



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38466** (13) **U**
(51) МПК
G09B 23/28 (2008.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ У ЩУРІВ**

1

2

(21) u200810259

(22) 11.08.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) ГЛАДКИХ ОЛЕКСАНДР ІВАНОВИЧ, UA, ПОЛТОРАК ВІКТОРІЯ ВІТАЛІЙВНА, UA, КРАСОВА НАТАЛІЯ СЕРГІЙВНА, UA, ЛЕЩЕНКО ЖАНА АНАТОЛІЙВНА, UA, ФЕДОРОВА ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА, UA

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИ-

ЛЕВСЬКОГО" АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA

(57) Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів шляхом комбінованого впливу високожирової дієти та хімічного агента, який **відрізняється** тим, що статевозрілих самців-щурів лінії Вістар утримують на високожировій дієті протягом чотирьох тижнів, після чого роблять внутрішньочеревну ін'єкцію розчину стрептозоцину у цитратному буфері у дозі 40мг/кг маси тіла.

Корисна модель відноситься до біології, експериментальної медицини та експериментальної фармакології і може бути використана при оцінці біологічних ефектів нових лікарських засобів для корекції проявів цукрового діабету та метаболічного синдрому.

Відомо, що кількість хворих на цукровий діабет (ЦД) в усьому світі неухильно зростає завдяки збільшенню популяції, підвищенню тривалості життя, урбанізації та розповсюдженості ожиріння й гіподинамії. Так, передбачена загальна кількість хворих на ЦД у 2030 році складає 366млн. осіб, порівняно з 171млн. у 2000 році. Близько 90-95% від цієї кількості - хворі на ЦД 2 типу [1-3]. Провідною ланкою розвитку останнього є так званий західний спосіб життя, а саме, високожирова дієта, куріння та недостатність фізичних навантажень [4], що, у свою чергу, складає кластер чинників ризику розвитку ішемічної хвороби серця - головної причини смертності в більшості розвинутих країн світу [5, 6].

На сьогодні для моделювання інсулінорезистентних станів та власно ЦД 2 типу використовуються два основних підходи - генетичні моделі та моделі, індуковані факторами довкілля. Найчастіше в експериментальних дослідженнях механізмів розвитку ЦД 2 типу та для первинної оцінки ефективності антидіабетичних агентів використовують гризунів.

Генетичні моделі інсулінорезистентності та/або гіперглікемії більшою мірою використовують для вивчення діабетичних фенотипів, оскільки

перші супроводжуються ожирінням та дисліпідемією. До цієї групи належать класичні моделі з використанням лінійних тварин з генетично детермінованим розвитком інсулінорезистентності та/або ЦД 2 типу: миші ліній ob/ob та db/db, щури ліній Obese Zucker Fatty (Fa/fa) та Zucker Diabetic Fatty (ZDF), миші ліній KK та KKA^y. Окрім цього, використовують трансгенних або нокаутних за конкретними генами тварин з метою дослідження функції цих генів та відокремлення фактору довкілля у розвитку патологічного стану [7]. Але усім цим моделям притаманна висока вартість, а для генно-інженерних моделей потрібна наявність високотехнологічного обладнання та кваліфікованого персоналу.

Виходячи з багатокомпонентності ЦД 2 типу у людини (інсулінорезистентність, гіпер- або гіпоінсулінемія, гіперглікемія, дисліпідемія та ін.), його моделювання факторами навколишнього середовища у тварин потребує комплексного підходу, що базується як на немедикаментозних методах впливу (дієта), так і на застосуванні хімічних засобів, цитотоксичних для панкреатичних бета-клітин, або таких, що порушують чутливість периферичних тканин до інсуліну. Враховуючи провідну роль інсулінорезистентності в маніфестації ЦД 2 типу, більшість експериментальних моделей останнього базуються саме на відтворенні цього патологічного стану. Найпоширеного використання знайшли моделі, індуковані хронічним пероральним введенням фруктози, сахарози, жиру або глюкозаміну як поодиночі, так і у різних комбінаціях, щурам та

(13) **U**(11) **38466**(19) **UA**

признам інших видів (миші, Сирійські хом'ячки, *Psammomus obesus* та ін.) [7].

Із хімічних сполук найчастіше застосовують алоксан, дитизон та стрептозотин для відтворення гіперглікемії, та глюкокортикоїди (дексаметазон) - для моделювання інсулінорезистентності [8].

Але використання вищезначених моделей не завжди задовольняє вимогам експериментальних ендокринологів та фармакологів, оскільки дозволяє відтворити тільки окремі ланки патогенетичного процесу. В зв'язку з цим з'являються моделі з комбінацією чинників: дієтичний вплив + хімічний агент. Найбільш наближеною до патогенезу та метаболічних характеристик ЦД 2 типу у людини моделлю такого типу натеper є модель вживання протягом 2 тижнів високожирової дієти (40% загального калоража за рахунок жирів) з наступною внутрішньовенною ін'єкцією стрептозотину (40мг/кг маси тіла) для відтворення гіперглікемічного стану у поєднанні з ожирінням та дисліпідемією у 7-тижневих щурів-самців лінії Sprague-Dawley [9]. Однак використання вищезазначеної моделі в Україні є проблематичним у зв'язку з відсутністю тварин цієї лінії в розплідниках науково-дослідних та господарчих установ країни.

Задача винаходу - розробка оптимізованого способу моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів.

Поставлена задача вирішується тим, що статевозрілих самців-щурів лінії Вістар утримують на високожировій дієті (40% загального калоража за рахунок насичених жирів) протягом чотирьох тижнів, після чого роблять внутрішньочеревну ін'єкцію розчину стрептозотину у цитратному буфері (рН 4,5) у дозі 40мг/кг маси тіла.

Технічний результат - розширення арсеналу експериментальних моделей для відтворення провідних патогенетичних ланок цукрового діабету 2 типу.

Спосіб апробовано на 6 статевозрілих (4-місячних) самцях-щурах лінії Вістар. Моделювання ЦД 2 типу проводили шляхом введення низької дози стрептозотину (40мг/кг внутрішньочеревно, на цитратному буфері рН 4,5) після 4-х тижневого утримання тварин на високожировому раціоні харчування (дієта з надмірним вмістом насичених жирів, 40% загального калоража), з вільним доступом до води та природною зміною режиму освітлення, температура та вологість повітря - за стандартами віварію. Контрольна група тварин відповідної статі та віку споживала стандартне харчування (10% загального калоража за рахунок жирів) та утримувалася в аналогічних умовах.

Стан глюкозного гомеостазу оцінювали в різні терміни після відтворення моделі (7, 14 та 21 добу) за показниками базальної глікемії та внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3г на кг маси тіла). Площину під глікемічними кривими (ППК) при проведенні ВЧТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Mathlab". Коефіцієнт чутливості до інсуліну розраховували за допомогою інсулінового тесту (0,2Од/кг маси тіла підшкірно) [10]. Оцінювали динаміку ваги тварин протягом експерименту. Концентрацію неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) в сироватці крові оцінювали фотокolorиметрично [11], рівень тригліцеридів - спектрофотометричним методом [12]. Цифровий матеріал обробляли статистично з використанням параметричного критерію Ст'юдента [13].

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що через 1 тиждень після ін'єкції стрептозотину у тварин експериментальної групи спостерігалася базальна гіперглікемія та глюкозна інтолерантність, підтвердження чому є підвищення показників площини під відповідними глікемічними кривими при проведенні навантажувального тесту з глюкозою (табл. 1).

Таблиця 1

Показники глюкозного гомеостазу у щурів з цукровим діабетом 2 типу, ($\bar{X} \pm S_x$)

Група тварин	n	Показники після відтворення моделі через...			
		7 діб		21 добу	
		Базальна глікемія, ммоль/л	ППК, ммоль/л/хв	Базальна глікемія, ммоль/л	ППК, ммоль/л/хв
Інтактний контроль	5	3,87±0,15	588,33±23,81	4,04±0,11	625,44±16,56
Діабет	6	10,90±0,40 P<0,001	1954,0±56,95 P<0,001	13,42±0,38 P<0,001	2092,25±60,48 P<0,001

Примітка: P - відхилення відносно показників групи "Інтактний контроль".

Слід відзначити, що виявлені порушення глюкозного гомеостазу зберігалися через 21 добу після моделювання діабету, що свідчить про відсутність їх спонтанної нормалізації та підтверджує перспективність використання цієї моделі для дослідження терапевтичних ефектів антидіабетичних лікарських засобів.

Відомо, що підвищений рівень НЕЖК пригнічує утилізацію глюкози периферичними тканинами і сприяє розвитку інсулінорезистентності [14].

У результаті проведених досліджень було встановлено, що моделювання ЦД 2 типу призводило до вірогідного зростання концентрації НЕЖК та виразного зниження коефіцієнта чутливості до інсуліну (табл. 2). Слід зазначити, що рівень тригліцеридів - ознака діабетичної дисліпідемії та ме-

таболічного синдрому, також суттєво підвищував-

ся у тварин групи «Діабет».

Таблиця 2

Показники ліпідного обміну та чутливості до інсуліну у щурів з цукровим діабетом 2 типу, ($\bar{X} \pm Sx$)

Група тварин	n	Тригліцериди, ммоль/л	НЕЖК, ммоль/л	Коефіцієнт чутливості до інсуліну
Інтактний контроль	5	1,92 \pm 0,21	0,37 \pm 0,04	32,73 \pm 1,76
Діабет	6	3,67 \pm 0,20 P<0,001	1,41 \pm 0,13 P<0,001	1,80 \pm 1,76 P<0,001

Примітка: P - відхилення відносно показників групи "Інтактний контроль".

Як відомо, дисліпідемії безпосередньо пов'язані з ожирінням. У тварин з експериментально відтвореною патологією спостерігалось значно більше підвищення маси тіла, індуковане високо-

жировою дієтою протягом дослідження, що може надати додаткові переваги розробленій моделі (табл. 3).

Таблиця 3

Приріст маси тіла щурів з цукровим діабетом 2 типу по відношенню до вихідного рівня, ($\bar{X} \pm Sx$)

Група тварин	n	Вихідний рівень, г	Приріст маси тіла після відтворення моделі через..., %			
			0 діб	7 діб	14 діб	21 добу
Інтактний контроль	5	90,2 \pm 1,3	55,0 \pm 4,2	59,2 \pm 4,2	76,4 \pm 2,1	90,1 \pm 4,3
Діабет	6	88,0 \pm 0,9	133,7 \pm 8,9 P<0,001	121,3 \pm 8,1 P<0,001	148,4 \pm 8,0 P<0,001	160,3 \pm 8,9 P<0,001

Примітка: P - відхилення відносно показників групи "Інтактний контроль".

Таким чином, у тварин експериментальної групи спостерігалися ключові складові, притаманні ЦД 2 типу, а саме, базальна гіперглікемія, глюкозна інтолерантність, інсулінорезистентність, дисліпідемія (гіпертригліцеридемія, підвищення НЕЖК) та збільшена вага у порівнянні до інтактних тварин контрольної групи.

Проведені дослідження свідчать про наявність у відтвореній моделі провідних патогенетичних ланок цукрового діабету 2 типу, що в поєднанні з ожирінням у експериментальних тварин обґрунтовує перспективність її застосування в дослідженнях ефективності нових лікарських засобів, спрямованих на корекцію метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу у людини.

Використана література

1. Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030 [Text] /S. Wild, G. Roglic, A. Green [et al.] //Diabetes Care. - 2004. - Vol. 27. - P.1047-1053.

2. American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for Clinical Practice for the Management of Diabetes Mellitus: AACE Diabetes Mellitus Clinical Practice Guidelines Task Force [Text] //Endocrine Practice. - 2007. - Vol. 13,(Suppl. 1). - P.3-66.

3. Zimmet, P. Preventing Type 2 diabetes and the dysmetabolic syndrome in the real world: a realistic view [Text] / P. Zimmet, J. Shaw, K. G. Alberti //Diabetic Medicine. - 2003. - Vol. 20, № 3. - P. 693 - 702.

4. Seidell, J.C. Obesity, insulin resistance and diabetes - a worldwide epidemic [Text] /J.C. Seidell //British J. Nutrition. - 2000. - Vol. 83, Suppl. 1. - P.S5-S8.

5. INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study [Text] /S. Yusuf, S. Hawken, S. Ounpuu [et al.] //Lancet. - 2004. - Vol. 364. - P.937-952.7

6. Haffner, S. M. Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes [Text] /S.M. Haffner //Obesity. - 2006. - Vol. 14, Suppl.3. - P.121S-127S.

7. Ross, S. A. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes [Text] /S. A. Ross, E. A. Gulve, M. Wang //Chem. Rev. - 2004. - Vol. 104. - P.1255-1282.

8. Экспериментальное моделирование сахарного диабета для изучения специфического эффекта новых антидиабетических веществ [Текст]: метод, рекомендации /М-во здравоохранения УССР, Академия мед. наук; [авт. В.В. Полтораки др.]. - X., 1991. - 20с.

9. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [Text] /M. J. Reed, K. Meszaros, L. J. Entes [et al.] //Metabolism. - 2000. - Vol. 49, №11. - P.1390-1394.

10. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with euglycaemic clamp [Text] /A. Akinmokun, P. Selby, K. Ramaiya [et al.] //Diabet. Med. - 1992. - Vol. 9, №5. - P.432-437.

11. Dumcombe, W. C. The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids [Text] /W. C. Dumcombe //Biochem. J. - 1963. - Vol. 188, №1. - P.7-10.

12. Прохорова, Н.И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену [Текст]: Учебное пособие /Н.И. Прохорова, З.И. Тупикова //М.: Изд-во Ленингр. ун-та; 1965. - С.168.

13. Атраментова, Л. О. Статистичні методи в біології : Підручник /Л.О. Атраментова, О.М. Утєвська //Х.: [б. в.], 2007. - 288с.

14. Cahova, M. Glucose-Fatty acid interaction in skeletal muscle and adipose tissue in insulin resistance [Text] /M. Cahova, H. Vavrinkova, L. Kazdova //Physiol. Res. - 2007. - Vol. 56. - P.1-15.