



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 53435

(13) A

(51) 7 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

1

2

(21) 2002054274

(22) 24 05 2002

(24) 15 01 2003

(46) 15 01 2003, Бюл. №1, 2003р

(72) Ефімов Дмитро Андрійович, Тронько Микола
Дмитрович

(73) Інститут ендокринології та обміну речовин ім

В. П. Комісаренка Академії медичних наук України
(57) Спосіб моделювання цукрового діабету шляхом застосування антибіотика, який відрізняється тим, що використовують антрацикліновий антибіотик адриаміцин в дозі 2 - 4 мг/кг маси тіла тварин підшкірно, впродовж 5 днів

Винахід відноситься до експериментальної медицини, а зокрема - вивчення етіології та патогенезу цукрового діабету (ЦД) і може використовуватися в експериментальній фармакології, біохімії, фізіології і патофізіології.

Відомі способи моделювання ЦД шляхом введення в організм піддослідних тварин глібенкламіду, високих доз інсуліну або ж букарбану [АС №1439659 СССР, МКИ G09B 23/28, 1988, АС №1624511 СССР, МКИ G09B 23/28, 1991, АС №1802330 СССР, МКИ G01N 33/50, 1993].

Загальноприйнятим методом є моделювання ЦД за допомогою алоксану [Соколоверова И. М. Роль возрастного фактора в патогенезе експериментального/аллоксанового/ діабета - «Проблемы эндокринологии», 1958, №2, с. 3].

Однак всі ці способи мають недоліки - недостатньо точні як моделі, розвивається швидко стійка клінічна картина захворювання, що не дозволяє використовувати ці моделі для визначення механізмів розвитку ЦД та його стадій.

За прототип взятий спосіб моделювання ЦД за допомогою антибіотика стрептозоточина. Стрептозоточин застосовується в онкологічній практиці і викликає побічну дію, яка виражається розвитком гіперглікемічного стану.

На основі цього явища виник метод моделювання ЦД, який заключається у введенні стрептозоточину піддослідним тваринам-щуркам внутрішньовеново, 4 дні підряд в загальній дозі 160 мг/кг. Виявлена на 7 день гіперглікемія свідчить про розвиток діабетичного синдрому [Панков Ю. А. и др. Гипоинсулинемия, гипергликемия и циркулирующие антитела в островковых клетках при развитии стрептозоточинового диабета у крыс // Проблемы эндокринологии, 1990, №2, С. 70 - 72].

Однак і цей спосіб має недоліки - значна доза антибіотика шкідливо впливає на піддослідних тварин та може спричинити як неточність моделі, так і смерть тварин.

В основу даного винаходу поставлено задачу розробити такий спосіб моделювання цукрового діабету, в якому б за рахунок застосування препарату адриаміцин покращилась ефективність моделювання, тобто підвищилась точність моделі. Спосіб дозволяє досягти відтворення всіх стадій захворювання на одній тварині.

Поставлена задача досягається тим, що в спосіб моделювання цукрового діабету, який заключається в застосуванні антибіотика, відповідно винаходу, використовують антрацикліновий антибіотик адриаміцин в дозі 2 - 4 мг/кг маси тіла тварин підшкірно впродовж 5 днів.

Експериментальні дослідження виконувались на білих щурах-самцях лінії Вістар, які знаходились на стандартному раціоні годування виварія. Для порівняння були взяті дві вікові групи дорослі (зрілі) - 7 - 8 місяців та старі 24 - 28 місяців, маса дорослих тварин 300 - 400 г, старих - 450 - 650 г.

Експериментальний діабет викликали шляхом введення антрациклінового антибіотика адриаміцина в дозі 2 - 4 мг/кг маси тіла тварин підшкірно впродовж 5-ти днів. Щоб запобігти розвитку шкіряних виразок та некрозів ін'єкції проводили кожен день в альтернативні місця задніх лап. Контрольні щури отримували еквівалентні кількості 0,9% розчину NaCl підшкірно протягом 5 днів. Для виявлення β-цитотоксичної дії адриаміцину та ранньої діагностики порушення толерантності до вуглеводів визначали показаний глікемію через 2, 4, 6 і 24 години і в наступному через кожні 24 години. Рівень глікемії визначали в крові під'язичної вени

(13) A

(11) 53435

(19) UA

щурів за допомогою реактивних індикаторних смужок Dextrostix(США) на глюкометрі Dextrometer(США) Для визначення в сироватці крові інсуліну використовували радіоімуннологічні набори РІО-ІНС-ПГ-125'

При введенні щурям адриаміцину в дозі 2мг/кг рівень глікемії піднімався у дорослих в 72% випадків, у старих - в 86,5% випадків Збільшення дози адриаміцину до 4мг/кг супроводжувалось розвитком діабету у 81% дорослих тварин та в 91,7% - у старих При введенні адриаміцину наступали виражені зміни вмісту інсуліна Так, у дорослих тварин після 5-денного введення адриаміцину вміст інсуліну в крові знижувався на 59%, у старих - на 72,6%, тобто проявилися всі ознаки інсулінової недостатності Після розвитку стійкого ЦД щурів декаптували та досліджували морфологічні зміни в підшлунковій залозі

Таким чином, вперше доведено, що антрацикліновий антибіотик адриаміцин виявляє діабетогенну дію, доведено вплив адриаміцину на рівень глікемії та ІРІ у віковому аспекті щурів Підібрані дози адриаміцину від 2 - 4мг/кг є оптимальними, викликають поступове збільшення глікемії впродовж 5 днів введення та не впливають шкідливо на щурів, що значно зменшує "відсів" тварин Застосування різних доз адриаміцину(від 2 до 4мг/кг) дає можливість створити модель діабету різної тяжкості легкої, середньої та тяжкої

За прототипом стрептозотоцин вводили щурям впродовж 4 днів внутрічревно(загальна доза 160мг/кг) Гіперглікемія та гіпоінсулінемія виявлялась тільки на 7 день і трималась до 18 дня

Помірний діабетичний синдром на 24 добу переходив в більш тяжку стадію діабету

За нашим винаходом - гіперглікемія поступово наростала починаючи уже з 4-ї години після ін'єкції та паралельно знижувався рівень інсуліну в крові,

що свідчить про більш точне моделювання ЦД Спосіб простий за виконанням та прискорює створення моделі

Приклад 1 18 щурям-самцям з масою тіла 300 - 400г(дорослі) вводили адриаміцин в дозі 2мг/кг маси тіла в розчині води для ін'єкцій в об'ємі 0,05мл підшкірно в задню лапу Через 2 години після ін'єкції в крові взятої із під'язичної вени визначали рівень глікемії Виявлено, що він збільшувався на 6,7%, через 4 і 6 годин - на 8,9% Через добу показники глікемії збільшувались уже на 33,3%, на 3-ю добу - на 44,4%, на 4-ту - 48,9%, на 5-ту - 66,7%, в порівнянні з контролем Більш значний підйом показників глікемії спостерігався у 11 дорослих щурів при введенні їм адриаміцину в дозі 4мг/кг маси тіла через 2 години - на 5,1% Починаючи з 4 години після ін'єкції показники глікемії збільшувались на 44,8%, через 24 години - на 65,9% На третю добу - перевищували контрольні цифри уже на 89,2%, на 4-у - на 93,9%, на 5-у - більше 100% Ці дані представлені у таблиці 2

В той же час вміст інсуліну знижувався на 59%(таблиця 1)

Підтвердження розвитку діабету є морфологічні дослідження підшлункової залози При рівнях глікемії 10,8 - 14,4ммоль/л(щурі №6 та №9) спостерігається зменшення розмірів островців Лангерганса і признаки дегрануляції β-інсулоцитів У деяких тварин визначаються островці, які складаються з 5 -20 клітин Дегранульовані β-клітини розташовуються, в основному, по периферії островців Лангерганса В цитоплазмі деяких з них, в біля ядерної зони, відмічаються лише сліди слабого дифузного окрашування При цьому межі клітин нечіткі, вакуолізовані, перетрощовані і пікнотичні одиничні клітини

Спосіб моделювання цукрового діабету

Таблиця 1

Вікові особливості змін вмісту гормонів в крові щурів під впливом адриаміцину

Гормони	Дорослі		Старі	
	Контроль	Адриаміцин	Контроль	Адриаміцин
Інсулін пмоль/л	215	88	178	48 87
	n = 14	n = 67	n = 16	n = 48
		p < 0 001		p < 0 001
Тироксин нмоль/л	62 3	191	80 3	77 2
	n = 13	n = 27	n = 10	n = 25
		p < 0 001		p > 0 05
Тестостерон нмоль/л	3 3	2 77	1 1	1 485
	n = 17	n = 17	n = 38	n = 18
		p > 0 05		p > 0 05

Примітка p - порівняння з контролем

Приклад 2 9 щурям-самцям(старі) з масою тіла 450 - 650г вводили адриаміцин в дозі 2мг/кг маси тіла в розчині води для ін'єкцій в об'ємі 0,05мл підшкірно в задню лапу Через 2 години після ін'єкції рівень глікемії збільшився на 38,7%, через 4 години - на 46,9%, через 6 годин - на 59,4% На третю добу після введення адриаміцину показники глікемії перевищували контрольні цифри на 86,6%, на 4-ту добу - на 88,9% і на 5-ту добу - на 93,7%

Більш високі цифри глікемії були отримані у 11 старих щурів при введенні їм адриаміцину в дозі 4мг/кг Через 2 години після ін'єкції рівень глікемії перевищував контрольні цифри на 48,3%, через 4 години - на 53,6%, через 24 години - на 72,2% На 3-тю і 4-ту добу збільшення глікемії було ще більш вираженим(на 89,8% і 95,8% відповідно) На 5-ту добу показники глікемії перевищували контрольні цифри на 100%

Вміст інсуліну у старих щурів знизився на

72,6%(таблиця 2)

Гістологічні дослідження показали, що ступінь виявлення дистрофічних змін в підшлунковій залозі піддослідних тварин залежить від рівня гікемії. Так, у щура №7(глюкоза - 14ммоль/л) найбільш виражено зменшення об'єму інсулярної тканини. В невеличких острівцях Лангерганса, хоча і визначаються β -інсулоцити з інтенсивно окрашеною цитоплазмою, однак розміри клітин і їх ядер в декілька раз менші, ніж в контролі. У цього щура дистрофічні і деструктивні зміни зачіпають і екзок-

ринну тканину. В ацинарній тканині, особливо на периферії залози, спостерігається відсутність типового малюнку. Відбувається порушення цілості апікальних мембран панкреатичних клітин. Визначаються групи клітин з признаками каріореєкса і каріоліза. Ацинарні клітини місцями вакуолізуються, межі їх стираються, з'являються без'ядерні зони. Міждолькові з'єднувальнотканинні перегородки місцями недостатньо виражені.

Спосіб моделювання цукрового діабету

Таблиця 2

Зміни рівня глюкози крові у дорослих і старих щурів при введенні антрациклінового антибіотика адриаміцина

Вік тварин	Доза ADR	Контр оль	Після введення адриаміцина через						
			2год	4год	6 годин	2 день	3 день	4 день	5 день
Дорослі	I	4,5	4,8	4,9	4,9	6,0	6,5	6,7	7,5
		n = 23	18	18	18	18	18	18	18
		p	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	II	4,28	4,5	6,2	6,2	7,1	8,1	8,3	9,7
		n = 15	11	11	11	11	11	11	11
		p	> 0,05	= 0,005	= 0,005	= 0,005	= 0,005	< 0,005	< 0,001
Старі	I	3,15	4,37	4,63	5,18	5,02	5,98	6,17	6,31
		n = 13	9	9	9	9	9	9	9
		p	< 0,05	= 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	II	4,18	6,2	6,42	6,36	7,2	7,8	7,9	8,1
		n = 15	8	8	8	8	8	8	8
		p	= 0,005	= 0,005	= 0,005	= 0,005	< 0,005	< 0,001	< 0,001

Примітка: p - порівняння з контролем, I - адриаміцин в дозі 2мг/кг, II - адриаміцин в дозі 4мг/кг, глюкоза - в ммоль/л

Таким чином, введення тваринам адриаміцину супроводжується підвищенням рівня глюкози крові, різким зниженням концентрації інсуліну у обох

вікових групах та гістологічними змінами зі сторони підшлункової залози.

Спосіб дозволяє з високою вірогідністю відтворювати всі стадії розвитку цукрового діабету та пришвидшує створення моделі.