

*Aktuelne teme /  
Current topics*

ANIMALNI MODELI DIJABETESA  
MELITUSA

ANIMAL MODELS OF DIABETES  
MELLITUS

Milana Bosanac<sup>1</sup>, Nikola Aleksić<sup>1</sup>, Natali Rakočević<sup>1</sup>,  
Vladimir Laković<sup>2</sup>, Andrijana Milankov<sup>1, 3</sup>,  
Bojana Andrejić Višnjić<sup>4</sup>, Matilda Đolai<sup>3, 4</sup>,  
Sandra Trivunić Dajko<sup>3, 5</sup> Nemanja Gvozdenović<sup>1, 3, 6</sup>

**Correspondence to:**

**Milana Bosanac**

Medicinski fakultet  
Univerziteta u Novom Sadu,  
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad,  
Republika Srbija.  
e-mail: 13782M15@mf.uns.ac.rs

<sup>1</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

<sup>2</sup> Specijalna bolnica za rehabilitaciju "Junaković", Apatin

<sup>3</sup> Klinički centar Vojvodine, Novi Sad

<sup>4</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za histologiju i embriologiju

<sup>5</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za patologiju.

<sup>6</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za urgentnu medicinu.

**Ključne reči**

dijabetes melitus; animalni modeli; aloksan; streptozotocin

**Key words**

diabetes; animal models; alloxan; streptozotocin

**Sažetak**

Prevenција i lečenje dijabetes melitusa (DM) i njegovih komplikacija je važno za postizanje globalnog cilja, a to je smanjenje prevremene smrtnosti od nezaraznih bolesti za jednu trećinu do 2030. godine. Tokom godina su vršena brojna istraživanja o DM, pretežno na životinjama. Cilj našeg istraživanja je izvršiti sveobuhvatnu analizu podataka iz literature i identifikovati tipove i metodologiju animalnih modela DM: korelirati animalne modele sa tipovima DM kod čoveka; i predočiti prednosti i mane pojedinih metoda. Pretražene su elektronske baze podataka *Medline*, *Highwire* i *Hinari*, i to eksperimentalni i pregledni radovi. Animalni modeli DM a se dele na (i) indukovane, (ii) spontane i (iii) transgenske i nok-aut modele. U ispitivanju protekcije beta ćelija pankreasa, patogeneze i prevencije DM1 najpogodniji su spontani animalni modeli, dok su u proučavanju terapije DM1 najpogodniji hemijski indukovani modeli. U ispitivanju lečenja DM2 najčešće su korišteni transgenski i nokaut modeli, dok se u istraživanjima insulinske rezistencije i gojaznosti kod DM2 najčešće koriste spontani modeli. Jedan od važnih zaključaka jeste da iako su veoma korisni, ne postoji idealni model, te je od velikog značaja dobro poznavati prednosti i mane svakog od modela i primeniti onaj koji najviše odgovara cilju istraživanja.

**UVOD**

Endokrini deo tkiva pankreasa, predstavljen Langerhansovim ostrvcima, ima esencijalnu ulogu u regulaciji glikemije. Kod čoveka i pacova, ćelijske nosioce endokrine funkcije čini nekoliko tipova ćelija: *alfa ćelije (A ćelije)*, koje luče glukagon; *beta ćelije (B ćelije)*, koje luče insulin; i *gama ćelije (D ćelije)*, koje luče somatostatin, a u znatno manjem broju prisutni su i drugi tipovi ćelija (1-3). Šećerna bolest (diabetes mellitus), jedna od najčešćih metaboličkih bolesti, karakteriše se hroničnom hiperglikemijom, koja je uzrokovana apsolutnim ili relativnim nedostatkom insulina. Step en nedostatka je osnovni kreator polimorfni h kliničkih ispoljavanja ove bolesti (4). Razlikujemo tri osnovna tipa dijabetesa melitusa (DM). Dijabetes melitus Tip 1 (DM1)

koji se karakteriše insulinskom deficijencijom kao posledicom gubitka beta ćelija (insulin zavisni dijabetes melitus, IZDM) (5). Dijabetes melitus Tip 2 (DM2) u kome ćelije ne mogu adekvatno koristiti insulin (insulinska rezistencija) i/ili je udruženo sa apsolutnim nedostatkom insulina (insulin nezavisni dijabetes melitus, INZDM) (6). Tip 3, gestacioni dijabetes koji se razvija kod trudnih žena koje nikada do tada nisu imale DM (7). Prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) DM će biti sedmi uzrok smrti među ljudima u svetu do 2030. godine, pre svega u zemljama sa niskim i srednjim standardom. Sprečavanje i lečenje DM i njegovih komplikacija je važno za postizanje globalnog cilja, a to je smanjenje prevremene smrtnosti od nezaraznih bolesti za jednu trećinu do 2030. godine (8). Kako bi se došlo do željenog

rezultata tokom godina vršila su se brojna istraživanja, pretežno na životinjama. Animalni modeli bi trebali biti pažljivo izabrani u pogledu životinjske vrste koja se koristi i u zavisnosti od aspekta bolesti koji se proučava (9).

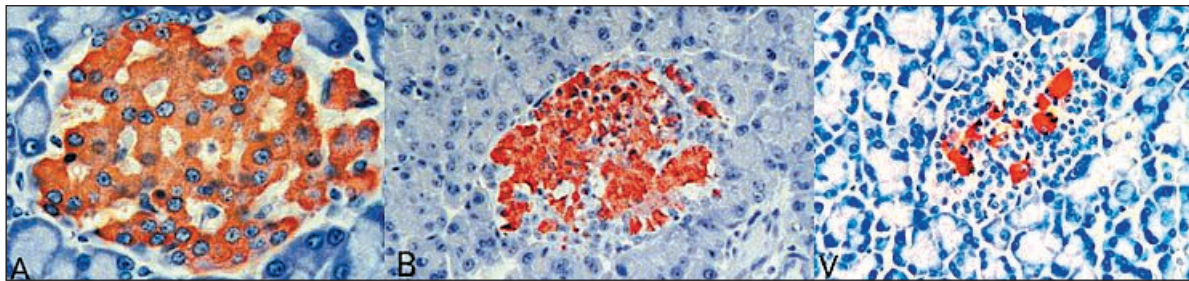
Animalni modeli DM su ključni za razumevanje različitih aspekata patogeneze DM i pronalaska novih terapija. Idealni model DM treba da ima određene bitne karakteristike: patogeneza modela koja u potpunosti oponaša patogenezu humanog DM; osetljivost na antidijabetičke lekove; dugotrajno preživljavanje modela, kako bi se mogle istraživati i komplikacije DM (9).

Cilj istraživanja je izvršiti sveobuhvatnu analizu postojećih tipova animalnih modela DM; korelirati ih sa humanim tipovima DM, uz osvrt na prednosti i mane pojedinih modela.

ta hemikalija na telo (11).

*Hemijski indukovani model* – Aloksan i streptozotocin se smatraju najpotentnijim dijabetogenim hemikalijama do sada korišćenim u proučavanju DM. Takođe i druge supstance mogu da izazovu DM. To su hlorozotocin, ditizon, vakor, oksin, metilazoturea, ciproheptadin (9).

Aloksan predstavlja toksičan analog glukoze koji se predominantno akumulira u pankreatičnim beta ćelijama putem *GLUT-2* transportera (13). On stvara reaktivna kiseonična jedinjenja (*reactive oxygen species* (ROS)) koji su odgovorni za smrt beta ćelija koje karakteriše nizak antioksidativni kapacitet. Stanje koje ova reakcija izaziva je insulin zavisni aloksanski dijabetes, što je ekvivalentno DM1 (14). Jedan od tehničkih nedostataka modela je činjenica da se aloksan brzo razgrađuje te da se mora brzo aplikovati jedinkama kako bi došlo do akumulacije u beta ćelijama.



Slika 1. Imunohistohemijsko bojenje na insulin (A) kontrolna grupa, 630x; (B) 24h nakon primene aloksana, 400x; (C) 48h nakon primene aloksana, 400x (17).

## MATERIJAL I METODE

Kako bi se došlo do što više dostupnih, relevantnih radova, pretražene su elektronske baze podataka *Medline*, *Highwire* i *Hinari*. Analizirani su rezultati eksperimentalnih radova (*Original Article*) i podaci iz preglednih radova (*Review Article*), koji su objedinjeni i sažeti tako da pruže uvid u savremenu i najčešće primenjivanu metodologiju u ovoj naučno-istraživačkoj oblasti. U pretrazi nisu korišćene restrikcije po datumu publikacije.

## REZULTATI

Animalni modeli DM su: 1) Indukovani (eksperimentalni) u koje spadaju: hirurški (parcijalna ili totalna pankreatektomija); ne-hirurški/toksični/hemijski (upotrebom dijabetogenog toksina u eksperimentalnim životinjama); virusni; i 2) Spontani (genetski indukovani), 3) Transgenski i nok-aut modeli (nastali genetskim inženjeringom) (10, 11).

### Indukovani (eksperimentalni) modeli DM

*Hirurški indukovani DM* - Parcijalna pankreatektomija je jedan od načina redukcije mase beta ćelija (12). Predstavlja stabilan model DM2 (11). Hirurški se uklanja 90% tkiva pankreasa što rezultuje sporim razvitkom hiperglikemije u periodu od 12 nedelja do 20 meseci. Period postoperacione normoglikemije je praćen razvitkom hronične hiperglikemije kao posledica daljeg propadanja preostalih beta ćelija (10). DM se, takođe, može izazvati i kombinovanjem 50% parcijalne pankreatektomije sa nikotinamidom-adenin dinukleotid (NAD) (350mg/kg) i streptozocinom (200 mg/kg) u BALB/c miševima. Postoje određene prednosti kombinovane procedure jer umanjuju rizik nepotrebnih štetnih efekata

Takođe, ukoliko je cirkulacija u pankreasu narušena u toku prvih nekoliko minuta nakon primene aloksana, njegov učinak može izostati (15,16). Istraživanja vršena na aloksanskom modelu navode postojanje četiri vremenski determinisane faze glikemijskog odgovora od momenta aplikacije aloksana: 1) prolazna hiperglikemijska faza (30 min), 2) prva hiperglikemijska faza (2-4h), 3) druga hipoglikemijska faza (4-8h), 4) faza permanentne dijabetične hiperglikemije (12-48h) (14) (Slika 1).

Streptozotocin deluje kao inhibitor sinteze DNK u ćelijama sisara i bakterija. Citotoksičan je za beta ćelije pankreasa i u zavisnosti od primenjene doze njegov efekat se može videti unutra 72 sata (18). Rezultat njegovog delovanja je nekroza beta ćelija pankreasa (19). Primena streptozotocina u više manjih doza samo delimično oštećuje pankreasna ostrvca, aktivira inflamatorne procese koji izazivaju dalji gubitak aktivnosti beta ćelija što na kraju rezultira insulin-skom deficijencijom i hiperglikemijom. Ovakav odgovor više liči patogenezi i morfološkim promenama DM1 nego kod protokola gde se koristi pojedinačna visoka doza streptozotocina (20, 21).

Pretraživanjem elektronske baze *Medline* po kriterijumima pretrage „alloxan diabetes“ pronašli smo 58163 objavljenih naučnih publikacija a po kriterijumima pretrage „streptozotocin“ AND „diabetes mellitus“ 27868 naučnih publikacija što ukazuje na veliki značaj eksperimentalnih modela DM indukovanih aloksanom i streptozocinom.

**Tabela 1.** Poređenje uticaja aloksana i streptozotocina na tretirane životinje (11).

Stanje	Aloksan	Streptozotocin
Akutna hiperglikemija (maksimalna glukoza u krvi)	45 min	120 min
Deplecija glikogena iz jetre	Brže	Sporo
Nivo insulina za vreme hipoglikemijske faze	Povišen	Povišen
pH stabilnost	3-4 4,	1-4,5
Hipoglikemija	Manje izražena	Više izražena
Osetljivost na insulin	Da	Da
Reverzibilnost	Posle 3 meseca	Nereverzibilno
Stopa mortaliteta %	37	8

Virusom indukovani DM – virusi stvaraju bolest preko mehanizma povezanog sa regulacijom urođenog imunog sistema (22). Prijavljena je povezanost virusa sa razvojem DM1, a najčešće pominjani su koksaki B virus, virus encefalomiokarditisa, virus *Kilham* pacova, limfocitni horiomeningitisni virus rubele i virus mumpsa (11).

#### Spontani (genetski indukovani) modeli DM

##### Spontani modeli DM1:

■ *Akita miš* - nastaje spontanom mutacijom insulina 2 gena što dovodi do stresa na endoplazmatičnom retikulumu beta ćelija i razvoja teške hiperglikemije za 4 nedelje kod muških miševa, dok ženke miševa imaju sporo napredujuću hiperglikemiju (7).

■ *Negojzani dijabetični miš (Non-obese diabetic (NOD))* je najčešće korišćen model za ispitivanje DM1. Za razliku od drugih korišćenih modela u autoimunim studijama ovaj model može da razvije bolest spontano slično ljudima (9).

■ *BB pacov (Bio-breeding pacov)*: ovaj model dovodi do poremećaja autoimune prirode i insulinitisa se karakteriše infiltracijom T limfocita, B limfocita, makrofaga i NK ćelija (10). Ovi pacovi spontano razvijaju DM u roku od 50 do 90 dana sa sličnom incidencijom (preko 90%) kod ženki i mužjaka (7).

■ *LEW 1A1/iddm pacovi (Levis insulin zavisni DM)* nastao je spontanom mutacijom. Čini se da beta ćelije zahvaćenih životinja umiru putem apoptoze, prouzrokovane proinflammatorym citokinima oslobođenih iz imunih ćelija koje infiltruju ostrvca.

##### Spontani modeli DM2:

■ *C57BL/6J miš sa ishranom bogatom mastima* – Model obuhvata ishranu bogatu mastima nedijabetičnog miša soja *C57BL/6J* (20). *C57BL/6J* miševi kao posledicu razvijaju hiperglikemiju, hiperinsulinemiju, hiperlipidemiju, povećanu gojaznost, insulinsku rezistenciju i glukoznu intoleranciju (10,22).

■ *Streptozotocin* – kod odraslih jedinki primenjuju se kombinacija streptozotocina i nikotinamida-adenin dinukleotid (NAD). NAD svojim antioksidativnim delovanjem ublažava citotoksično delovanje streptozotocina, te dolazi samo do manjih oštećenja ukupne mase beta ćelija pankreasa i stvaranja DM2. Stoga je ovaj model u prednosti pri istraživanju insulinotropnih agenasa u lečenju DM2 (19).

■ *Goto Kakizaki pacov* - jedinke nisu sposobne da sekretuju zadovoljavajuće količine insulina (7), te razvijaju blagu hiperglikemiju u ranoj fazi života, i predstavljaju negojazni model.

■ *Zucker Fatty i Zucker Fatty dijabetični pacov* – ovi pacovi poseduju mutaciju gena za leptinske receptore (*fa/fa*) što prouzrokuje gojaznost i hipertenziju sa povezanim bubrežnim i kardiovaskularnim bolestima. *Zucker Fatty* dijabetični pacov (*ZDF*) poseduje identičnu mutaciju gena kao i dodatnu mutaciju koja dovodi do spontanog razvoja hiperglikemije kod mužjaka tokom 7-10 nedelja (10). U ovom periodu svi pacovi razvijaju gojaznost, insulinsku rezistenciju i očigledni insulin nezavisni DM (22). Ženke postaju hiperglikemične tek posle ishrane bogate mastima i pretpostavlja se da je uzrok postojanje dodatne mutacije, iako se ne definiše o kojoj se mutaciji radi. (10). Kod *Zucker Fatty* dijabetičnih pacova je opisana poremećena arhitektonika ostrvaca, beta ćelijska degranulacija i odumiranje beta ćelija (22).

#### Transgenski i nok-aut modeli DM

U istraživanju DM koriste se mnogi transgenski i nokaut modeli. Ovi modeli su stvoreni genetskom manipulacijom koristeći ili transgensku inserciju i/ili pristup ciljanog brisanja gena (10). Modifikacijom genoma glodara može se naglasiti (transgenski model) ili suzbiti (nokaut model) ekspresija gena za koji se smatra da igra bitnu ulogu u metabolizmu glukoze (19).

Nova saznanja i bolje razumevanje karakteristika DM1 i DM2 će omogućiti razvijanje adekvatnijih animalnih modela i njihovu bolju selekciju, jer je malo verovatno da će jedan animalni model ili tretman odgovarati širokom spektru bolesti bilo kod DM1 i DM2 (7).

U tabeli 2 su dati neki od upotrebljivanih modela i slučajeva kada se oni koriste. Takođe, sve češće se razvijaju posebni modeli kako bi se ispitivale vrlo specifični aspekti komplikacija DM.

#### ZAKLJUČAK

Analizom podataka iz dostupne literature, može se zaključiti da je eksperimentalna indukcija DM i dalji razvoj animalnih modela ključan za napredak i razumevanje različitih aspekata njegove patogeneze i novog terapijskog pristupa. Iako je prednost animalnih modela višestruka treba biti svestan njihovih ograničenja i u samom odabiru modela voditi se pre svega tipom DM koji se proučava kao i ciljem samog istraživanja. -

Tabela 2. Animalni modeli dijabetesa (12)

Animalni modeli dijabetesa tip 1		
Upotreba modela	Glavne karakteristike	Najčešće upotrebljavani modeli
Ispitivanje patogeneze	Hiperglikemija Autoimunost usmerena ka beta ćelijama	NOD miš, BB pacov Lew.1AR.1 pacov Komeda dijabetesu sklon pacov
Prevenција dijabetesa tip 1	Hiperglikemija Autoimunost usmerena ka beta ćelijama	NOD miš, BB pacov Lew.1AR.1 pacov Komeda dijabetesu sklon pacov
Protekcija beta ćelija	Hiperglikemija Oštećenje beta ćelija	NOD miš, BB pacov Lew1AR.1 pacov Komeda dijabetesu sklon pacov Niske doze streptozotocina
Lečenje dijabetesa	Hiperglikemija Značajan gubitak mase beta ćelija	Visoke doze streptozotocina, Aloksan, Akita miš, NOD miš
Animalni modeli dijabetesa tip 2		
Upotreba modela	Upotreba modela	Najčešće upotrebljavani modeli
Ispitivanje patogeneze: uloga insulinske rezistencije i/ili gojaznosti u dijabetesu tip 2	Insulinska rezistencija Oštećena glukoza tolerancija	Miševi ili pacovi hranjeni hranom bogatom mastima Lep <sup>ob/ob</sup> miševi Lepr <sup>db/db</sup> miševi Zucker dijabetični Fatty pacovi New Zeland gojazni (NZO) miševi
Ispitivanje patogeneze: uloga beta ćelijske kompenzacije	Smanjena masa beta ćelija i/ili umanjena funkcija beta ćelija	Goto Kakizaki pacovi, Neonatanlno streptozotocin u pacovima Miševi genetski manipulisani da se izmeni ključna komponenta beta ćelijske replikacije ili insulinske sekrecije
Lečenje dijabetesa tip 2	Hiperglikemija Insulinska rezistencija i oštećena beta ćelijska kompenzacija	Transgenski i <b><i>nok-aut</i></b> modeli (zavisno od mehanizma tretmana)



### Abstract

Prevention and treatment of diabetes mellitus (DM) and its complications are important for achieving the global goal, reducing premature mortality from non-communicable diseases by one-third by 2030. Regarding DM, numerous studies have been conducted over the years, mostly on animals. The goal of this research is to: perform a comprehensive analysis of data from the literature and to identify the types of animal models of diabetes mellitus; determine which type of diabetes in humans corresponds to each of the animal models; present the applied methodology in the development of each model, the mechanism of occurrence and possible advantages and disadvantages of particular methods. To find as many accessible, relevant papers as possible, the electronic databases Medline, Highwire and Hinari were searched for both the results of experimental papers (Original Article) and data from review papers (Review Article). Models of animal diabetes are: (i) induced (experimental), (ii) spontaneous and (iii) transgenic and knock-out models. In the study of pancreatic beta-cell protection, pathogenesis and prevention of DM1, the most suitable are spontaneous animal models, while chemically induced models are the most suitable in the study of DM1 therapy. In the study of DM2 treatment, transgenic and knockout models were most often used. In contrast, in the study of the role of insulin resistance and obesity in DM2, spontaneous models were most often used. An important conclusion that can be drawn is that although DM models are beneficial, there is no ideal one, so it is essential to know the advantages and disadvantages of each model.

### LITERATURA

1. Daniel Longnecker Anatomy and Histology of the Pancreas; 2014.
2. Da Silva Xavier G. The cells of the islets of Langerhans. *J Clin Med*. 2018;7(3):54.
3. Kaufman M, Nikitin AY, Sundberg JP. Histologic Basis of Mouse Endocrine System Development: A Comparative Analysis. Boca Raton: CRC Press; 2009.
4. Pantelić P, Kovač T, Ivković-Lazar T, Tešić D. Šećerna bolest i hipoglikemijski sindrom. U: Pejin D, urednik. *Interna medicina II*. Novi Sad: Futura; 2009. p.907-72.
5. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZ. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(4):228.
6. American diabetes association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2020. *Diabetes care*. 2020;43(Supplement 1):S14-31.
7. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):1-19.
8. WHO.int [www.who.int]. Geneva: [updated 2021 February; cited 2021 February 21]. Available from: [https://www.who.int/news-room/events/detail/2016/04/07/default-calendar/world-health-day-2016].
9. Al-awar A, Kupai K, Veszelka M, Sz4cs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:9051426..
10. Pantić J, Volarević V, Đukić A. Eksperimentalni modeli dijabetes melitusa. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*. 2010;12(1):29-35.
11. Dhuria RS, Singh G, Kaur A, Kaur R, Kaur T. Current status and patent prospective of animal models in diabetic research. *Adv Biomed Res*. 2015;4:117.
12. King A, Bowe J. Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol*. 2016;99:1-10.
13. Hammarström L, Hellman B, Ullberg S. On the accumulation of alloxan in the pancreatic  $\beta$ -cells. *Diabetologia* 1967;3(3):340–5.
14. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51(2):216–26.
15. Malaisse WJ. Insulin release: the receptor hypothesis. *Diabetologia*. 2014;57:1287–1290.
16. Rohilla A, Ali S. Alloxan induced diabetes: mechanisms and effects. *International journal of research in pharmaceutical and biomedical sciences*. 2012;3(2):819-823..
17. Čapo I. Uticaj gljive *Coprinus comatus* na regeneratorna svojstva Langerhansovih ostrvaca u aloksanskom dijabetesu kod pacova. [PhD dissertation on internet] Faculty of Medicine, University of Novi Sad; 2013. [cited 2021 February 26]. 113 p. Available at: <http://www.uns.ac.rs/sr/doktorske/ivanCapo/disertacija.pdf>.
18. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*. 2013;12(1):60.
19. Radha S, Vivek D, Swapnil S, Pankaj J, Sachdev Y. Experimental Models on Diabetes: A Comprehensive Review. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences*. 2013;4:1-8.
20. Furman BL. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol*. 2015;70(1):5-47
21. T. Szkudelski The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas; *Physiol Res*; 2001;50(6):537-46.
22. Manish Pal Singh, Kamla Pathak Animal models for biological screening of anti-diabetic drugs: An overview; *J. Exp. Bio*. 2015;5(5):37-48.

■ The paper was received / Rad primljen: 16.04.2021.  
Accepted / Rad prihvaćen: 23.06.2021.