



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53262** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G09B 23/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КОМБІНОВАНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ У ЩУРІВ**

1

2

(21) u201005316

(22) 30.04.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

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

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

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ" (ДУ ІПЕП)

(57) Спосіб комбінованого моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів шляхом впливу високожирової дієти та хімічного агента, який **відрізняється** тим, що статевозрілих самців-щурів лінії Вістар утримують на високожировому раціоні харчування протягом 35 діб, а починаючи з 25 доби, протягом 11 діб роблять внутрішньочеревні ін'єкції розчину дексаметазону у дозі 1 мг/кг маси тіла.

Корисна модель відноситься до біології, експериментальної ендокринології та фармакології і може бути використана при оцінці біологічних ефектів нових лікарських засобів для корекції проявів цукрового діабету 2 типу та його ускладнень.

Згідно даних ВООЗ на тепер більш ніж 246 млн. осіб в усьому світі, страждають на цукровий діабет (ЦД), а до 2025 року їх загальна кількість зросте до 380 млн., що. буде становити 7,1 % від усього дорослого населення планети [1]. Більшість від цієї кількості (90-95 %) складають хворі на ЦД 2 типу. Загальновізнано, що в патогенезі цукрового діабету приймають участь дві групи факторів: внутрішні (генетичні), які обумовлюють схильність до розвитку цукрового діабету, та зовнішні, що реалізують цю спадкову схильність. До останніх відносять так званий західний спосіб життя, а саме, високожирова дієта, куріння та недостатність фізичних навантажень [2].

ЦД 2 типу являє собою складне полігенне захворювання, патогенетичне, підґрунтя якого складають головним чином інсулінорезистентність та дисфункція бета-клітин підшлункової залози [3].

На тепер існує декілька різновидів експериментальних моделей, що в тій, або іншій мірі відображають багатокomпонентність ЦД 2 типу у людини на різних стадіях його спонтанної еволюції (інсулінорезистентність, гіпер- або гіпоінсулінемія, гіперглікемія, дисліпідемія та ін.):

- спонтанний або генетично детермінований діабет - миші ліній ob/ob, db/db, KK, KK/A^y, NZO, TSOD, GK, Cohen diabetic та інш., щури ліній Zucker fatty, ZDF, SHR/N-cp, JCR/LA-cp, OLETF та мавпи Obese rhesus;

- діабет індукований дієтою - хронічне пероральне введення фруктози, сахарози, жиру або глюкозаміну у різних комбінаціях щурам Sand, мишам C57/BL 6J та Spiny, Сирійським хом'ячком, Psammomus obesus та ін.;

- діабет індукований хімічними сполуками - низькі дози алоксану, дитизону, глюкокортикоїдів та стрептозотоцину дорослим щурам, мишам та інш.;

- діабет індукований хірургічним втручанням - часткова панкреатектомія щурів, собак, приматів та свиней;

- трансгенні або нокаутні за конкретними генами тварини - миші нокаутні за генами, що кодують білок USP1, інсулін рецепторні субстрати 1 і 2 (IRS-1, IRS-2), глюкозний транспортер-4 (GLUT-4), фосфотирозинфосфатазу та інш. [4].

Крім того, для досягнення більшої відповідності перебігу ЦД 2 типу у людини досить часто в експериментальних дослідженнях використовують комбінації різних типів моделей даного захворювання, наприклад, генетичної схильності або впливу хімічного агента з дієтою [5].

Однією з найбільш наближених до патогенезу та метаболічних характеристик ЦД 2 типу у людини є модель, яка полягає у вживанні протягом 2 тижнів високожирової дієти (40 % загального калоража за рахунок жирів) з наступною внутрішньовенною ін'єкцією стрептозотоцину (40 мг/кг маси тіла) 7-тижневим щурам-самцям лінії Sprague-Dawley [6]. Але, зважаючи на відсутність тварин цієї лінії в розплідниках науково-дослідних та господарчих установ України, використання вищезазначеної моделі є проблематичним. Ще одна модель, яка максимально відтворює основні ланки

(13) **U**(11) **53262**(19) **UA**

патогенезу ЦД 2 типу та є більш прийнятною для вітчизняних дослідників (оскільки використовуються щури лінії Вістар), здійснюється шляхом утримання статевозрілих самців-щурів лінії Вістар на високожировій дієті (40 % загального калоража за рахунок насичених жирів) протягом чотирьох тижнів, з наступною внутрішньочеревною ін'єкцією розчину стрептозотоцину в дозі 40 мг/кг маси тіла [7]. Але використання цієї моделі обмежується високою вартістю стрептозотоцину :

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

Поставлена задача вирішується тим, що статевозрілих самців-щурів лінії Вістар утримують на високожировій дієті (50 % загального калоража за рахунок насичених жирів) протягом 35 діб. Починаючи з 25 доби, протягом 11 діб роблять внутрішньочеревні ін'єкції розчину дексаметазону у дозі 1 мг/кг маси тіла.

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

Спосіб апробовано на 5 статевозрілих (6-місячних) самців-щурах лінії Вістар. Моделювання ЦД 2 типу проводили шляхом внутрішньочеревного введення дексаметазону (фірма «KRKA», Словенія) в дозі 1 мг/кг маси тіла . протягом 11 діб, починаючи з 25 доби 35 добового утримання тварин на високожировому раціоні харчування (дієта з надмірним вмістом насичених жирів: білки – 15 %, жири – 50 %, вуглеводи – 35 %) [8], з вільним доступом до води та природною зміною режиму освітлення, температура та вологість повітря - за стандартами віварію. Контрольна група з 5 тварин

відповідної статі та віку споживала стандартне харчування (білки - 15 %, жири - 5 %, вуглеводи - 80 %) [9] та утримувалася в аналогічних умовах.

Стан глюкозного гомеостазу оцінювали в різні терміни відтворення моделі (21 та 35 доба) за показниками базальної глікемії та внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г/кг маси тіла). Площину під глікемічними кривими (ППК) при проведенні ВЧТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Mathlab". Чутливість до інсуліну оцінювали за допомогою тесту толерантності до інсуліну, який дозволяє в динаміці оцінити чутливість печінки та периферичних тканин до дії інсуліну, враховуючи гальмування продукції глюкози в печінці та підвищення утилізації глюкози м'язами внаслідок ефекту гормону. Чутливість до інсуліну визначали, розраховуючи відсоток зниження базальної глікемії через 30 хвилин після внутрішньочеревного введення гормону тваринам натще (0,2 Од/кг маси тіла) [10]. Оцінювали динаміку ваги тварин протягом експерименту. Рівень неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) та тригліцеридів в сироватці крові оцінювали спектрофотометричним методом [11, 12]. Цифровий матеріал обробляли статистично з використанням параметричного критерію Ст'юдента [13].

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що через 35 діб після початку відтворення моделі ЦД 2 типу у тварин експериментальної групи (група «Діабет») спостерігалась базальна гіперглікемія та глюкозна інтолерантність, підтвердження чому є підвищення показників площі під відповідними глікемічними кривими при проведенні навантажувального тесту з глюкозою (табл. 1).

Таблиця 1.

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

Група тварин	n	Показники глюкозного гомеостазу на 21 добу відтворення моделі		Показники глюкозного гомеостазу на 35 добу відтворення моделі	
		Базальна глікемія ммоль/л	ППК, ммоль/л/хв.	Базальна глікемія ммоль/л	ППК, ммоль/л/хв.
Інтактний контроль	5	3,83±0,18	636±20,2	4,02±0,22	620±22,2
Діабет	5	4,59±0,11 P<0,002	736±11,8 P<0,002	7,14±0,20 P<0,001	1625±76,9 P<0,001

Примітка: P - відхилення відносно показників групи «інтактний контроль»

Відомо, що надмірні концентрації НЕЖК можуть реалізувати свій патогенетичний вплив шляхом індукції розвитку інсулінорезистентності через порушення на рівні інсулін-стимульованого транспорту глюкози, а саме, внаслідок дизрегуляції проведення інсулінового сигналу [14]. Гіпертригліцеридемія також може індукувати зниження як експресії інсулінових рецепторів, так і їх інсулінзв'язуючу активність в інсулін чутливих тканинах [15].

У результаті досліджень було встановлено, що моделювання ЦД 2 типу призводило до вірогідного зростання рівня НЕЖК в сироватці крові та виразного зниження коефіцієнта чутливості до інсуліну (табл. 2). Слід зазначити, що рівень тригліцеридів також суттєво підвищувався у тварин групи «Діабет». Поєднання підвищених рівнів тригліцеридів та НЕЖК у тварин експериментальної групи є однією з ознак діабетичної дисліпідемії та метаболічного синдрому, а у поєднанні з виявленими порушеннями глюкозного гомеостазу та чутливості до інсуліну свідчить про наявність ЦД 2 типу.

Таблиця 2.

Показники ліпідного обміну та чутливості до інсуліну у щурів з цукровим діабетом 2 типу через 35 діб, (X±Sx)

Група тварин	n	Тригліцериди, ммоль/л	НЕЖК, ммоль/л	Коефіцієнт чутливості до інсуліну, %
Інтактний контроль	5	1,53±0,18	0,44±0,09	21,3±4,23
Діабет	5	3,21±0,24 P<0,001	1,23±0,11 P<0,001	5,31±4,09 P<0,02

Примітка: Р - відхилення відносно показників групи «Інтактний контроль»

Протягом моделювання діабету у експериментальних тварин було виявлено достовірну зміну маси тіла. Так, через 21 добу високожирової дієти у щурів спостерігалось достовірне зростання ваги

порівняно до показників групи «Інтактний контроль», яка отримувала стандартну їжу (табл. 3). Після 11-добового введення щурам глюкокортикоїду дексаметазону було виявлено зниження ваги у тварин групи «Діабет», що можна пояснити стресуючим впливом діабетогенного хімічного агенту.

Таблиця 3.

Маса тіла щурів під час відтворення моделі цукрового діабету 2 типу, (X±Sx)

Група тварин	пп	Маса тіла на початку дослідження, г	Маса тіла на 21 добу від початку дослідження, г	Маса тіла на 35 добу від початку дослідження, г
Інтактний контроль	5	201±3,04	223±4,20	254±3,45
Діабет	5	203±4,41	295±6,70 P<0,01	231±4,36 P<0,05

Примітка: Р - 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 та дисліпідемія (гіпертригліцеридемія, підвищення НЕЖК) у порівнянні до інтактних тварин контрольної групи.

Проведені дослідження свідчать про наявність у розробленої моделі провідних патогенетичних ланок цукрового діабету 2 типу, що в поєднанні з порушеннями ліпідного обміну 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. Jacovides, A. Diabetes a global epidemic [Electronic resource]. - Режим доступу : <http://sacra.za.net>.

2. 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.

3. Cheng, D. Prevalens, predisposition and prevention of type 2 diabetes [Text] / D. Cheng // Nutr. Metab. - 2005. - Vol. 1.8. - P. 2-29.

4. Srinivasan K., Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview [Text] // Indian J Med Res. - 2007. - Vol. 125, № 3. - P. 451-472.

5. Buettner, R. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents [Text] // R. Buettner, J. Scholmerich, L. Bollheimer // Obesity. - 2007. - L. C Vol. 15. - P. 798-808.

6. 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.

7. Гладких, А. И. Экспериментальные подходы к изучению сахарного диабета 2 . типа (обзор литературы и собственные результаты) [Текст] / А. И. Гладких // Пробл. эндокрин. патологии. - 2008. - № 4. - С. 99-106

8. Relationship between visceral adiposity and intramyocellular lipid content in two rat models of insulin resistance [Text] // M. Korach-Andre, J. Gao, J. S. Gounarides [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. - 2005. - Vol. 288. - P. 106-116.

9. Лабораторные животные [Текст] / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария [и др] - Киев : Вища школа, 1983. - 383 с.

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. 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.

12. 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.

13. 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.

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.

15. Taskineh M.-R. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. // Diabetologia - 2003. - Vol. 46. - P. 733-749.