



УКРАЇНА

(19) UA (11) 53327 (13) U
(51) МПК (2009)
G09B 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЗИСТЕНТНОСТІ БЕТА-КЛІТИН ПАНКРЕАТИЧНИХ ОСТРІВЦІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

1

2

(21) u201000744

(22) 26.01.2010

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.

(72) КОЛЕСНИК ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ, АБРАМОВ
АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГАНЧЕВА ОЛЬГА
ВІКТОРІВНА, ІВАНЕНКО ТАРАС ВАСИЛЬОВИЧ

(73) ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, КОЛЕСНИК ЮРІЙ МИХАЙЛОВИЧ,
АБРАМОВ АНДРІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ГАНЧЕВА
ОЛЬГА ВІКТОРІВНА, ІВАНЕНКО ТАРАС ВАСИ-
ЛЬОВИЧ

(57) Спосіб визначення резистентності бета-клітин
панкреатичних острівців підшлункової залози в
експерименті, який **відрізняється** тим, що він
включає одноразове внутрішньочеревинне вве-
діння статевозрілим щурам субдіабетогенної дози
стрептозотоцину 45 мг/кг ваги тварини, розведено-
го ex tempore в 1 мл 0,1 М цитратного буфера рН
4,5, випоювання в перший день після введення
стрептозотоцину 20 % розчину глюкози, на другий
день - 10 %, і визначення через 10 днів наступних
показників: кількості тварин, що вижили, рівня глю-
кози в хвостовій вені, концентрації інсуліну в плаз-
мі крові, різниці ваги тварини між початковою та
"фінальною" масою та загального об'єму води та

їжі, що були спожиті за 10 днів кожною твариною, і
якщо кількість тварин, що вижили, становить 75-85
%, концентрація глюкози знаходиться в діапазоні
5,5-7,5 мМоль/л, концентрація інсуліну складає
більше 1,5 мкОд/мл, вага тварин знижується на
10-15 %, загальний об'єм спожитої води збільшу-
ється на 10-15 %, об'єм їжі - знижується на 10-15
%, то визначають високу резистентність бета-
клітин у експериментальних тварин до пошкоджу-
ючого фактора стрептозотоцину, якщо кількість
тварин, що вижили, становить 65-74 %, концент-
рація глюкози знаходиться в діапазоні 7,6-12
мМоль/л, концентрація інсуліну складає 1-1,49
мкОд/мл, вага тварин знижується на 15-25 %, за-
гальний об'єм спожитої води збільшується на 15-
25 %, об'єм їжі - знижується на 15-25 %, то визна-
чають середню резистентність бета-клітин до пош-
кодуючого фактора, якщо кількість тварин, що
вижили, становить менше 64 %, концентрація глю-
кози менше 12 мМоль/л, концентрація інсуліну
менше 1 мкОд/мл, вага тварин знижується більше
ніж на 25 %, загальний об'єм спожитої води збіль-
шується більш ніж на 25 %, а об'єм їжі - знижуєть-
ся на 25 % і більше, то визначають низьку резис-
тентність бета-клітин у експериментальних тварин
до пошкоджуючого фактора.

Корисна модель стосується медицини, а саме
патологічної фізіології, і може бути застосована
для визначення резистентності бета-клітин пан-
креатичних острівців підшлункової залози до фак-
торів, що їх пошкоджують, в біології, фізіології,
фармакології з метою визначення особливостей
стану бета-клітин підшлункової залози у тварин
різних генетичних ліній, якості лікувальних препа-
ратів, що розробляються та застосовуються з ме-
тою лікування цукрового діабету та інших пору-
шень вуглеводного і жирового обміну в
експерименті.

Проблема розробки тесту резистентності бета-
клітин панкреатичних острівців підшлункової залози
до пошкоджуючого фактору антибіотику стреп-
тозотоцину є актуальною не тільки для експери-

ментальної медицини. Це пов'язано з тим, що у
світі більш 100млн. людей страждає на цукровий
діабет. Їх кількість збільшується кожні 10-15 років в
усіх країнах світу майже у два рази. Найбільшому
ризикові захворювання піддається населення країн,
що розвиваються, та групи малозабезпечених осіб
в індустріально розвинених країнах. Цукровий діабет
протікає важко, тому при недостатньому лікар-
ському контролі нерідкі гострі ускладнення. Вна-
слідок його високої поширеності, ранньої
інвалідизації й зменшення тривалості життя хво-
рих це захворювання є однією з найважливіших
медико-соціальних проблем. Тому вивчення меха-
нізмів інсулінової регуляції, етіології й патогенезу
цукрового діабету, пошук нових методів лікування
проводиться у світі дуже широко та інтенсивно.

(13) U

(11) 53327

(19) UA

Останнім часом головним завданням досліджень стає перехід від діагностики діабету до його попередження та раннього виявлення. Для цього необхідна розробка не тільки нових ефективних препаратів, що гальмують деструкцію бета-клітин, збільшують утилізацію глюкози тканинами й стимулюють секрецію інсуліну, але і нових діагностичних тест-систем, що дозволяють здійснити ранню діагностику патологічного процесу, що формується у панкреатичних островцях. Для цього необхідним враховувати особливості впливу речовин, що розробляються, безпосередньо на бета-клітини, оцінювати їхню можливість підвищувати резистентність інсуліноцитів до факторів, що їх пошкоджують. Таким чином, розробка нового тесту резистентності бета-клітин панкреатичних островців підшлункової залози до пошкоджуючого фактору є актуальним питанням сучасної медицини.

У доступній нам літературі ми не знайшли аналогів тесту резистентності бета-клітин панкреатичних островців підшлункової залози до пошкоджуючого фактору.

Пропонується спосіб визначення резистентності бета-клітин панкреатичних островців підшлункової залози в експерименті, який включає одноразове внутрішньо-черевинне введення статевозрілим щурам субдіабетогенної дози стрептозотину 45мг/кг ваги тварини, розведеного *ex tempore* в 1мл 0,1М цитратного буфера рН 4,5, випаювання в перший день після введення стрептозотину 20% розчину глюкози, на другий день - 10%, і визначення через 10 днів наступних показників: кількості тварин, що вижили, рівня глюкози в хвостовій вені, концентрації інсуліну в плазмі крові, різниці ваги тварини між початковою та "фінальною" масою, загального об'єму води та їжі, що був використаний за 10 днів кожною твариною, і якщо кількість тварин, що вижили, становить 75-85%, концентрація глюкози знаходиться в діапазоні 5,5-7,5мМоль/л, концентрація інсуліну складає більше 1,5мкОд/мл, вага тварин знижується на 10-15%, загальний об'єм спожитої води збільшується на 10-15%, об'єм їжі - знижується на 10-15%, то визначають високу резистентність бета-клітин у експериментальних тварин до пошкоджуючого фактору стрептозотину, якщо кількість тварин що вижили, становить 65-74%, концентрація глюкози знаходиться в діапазоні 7,6-12мМоль/л, концентрація інсуліну 1-1,49мкОд/мл, вага тварин знижується на 15-25%, загальний об'єм спожитої води збільшується на 15-25%, об'єм їжі - знижується на 15-25%, то визначають середню резистентність бета-клітин до пошкоджуючого фактору, якщо кількість тварин, що вижили, становить менш 64%, концентрація глюкози менше 12мМоль/л, концентрація інсуліну менше 1мкОд/мл, вага тварин знижується більше ніж на 25%, загальний об'єм спожитої води збільшується більш ніж на 25%, а об'єм їжі - знижується на 25% і більше, то визначають низьку резистентність бета-клітин у експериментальних тварин до пошкоджуючого фактору.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом полягає у такому.

Для проведення тесту ми застосовували в якості пошкоджуючого фактору стрептозотин (2-дезоксиметил-нітрозомочевина-глюкозопіраноза), який має специфічну бета-цитотоксичну дію. Нітрозосечовина, яка входить до складу стрептозотину, забезпечує токсичну дію препарату, а 2-дезоксиглюкоза - бета-цитотропність. В бета-клітинах стрептозотин викликає утворення розривів молекул ДНК, що призводить до активації процесів ядерного полі-АДФ-рибозилірування, які, в свою чергу, викликають значне зниження рівня внутрішньоклітинного НАД та загибель бета-клітини. Застосування стрептозотину є головною умовою при проведенні тесту, тому що інші пошкоджуючі фактори, наприклад, алоксан, гіпоксія, гіпертонічні розчини, не мають такої високої селективності по відношенню до бета-клітин та можуть викликати порушення функцій інших органів і систем. Так алоксан, який раніше застосовували для моделювання експериментального цукрового діабету у тварин, не має такої суворой специфічності до бета-клітин інсулярного апарату підшлункової залози та викликає токсичні зміни в нервовій та ендокринній системах.

Запропоноване нами випаювання тварин 20% та 10% розчином глюкози в перші два дні експерименту знижують загибель щурів від гіпоглікемії, що розвивається внаслідок масивної деструкції бета-клітин та надходженню в кровообіг інсуліну. Ці особливості підвищують чутливість методу та виключають помилки при врахуванні результатів експерименту. Запропоноване підрахування використаної води та їжі тваринами й контроль концентрації глюкози та інсуліну дозволяє простежити в динаміці особливості розвитку патологічного процесу у тварин, оцінити адаптаційні можливості та резерви організму, виділити суворі критерії супинів резистентності бета-клітин до пошкоджуючих факторів.

Спосіб здійснюють таким чином:

Статевозрілим щурам одноразово вранці внутрішньочеревинно вводять субдіабетогенну дозу стрептозотину - 45мг/кг ваги тварини розведеного *ex tempore* в 1мл ОДМ цитратного буфера рН 4,5. З метою запобігання розвитку гіпоглікемії в перший день введення стрептозотину тваринам дають 20% розчин глюкози, на другий день - 10% розчин глюкози. На 10 день, після введення стрептозотину у експериментальних тварин визначають наступні показники: підраховують кількості тварин, що вижили, визначають рівень глюкози в хвостовій вені; концентрацію інсуліну в плазмі крові, різницю ваги тварини між початковою та "фінальною" масою, загальний об'єм води та їжі, що був використаний за 10 днів кожною твариною. За результатами дослідження, враховуючи всі вище зазначені показники, тварин розподіляють на три групи: низько резистентні, тварини із середньою резистентністю та високорезистентні тварини. Якщо через 10 днів після введення стрептозотину кількість тварин що вижили, в експериментальній групі становить 75-85%, концентрація глюкози знаходиться в діапазоні 5,5-7,5мМоль/л, концентрація інсуліну більше 1,5мкОд/мл, вага тварин знижується на 10-15%, загальний об'єм спожитої води збі-

льшується на 10-15%, об'єм їжі знижується на 10-15%, то визначають високу резистентність бета-клітин у експериментальних тварин до пошкоджуючого фактору. Якщо кількість тварин, що вижили, в експериментальній групі становить 65-74%, концентрація глюкози знаходиться в діапазоні 7,6-12мМоль/л, концентрація інсуліну 1-1,49мкОд/мл, вага тварин знижується на 15-25%, загальний об'єм спожитої води збільшується на 15-25%, об'єм їжі знижується на 15-25%, то визначають середню резистентність бета-клітин у експериментальних тварин до пошкоджуючого фактору стрептозотину. Якщо кількість тварин, що вижили, в експериментальній групі становить менш 64%, концентрація глюкози менше 12мМоль/л, концентрація інсуліну менше 1мкОд/мл, вага тварин знижується більше ніж на 25%, загальний об'єм спожитої води збільшується більш ніж на 25%, а об'єм їжі знижується на 25% і більше, то визначають низьку резистентність бета-клітин у експериментальних тварин до пошкоджуючого фактору.

Приклад.

Експериментальна група щурів була сформована із 30 статевозрілих щурів-самців лінії Вістар, віком 6-11 місяців, вагою 270-300г. Тварини розміщувалися поодиночці в клітках при вільному доступі до води та їжі. В кожній клітці була індивідуальна мірна "поїлка" та кормушка для щодобового урахування спожитої води та їжі. До початку експерименту кожну тварину зважували та вимірювали рівень глюкози в хвостовій вені глюкооксидазним методом, який в середньому становив $4,2-5,1 \pm 0,25$ мМоль/л, імуноферментним методом досліджували рівень інсуліну в плазмі крові, який в середньому становив $1,81 \pm 0,04$ мкОд/мл. В перший день дослідження о восьмій годині ранку, після 12 годинного голодування шурам одноразово, внутрішньочеревинно ввели стрептозотин в дозі 45мг/кг ваги тварини розведеного ex tempore в 1мл

0,1М цитратного буфера рН 4,5. Після введення стрептозотину тварин розмістили поодиночці кожну в окремій клітці при вільному доступі до води та їжі, та випаювали в перший день 20% розчин глюкози, на другий день - 10%. Протягом десяти днів враховували щоденний спожитий об'єм води та їжі. Через 10 днів після введення стрептозотину підраховували кількість тварин, що вижили, визначають рівень глюкози в хвостовій вені; концентрацію інсуліну в плазмі крові, різницю ваги тварини між початковою та "фінальною" масою, загальний об'єм води та їжі, що був використаний за 10 днів кожною твариною. За результатами дослідження були встановлені діагностичні критерії та розподілені групи тварин за ступенем резистентності їх бета-клітин панкреатичних острівців підшлункової залози до пошкоджуючого фактору стрептозотину. Першу групу склали тварини з високою резистентністю бета-клітин до пошкоджуючого фактору. В цій групі кількість тварин, що вижили, становила 78%, концентрація глюкози $6,9 \pm 0,3$ мМоль/л, концентрація інсуліну $1,58 \pm 0,09$ мкОд/мл, вага тварин знижувалась на 12,5%, загальний об'єм спожитої води збільшувався на 14%, об'єм спожитої їжі знижувався на 13%. В другій групі із середньою резистентністю кількість тварин, що вижили, становила 69%, концентрація глюкози - $10,2 \pm 0,7$ мМоль/л, концентрація інсуліну $1,22 \pm 0,06$ мкОд/мл, вага тварин знижувалась на 21%, загальний об'єм спожитої води збільшувався на 17%, об'єм спожитої їжі знижувався на 20%. В третій групі тварин з низькою резистентністю кількість щурів що вижили, становила 61%, концентрація глюкози - $13,6 \pm 0,12$ мМоль/л, концентрація інсуліну $0,92 \pm 0,05$ мкОд/мл, вага тварин знижувалась на 28%, загальний об'єм спожитої води збільшувався на 29%, а об'єм їжі - знижувався на 26,5%.