



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59419 (13) U  
(51) МПК  
A61H 31/02 (2006.01)  
G01N 33/48 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ЗАПОБІГАННЯ РОЗВИТКУ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ОРГАНІЗМУ ПРИ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ**

1

(21) u201014049

(22) 25.11.2010

(24) 10.05.2011

(46) 10.05.2011, Бюл. № 9, 2011 р.

(72) ГОРБАНЬ ЄВГЕН МИКОЛАЙОВИЧ, ТОПОЛЬ-  
НІКОВА НАТАЛІЯ ВІТАЛІЇВНА, ОСИПОВ МИКОЛА  
ВОЛОДИМИРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ГЕРОН-  
ТОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ  
НАУК УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб запобігання розвитку інсулінорезистентності організму шляхом застосування нормобаричного гіпоксичного впливу, який **відрізняється** тим, що гіпоксичний вплив кисневою сумішшю 10 об. % здійснюють протягом 5 хв. до R-опромінення та у процесі опромінення при дозі 5 Гр - 10 хв., що приводить до зниження радіаційно-обумовленої інсулінорезистентності у старих щурів та підвищення толерантності організму до глюкози у опромінених тварин обох вікових груп.

Корисна модель належить до радіобіології та профілактичної медицини, зокрема ендокринології, геронтології.

На теперішній час спостерігається ріст виникнення цукрового діабету (ЦД) серед учасників лікування наслідків аварії на ЧАЕС та серед населення, що проживає на забруднених радіонуклідами територіях (Зуева Н.А., Коваленко А.Н., Ефимов А.С. Ионизирующая радиация и инсулинорезистентность. - К.: Здоров'я, 2004. - 198 с.). Відповідь організму на радіаційний вплив опосередкована активацією процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Довготривала секреція інсуліну (Інс) підшлунковою залозою внаслідок радіаційного стресу може спричиняти розвиток радіаційно-індукованої інсулінорезистентності (ІР).

Відомий "Спосіб підвищення адаптаційних можливостей організму за допомогою гіпоксичного впливу" (Патент України № 37447). У цьому способі покращують функціональний стан ендотелію судин літніх хворих із стабільною стенокардією напруження I та II функціональних класів шляхом проведення інтервальних нормобаричних гіпоксичних тренувань. Використовують 14 об. % кисневу суміш зі зниженням концентрації кисню до 12 об. %. В основі методу гіпокситерапії лежить м'яка фізіологічна стимуляція неспецифічної реактивності і резистентності організму до потенційно негативних факторів природного та антропогенного середовища, в тому числі дії іонізуючого опромінення (ІО). Однак, вплив газової суміші з вмістом

кисню 12-14 об. % має певні недоліки, оскільки впливає лише на функціональні можливості організму, та не діє на генетичні механізми.

Також відомий "Спосіб лікування екстремальною гіпоксією та гіперкапнією" (Патент РФ № 2387463) з використанням газової суміші із вмістом кисню 10 об. %, який належить до екстремальної гіпоксії, діє на генетичні механізми та сприяє росту апоптозу в першу чергу тих клітин, які мають генетичні порушення. При екстремальній гіпоксії відбувається виведення із судинного русла дефектних еритроцитів, що покращує реологічні властивості крові; відбувається виведення дефектних клітин макрофагами з різних органів та тканин, що сприяє оновленню тканин організму. Однак, поряд з цим відбувається ряд змін, що мають негативний ефект за умов дії ІО. У результаті довготривалого екстремального гіпоксичного впливу (протягом 30 хв з наступним продовженням сеансу до виникнення перших ознак декомпенсації серцевої діяльності) виявлена значна активація глюкокортикоїдної функції кори надниркових залоз та ріст стресіндукованої гіперглікемії. Підвищення у внутрішньому середовищі організму концентрації глюкози та продуктів гліколізу спричиняє негативний вплив у віддалені строки після дії ІО та може сприяти виникненню радіаційно-обумовленої ІР.

За прототип вибраний "Спосіб комбінованого лікування хворих на гіпертонічну хворобу із супутнім ЦД 2 типу" (Пат. України № 23842, МПК А61В 10/02. Опубл. 11.06.2007, Бюл. № 8), що включає

(13) U  
(11) 59419  
(19) UA

застосування фармакологічних засобів, які пригнічують активність симпатичної нервової системи, на фоні гіпоксичних тренувань. Таким чином, гіпоксичне тренування тут є лише доповненням до фармакологічного лікування, але його дія направлена на зниження глікемії, базального рівня Інс в крові, рівня глікозильованого гемоглобіну та зменшення індексу ІР. Недоліком цього методу є те, що він не дозволяє запобігти виникненню ІР за умов дії ІО, а застосовується лише для лікування вже хворих на ЦД 2 типу та гіпертонічну хворобу.

В основу даної корисної моделі поставлена задача розробити спосіб запобігання розвитку радіаційно-обумовленої ІР організму за допомогою екстремального гіпоксичного впливу до та в процесі опромінення. Вирішення поставленої задачі досягається тим, що в спосіб застосовують гіпоксичний вплив (киснева суміш 10 об. %) до та в процесі рентгенівського опромінення (R-опромінення) в сублетальній дозі.

Спосіб здійснюється наступним чином

Самців щурів різних вікових груп піддають гіпоксичному впливу до та в процесі R-опромінення (в сублетальній дозі 5 Гр). Гіпоксичний вплив здійснюють наступним чином: кисневу подушку об'ємом 42 л наповнюють газовою сумішшю (виробництво Київського заводу "Linde"). На клітку з тваринами надягають великий поліетиленовий пакет та роблять знизу отвір, до якого під'єднують кисневу подушку. На подушку надавлюють зверху, газова киснева суміш 10 об. % наповнює пакет та витискує в отвір знизу більш важке повітря. Ця процедура продовжується 5 хв до та 10 хв протягом R-опромінення. Тварин піддавали дії R-опромінення в сублетальній дозі 5 Гр, яка може призводити до розвитку гострої променевої хвороби. Опромінення здійснювалось за допомогою рентгенівського апарата "РУМ-17" за наступних умов: напруга на трубі - 170 кВ; сила струму - 12 мА; фільтр - 0,5 мм Cu і 1,0 мм Al; фокусна відстань - 45 см; потужність дози - 0,5 Гр за хв; тривалість опромінення - 10 хв.

Розроблення даного способу стало можливим завдяки проведеним експериментальним дослідженням на нелінійних щурах-самцях двох вікових груп: дорослих (6 міс.) та старих (24 міс.). Забій тварин проводили за допомогою цервікальної дислокації через 2, 3 та 5 діб після R-опромінення. Концентрацію 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) в крові визначали флюориметричним методом, використовуючи як стандарт кристалічний кортикостерон фірми Serva (Німеччина). При дослідженні толерантності організму до глюкози (ТОГ) була застосована стандартна проба із цукровим навантаженням. Для цього визначали рівень глюкози у крові перед проведенням цукрового навантаження - внутрішньочеревного введення розчину глюкози

із розрахунку 2,5 г/кг маси тіла - і через 15 та 45 хв після введення глюкози. Для оцінки стану чутливості тканин до Інс були використані наступні розрахункові показники: індекси HOMA та Matsuda. Індекс HOMA розраховується наступним чином:  $I \times G / 22,5$ , де I - рівень Інс натще; G - рівень глюкози крові натще. (Matthews D.R., Hosker J.P., Rudenski A.S. et. al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man // *Diabetology*. - 1985. - V.28. - P. 412-419). Формула Matsuda:  $10.000 / \text{корінь квадратний з } (I_o \times G_o) \times (I_{cp} \times G_{cp})$ , де  $I_o$  і  $G_o$  - рівні Інс та глюкози натще відповідно,  $I_{cp}$  і  $G_{cp}$  - середнє значення рівнів Інс та глюкози під час проведення глюкозотолерантного тесту (Matsuda M., DeFronzo R.A. Insulin sensitivity obtained from oral glucose tolerance testing// *Diabetes Care*. - 1999. - V. 22. - P. 1462-1470). Рівень Інс в крові визначали радіоімунологічним методом. Інтенсивність вільнорадикального окиснення в крові та гомогенатах тканини печінки оцінювали за рівнями малонового діальдегіду (МДА), каталазної (Кат) та супероксиддисмутазної (СОД) активностей.

Для використання екстремальної гіпоксії за умов дії ІО важливе значення має більш ефективна оптимізація балансу між про- та антиоксидантними системами. У дорослих щурів через 2 доби після опромінення спостерігалось підвищення рівня МДА в крові та в тканині печінки, а також підвищення активностей Кат та СОД в крові, що є закономірною реакцією системи антиоксидантного захисту (АО-захисту) на активацію процесів ПОЛ. Разом з тим, через 5 діб після опромінення спостерігалось зниження активності обох досліджених ферментів системи АО-захисту в крові, порівняно з контролем, що може свідчити про її виснаження в зазначений строк. В тканині печінки через 5 діб після опромінення виявлено підвищення рівня МДА. Гіпоксичний вплив запобігав підвищенню рівнів МДА в крові дорослих щурів через 2 доби після опромінення та у тканині печінки через 2 і 5 діб після опромінення, а також підвищенню СОД-активності в крові дорослих щурів через 2 доби та зниженню Кат-активності через 5 діб після опромінення. Гіпоксичний вплив приводив до зниження СОД-активності в тканині печінки опромінених тварин, порівняно з контролем, через 2 та 5 діб. Можна припустити, що гіпоксичний вплив сприяв зниженню концентрації вільного кисню в тканині печінки дорослих опромінених тварин та зниженню інтенсивності процесів ПОЛ, внаслідок чого була відсутня потреба в активації системи АО-захисту.

Показники процесів ПОЛ в крові та тканині печінки дорослих і старих щурів, підданих R-опроміненню та впливу гіпоксії

Групи тварин	Рівень МДА, нмоль/мг білка		Активність Кат, мкмоль/(мг білка · хв)		Активність СОД, ум.од./мг білка	
	кров (n=6)	печінка (n=6)	кров (n=6)	печінка (n=6)	кров (n=6)	печінка (n=6)
дорослі						
Контроль	0,60±0,06	0,45±0,05	4,30±0,40	1,95±0,05	0,57±0,06	3,00±0,31
2 доби після опромінення	1,10±0,11*	1,14±0,15*	7,66±0,77*	1,52±0,05	1,00±0,09*	3,13±0,22
2 доби після опромінення + гіпоксія	0,81±0,09	0,52±0,06 <sup>#</sup>	7,43±0,80*	1,55±0,05	0,23±0,02 <sup>**</sup>	1,92±0,20*
5 дів після опромінення	0,45±0,04	1,05±0,12*	1,76±0,38*	2,06±0,30	0,30±0,01*	2,29±0,22
5 дів після опромінення + гіпоксія	0,36±0,01*	0,57±0,07 <sup>#</sup>	4,09±0,50 <sup>#</sup>	1,98±0,16	0,43±0,04*	1,28±0,15 <sup>#</sup>
старі						
Контроль	0,41±0,04	0,42±0,04	5,55±0,60	0,57±0,06	0,72±0,07	3,59±0,26
2 доби після опромінення	0,38±0,04	0,34±0,04	27,9±2,89*	1,32±0,14*	1,87±0,36*	3,39±0,42
2 доби після опромінення + гіпоксія	0,39±0,04	0,46±0,06	7,88±1,08 <sup>#</sup>	0,58±0,06 <sup>#</sup>	1,07±0,15	5,05±0,66
5 дів після опромінення	0,33±0,04	0,79±0,08*	7,44±0,70	1,13±0,13*	1,01±0,13	6,45±0,70*
5 дів після опромінення + гіпоксія	0,33±0,03	0,58±0,07	7,86±0,89	1,14±0,12*	0,92±0,09	4,71±0,47

Примітки: \* - достовірна відмінність порівняно з контролем,  
# - достовірна відмінність порівняно з групою опромінених тварин.

У старих щурів через 2 доби після опромінення спостерігалась значна активація ферментів АО-захисту: в крові - Кат та СОД; в тканинах печінки - Кат. Через 5 дів після опромінення в тканині печінки виявлено підвищення рівня МДА, активностей Кат та СОД. Гіпоксичний вплив запобігав через 2 доби після опромінення підвищенню активностей Кат та СОД в крові та Кат-активності в тканині печінки; а також запобігав через 5 дів після опромінення активації ПОЛ в тканині печінки старих щурів та підвищенню активностей Кат та СОД. Відсутність активації процесів ПОЛ в зазначених субстратах була обумовленою неактивацією ферментів АО-захисту, оскільки Кат- та СОД-активності знижувались в зазначеній групі, порівняно з опроміненими тваринами, а за рахунок інших механізмів регуляції про/антиоксидантного гомеостазу. Можна припустити, що нівелювання кисневого ефекту за умов дії ІО на фоні гіпоксичного впливу запобігало розвитку радіаційно-обумовлених ушкоджень ліпідного матриксу клітинних мембран та мембранозв'язаних структур, обумовлених активацією ПОЛ, що може призводити до порушення функцій інсулінових рецепторів та знижувати реакцію опроміненого організму на

Інс.

За умов дії ІО, одним з механізмів підвищення інтенсивності секреції глюкокортикоїдів, які мають антиоксидантні властивості, є посилення інтенсивності ПОЛ в організмі. Через 2 доби після одноразового R-опромінення у дорослих щурів спостерігалось достовірне підвищення рівня 11-ОКС у плазмі крові порівняно з контролем. У старих опромінених щурів не було виявлено вірогідних змін вказаного показника. Гіпоксичний вплив запобігав підвищенню рівня 11-ОКС у плазмі крові дорослих тварин через 2 доби після опромінення та істотно не впливав на зазначений показник у старих опромінених тварин. Активація секреції глюкокортикоїдів через 2 доби після опромінення є відображенням ступеня важкості променевого ураження, тобто є результатом патологічних змін в організмі. Тому запобігання підвищенню рівня 11-ОКС в крові за допомогою гіпоксичного впливу можна вважати позитивним внеском в підвищення радіорезистентності організму.

Рівень 11-ОКС в крові, індекси інсулінорезистентності організму дорослих і старих щурів, підданих R-опроміненню та впливу гіпоксії

Групи тварин	Рівень 11-ОКС, нмоль/л	Індекс HOMA-IR	Індекс Matsuda-IR
Контроль	353±30	4,44±0,50	9,83±0,90
Опромінення	510±50*	7,25±0,80*	5,35±0,65*
Опромінення+гіпоксія	358±20 <sup>#</sup>	7,09±0,40*	5,25±0,35*
Контроль	353±40	3,97±0,48	12,0±0,98
Опромінення	337±23	6,89±0,64*	6,76±0,80*
Опромінення+гіпоксія	373±39	4,80±0,70*	9,25±0,97

Примітки: \* - достовірна відмінність порівняно з контролем,  
# - достовірна відмінність порівняно з групою опромінених тварин.

У дорослих щурів через 2 доби після опромінення, а у старих - через 3 доби спостерігалось достовірне зниження ТОГ: градієнти змін рівнів глюкози через 15 та 45 хв після цукрового навантаження були негативними і достовірно відрізнялись від таких в контролі. Зниження ТОГ у опромінених тварин обох вікових груп може свідчити про

розвиток радіаційно-обумовленої ІР та є фактором ризику виникнення ЦД. Гіпоксичний вплив запобігав зниженню ТОГ у дорослих і старих опромінених тварин.

Рівні глюкози в крові дорослих і старих щурів, підданих R-опроміненню та впливу гіпоксії, після цукрового навантаження, мкмоль/л

Групи тварин	Базальний рівень	Після введення глюкози		Різниця через 45 та 15 хв
		Через 15 хв	Через 45 хв	
дорослі				
Контроль	3,33±0,33	5,62±0,34	5,01±0,55	- (0,61±0,32)
Опромінення	3,34±0,33	5,78±0,68	8,16±0,63	2,38±0,34*
Опромінення+гіпоксія	4,80±0,50	7,60±0,82	5,10±0,74	- (2,50±0,22) <sup>#</sup>
старі				
Контроль	3,44±0,34	5,50±0,46	4,70±0,22	- (0,80±0,41)
Опромінення	3,00±0,30	4,33±0,53	4,67±0,23	0,34±0,20*
Опромінення+гіпоксія	3,70±0,38	5,13±0,22	3,70±0,20	- (1,43±0,22) <sup>#</sup>

Примітки: \* - достовірна відмінність порівняно з контролем,

# - достовірна відмінність порівняно з групою опромінених тварин.

Існують непрямі методи оцінки дії Інс in vivo, спрямовані на оцінку ефективності дії ендогенного Інс. До таких показників належать розрахункові індекси НОМА і Matsuda. Через 3 доби після впливу опромінення індекс НОМА достовірно підвищувався як у дорослих, так і у старих щурів, а індекс Matsuda достовірно знижувався у опромінених тварин обох вікових груп. Ці дані свідчать про підвищення ІР у опромінених тварин обох вікових груп. Гіпоксичний вплив запобігав підвищенню ІР після опромінення лише у старих тварин.

Таким чином, гіпоксичний вплив зменшує активацію процесів ПОЛ та пошкодження системи АО-захисту в організмі дорослих та старих щурів в ранні строки після впливу ІО, що має велике значення для підвищення радіорезистентності організму, зменшує віддалену реакцію надниркових за-

лоз у дорослих опромінених щурів, запобігає зниженню ТОГ у опромінених тварин обох вікових груп та розвитку радіаційно-обумовленої ІР організму у старих щурів.

Результати наших досліджень підтверджують актуальність пошуку немедикаментозних, нешкідливих, таких, як, наприклад, екстремальний гіпоксичний вплив (використання газової суміші 10 об. %), заходів, які б ефективно зменшували (або гальмували) радіаційно-обумовлені діабетогенні порушення ендокринної функції підшлункової залози та/або вуглеводного обміну та попереджали розвиток радіаційно-індукованої ІР. В основі радіопротекторної дії гіпоксичного впливу лежить нівелювання негативних проявів кисневого ефекту, запобігання радіаційно-обумовленій активації ПОЛ та ендокринним порушенням організму.