., Janiak P., Bidouard J.P., Beauvais C., Karray S., Garchon H.J., Lévi-Strauss M. // Diabetes. 2002. V. 51. № 5. P. 1470–1476.
36. Babaya N., Ikegami H., Fujisawa T., Nojima K., Itoi-Babaya M., Inoue K., Ohno T., Shibata M., Ogihara T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. № 1. P. 158–164.
37. Masutani M., Suzuki H., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K., Watanabe T., Sugimoto T., Nakagama H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 5. P. 2301–2304.
38. Baxter A.G., Duckworth R.C. // Drug Discovery Today. 2004. № 4. P. 451–455.
39. Turk J., Corbett J.A., Ramanadham S., Bohrer A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 197. № 3. P. 1458–1464.
40. Hosokawa M., Doici W., Thorens B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 289. № 5. P. 1114–1117.
41. Roep B.O., Atkinson M., Herrath M. // Nat. Rev. Immunol. 2004. V. 4. № 12. P. 989–997.
42. Mordes J.P., Bortell R., Blankenhorn E.P., Rossini A.A., Greiner D.L. // ILAR J. 2004. V. 45. № 3. P. 278–291.
43. Mathews C.E., Langley S.H., Leiter E.H. // Transplantation. 2002. V. 73. № 8. P. 1333–1336.
44. Zhou C., Pridgen B., King N., Xu J., Breslow J.L. // J. Lipid Res. 2011. V. 52. № 8. P. 1483–1493.
45. Drel V.R., Pacher P., Stavnichuk R., Xu W., Zhang J., Kuchmerovska T.M., Slusher B., Obrosova I.G. // Int. J. Mol. Med. 2011. № 28. P. 629–635.
46. Cailat-Zucman S., Bach J.F. // Clin. Rev. Allerg. Immunol. 2000. V. 19. № 3. P. 227–246.
47. Vandewalle C.L., Falorni A., Lernmark A., Goubert P., Dorchy H., Coucke W., Semakula C., Van der Auwera B., Kaufman L., Schuit F.C. // Diabetes Care. 1997. V. 20. № 10. P. 1547–1552.
48. Chen H., Zheng C., Zhang X., Li J., Li J., Zheng L., Huang K. // Peptides. 2011. V. 32. № 8. P. 1634–1639.
49. Dufrane D., van Steenberghe M., Guiot Y., Goebbels R.M., Saliez A., Gianello P. // Transplantation. 2006. № 81. P. 36–45.
50. Rackham C.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B., Hauge-Evans A.C., Jones P.M., King A.J. // Diabetologia. 2011. № 54. P. 1127–1135.
51. Jederstrom G., Grasjo J., Nordin A., Sjöholm I., Andersson A. // Diabetes Technol. Ther. 2005. V. 7. № 6. P. 948–957.
52. Kargar C., Ktorza A. // Diabetes Obes. Metab. 2008. № 10 (Suppl. 4). P. 43–53.
53. Deeds M.C., Anderson J.M., Armstrong A.S., Gastineau D.A., Hiddinga H.J., Jahangir A., Eberhardt N.L., Kudva Y.C. // Lab. Anim. 2011. V. 45. № 3. P. 131–140.
54. Makhlof L., Duvivier-Kali V.F., Bonner-Weir S., Dieperink H., Weir G.C., Sayegh M.H. // Transplantation. 2003. V. 76. № 4. P. 657–664.
55. Sheshala R., Peh K.K., Darwis Y. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2009. V. 35. № 11. P. 1364–1374.

56. Baeyens L., De B.S., Lardon J., Mfopou J.K., Rooman I., Bouwens L. // *Diabetologia*. 2005. V. 48. № 1. P. 49–57.
57. Arai T., Kaneko H., Takagi H., Ogino T., Sasaki M., Matsu-moto H., Sugawara M. // *Vet. Res. Commun.* 1996. V. 20. № 3. P. 215–224.
58. Yang H., Wrigth J.R. // *Endocrinology*. 2002. V. 143. № 7. P. 2491–2495.
59. Орловский М.А. // *Журн. АМН Украины*. 2006. Т. 12. № 2. С. 255–268.
60. Hayashi K., Kojima R., Ito M. // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. V. 29. № 6. P. 1110–1119.
61. Srinivasan K., Ramarao P. // *Indian J. Med. Res.* 2007. V. 125. № 3. P. 451–472.
62. Kromann H., Christy M., Lernmark A., Nedergaard M., Nerup J. // *Diabetologia*. 1982. V. 22. № 3. P. 194–198.
63. Орловский М.А. // *Патология*. 2004. Т. 1. № 1. С. 21–26.
64. Reddy S., Sandler S. // *Autoimmunity*. 1995. V. 22. № 2. P. 121–126.
65. Wright J.R., Abraham C., Dickson B.C. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 1999. V. 114. № 3. P. 413–440.
66. El-Seweid M.M., El-Sweify S.E., Ameen R.S., Hachem R.M. // *Parmacol. Res.* 2000. V. 45. № 5. P. 391–398.
67. Gai W., Schott-Ohly P., Schulte im Walde S., Gleichmann H. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 2004. V. 112. № 1. P. 29–37.
68. Sharma B.R., Kim M.S., Rhyu D.Y. // *J. Tradit. Chin. Med.* 2016. V. 36. № 1. P. 71–77.
69. Gu D., Arnuch M., Sawyer S.P., Sarvetnick N. // *Am. J. Physiol.* 1995. V. 269. № 6. P. 1089–1094.
70. Fisher M.M., Perez Chumbiauca C.N., Mather K.J., Mirmira R.G., Tersey S.A. // *Endocrinology*. 2013. V. 154. № 9. P. 3476–3481.
71. Lee J.H., Yang S.H., Oh J.M., Lee M.G. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2010. V. 62. № 1. P. 1–23.
72. Szkudelski T. // *Physiol. Res.* 2001. V. 50. № 6. P. 537–546.
73. Lenzen S. // *Diabetologia*. 2008. № 51. P. 216–226.
74. Mythili M.D., Vyas R., Akila G., Gunasekaran S. // *Microsc. Res. Tech.* 2004. V. 63. № 5. P. 274–281.
75. Imai Y., Patel H.R., Hawkins E.J., Doliba N.M., Matschinsky F.M., Ahima R.S. // *Endocrinology*. 2007. V. 148. № 12. P. 5716–5723.
76. Cardinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. // *J. Mol. Endocrinol.* 1999. V. 22. № 1. P. 65–70.
77. Cardinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. // *Endocrinology*. 1998. V. 139. № 6. P. 2885–2891.
78. Bellmann K., Wenz A., Radons J., Burkart V., Kleemann R., Kolb H. // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 95. № 6. P. 2840–2845.
79. Burkart V., Blaeser K., Kolb H. // *Horm. Metab. Res.* 1999. V. 31. № 12. P. 641–644.
80. Charron M.J., Bonner-Weir S. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 3. P. 268–270.
81. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. // *Diabetologia*. 2000. V. 43. № 12. P. 1528–1533.
82. Dekel Y., Glucksam Y., Elron-Gross I., Margalit R. // *Lab. Anim. (NY)*. 2009. V. 38. № 2. P. 55–60.
83. Lee J.Y., Kim M.J., Moon C.K., Chung J.H. // *Biochem. Pharmacol.* 1993. V. 46. № 11. P. 2111–2113.
84. Wada R., Yagihashi S. // *Virchows Archiv*. 2004. V. 444. № 4. P. 375–382.
85. Heitmeier M.R., Scarim A.L., Corbett J.A. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 21. P. 13697–13704.
86. Chaudhry Z.Z., Morris D.L., Moss D.R., Sims E.K., Chiong Y., Kono T., Evans-Molina C. // *Lab. Anim.* 2013. V. 47. № 4. P. 257–265.
87. Husseiny M.I., Kaye A., Zebadua E., Kandeel F., Ferreri K. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. P. 94591.
88. Akirav E.M., Lebastchi J., Galvan E.M., Henegariu O., Akirav M., Ablamunits V., Lizardi P.M., Herold K.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 47. P. 19018–19023.
89. Yamamoto H., Uchigata Y., Okamoto H. // *Nature*. 1981. V. 294. № 5838. P. 284–286.
90. Simonsson E., Ahreacuta B. // *Eur. J. Pharm.* 1998. V. 350. № 2–3. P. 243–250.
91. Stevens R.B., Sutherland D.E., Ansite J.D., Saxena M., Ros-sini T.J., Levay-Young B.K., Hering B.J., Mills C.D. // *J. Immunol.* 1987. V. 159. № 11. P. 5329–5335.
92. Fisher M.M., Watkins R.A., Blum J., Evans-Molina C., Chala-sani N., DiMeglio L.A., Mather K.J., Tersey S.A., Mirmira R.G. // *Diabetes*. 2015. V. 64. № 11. P. 3867–3872.
93. Szkudelski T. // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2012. V. 237. № 5. P. 481–490.
94. Tsuji A., Sakurai H. // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 245. № 1. P. 11–16.
95. Howart F.C., Qureschi A., Shahin A., Lukic M.L. // *Mol. Cell. Biochem.* 2005. V. 269. № 1–2. P. 103–108.
96. Andreone T., Meares G.P., Hughes K.J., Hansen P.A., Corbett J.A. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012. V. 303. № 2. P. 172–179.
97. Arnush M., Scarim A.L., Heitmeier M.R., Kelly C.B., Corbett J.A. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. № 6. P. 2684–2691.
98. Rabinovitch A. // *Diabet. Met.* 1998. V. 14. № 2. P. 129–151.
99. Leiter E.H., von Herrath M. // *Diabetologia*. 2004. V. 47. № 10. P. 1657–1660.
100. Roep B.O., Atkinson M. // *Diabetologia*. 2004. V. 47. № 10. P. 1650–1656.
101. Mestas J., Hughes C.C. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 5. P. 2731–2738.