



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 70033

(13) U

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2011 13160**

(22) Дата подання заявки: **08.11.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.05.2012**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.05.2012, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

Лещенко Жанна Анатоліївна (UA),
Гладких Олександр Іванович (UA),
Полторак Вікторія Віталіївна (UA),
Опалейко Юлія Анатоліївна (UA),
Тижненко Тетяна Василівна (UA)

(73) Власник(и):

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ.
В.Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ" (ДУ ІПЕП),
вул. Артема, 10, м. Харків, 61002 (UA)

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ У КРОЛІВ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу у кролів, при якому кролям породи Шиншила вагою $4,5 \pm 0,2$ кг щоденно підшкірного вводять дексаметазон в дозі 100 мкг/кг маси тіла протягом 30 діб.

UA 70033 U

Корисна модель належить до експериментальної ендокринології, фармакології та біології, й може бути використана при дослідженні патогенетичних механізмів розвитку цукрового діабету 2 типу (ЦД 2 типу) та його ускладнень, а також при оцінці біологічних ефектів нових лікарських засобів для корекції проявів вищезазначеного захворювання.

Згідно з даними IDF (Міжнародна діабетична федерація) натеper більш ніж 285 млн. осіб в усьому світі страждають на цукровий діабет (ЦД), що становить 6,4 % від усього дорослого населення планети, а до 2030 року їх загальна кількість зросте до 438 млн. [1]. ЦД 2 типу, який складає 90-95 % від загальної кількості хворих на ЦД, являє собою складне полігенне захворювання, патогенетичним підґрунтям якого є головним чином інсулінорезистентність та дисфункція бета-клітин підшлункової залози [2]. До зовнішніх факторів, що реалізують спадкову схильність до ЦД 2 типу та приймають участь в його патогенезі, належить так званий західний спосіб життя, а саме, збільшення в раціоні харчування кількості рафінованих вуглеводів і жирів тваринного походження, стреси, куріння та малорухомість [3].

На сьогодні існує гіпотеза, згідно з якою, ожиріння може бути одним з індукторів розвитку інсулінорезистентності (ІР) через збільшення синтезу глюкокортикоїдів [4], які, як відомо, знижують стимульоване інсуліном поглинання глюкози та транслокацію GLUT-4 до мембрани міоцитів без зниження його загального вмісту [5]. Посилена експресія глюкокортикоїдів у циркуляторному руслі може спричиняти периферичну ІР з подальшим розвитком гіпертензії, інтолерантності до глюкози, порушень обміну ліпідів та ліпопротеїнів [6, 7], а також безпосередньо впливати на секреторну функцію β -клітин підшлункової залози [8]. Так моделювання тривалого навантаження дексаметазоном в експерименті на щурах супроводжувалось розвитком гіперінсулінемії, підвищенням рівня холестерину, тригліцеридів (ТГ) і вільних жирних кислот (ВЖК) в крові, зменшенням загального вмісту нітритів/нітратів, що свідчить про порушення утворення оксиду азоту в ендотелії, підвищенням артеріального тиску [9]. Здатність глюкокортикоїдів індукувати зниження чутливості до інсуліну було виявлено у осіб хворих на синдром Кушинга [10], на тлі глюкокортикоїдної терапії [11], у осіб, що піддавались тривалому впливу психологічного стресу [12, 13], а також під час клінічних випробувань глюкокортикоїдів [14].

Натеper існує декілька різновидів експериментальних моделей, що в тій, або іншій мірі відображають багатокомпонентність ЦД 2 типу у людини на різних стадіях його спонтанної еволюції (інсулінорезистентність, гіпер- або гіпоінсулінемія, гіперглікемія, дисліпідемія та ін.). Найчастіше в сучасних експериментальних дослідженнях використовують тварин із спонтанним або генетично детермінованим діабетом (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) та трансгенних або нокаутних за конкретними генами тварин (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 ін.). [15]. Але використання вищезазначених ліній тварин обмежується їх високою вартістю та майже повною відсутністю в розплідниках науково дослідних та господарчих установ України, тому переважна кількість моделей цукрового діабету 2 типу, що натеper впроваджено в Україні, відтворюється на щурах лінії Вістар.

Відома модель цукрового діабету 2 типу у щурів, яка полягає у тому, що статевозрілим самцям щурів лінії Вістар, яких утримують на високожировій дієті (50 % загального калоража за рахунок насичених жирів) протягом 35 діб, починаючи з 25 доби експерименту, щодобово роблять 11 внутрішньочеревних ін'єкцій дексаметазону у дозі 1 мг/кг маси тіла [16]. Але при відтворенні вищезазначеної моделі перед експериментаторами часто постає проблема нестачі необхідного об'єму біологічного матеріалу, який можна отримати з однієї тварини для численних біохімічних досліджень. Тому використання кролів для розробки експериментальних моделей ЦД 2 типу є виправданим не тільки з економічних (доступність та помірна вартість утримання), а й біоетичних міркувань (менша кількість тварин необхідна для одержання достатнього об'єму біологічного матеріалу).

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

Поставлена задача вирішується тим, що статевозрілим кролям породи Шиншила вагою $4,5 \pm 0,2$ кг протягом 30 діб роблять щоденні підшкірні ін'єкції розчину дексаметазону у дозі 100 мкг/кг маси тіла.

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

Спосіб апробовано на 5 статевозрілих (24-місячних) кролях-самцях породи Шиншила вагою $4,5 \pm 0,2$ кг. Моделювання ЦД 2 типу проводили шляхом щоденного підшкірного введення дексаметазону (фірма "KRKA", Словенія) в дозі 100 мкг/кг маси тіла протягом 30 діб.

Піддослідних тварин утримували на стандартному раціоні харчування 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 утримувалась в аналогічних умовах.

- 5 Стан глюкозного гомеостазу під час відтворення моделі оцінювали за показниками базальної глікемії (0, 30 та 40 доба експерименту), внутрішньовенного тесту толерантності до глюкози (ВТТГ) (50 мг/кг маси тіла) та базального інсуліну на 40 добу експерименту. Площину під глікемічними кривими (ППК) при проведенні ВТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Mathlab". Чутливість до інсуліну оцінювали за допомогою тесту
- 10 толрантності до інсуліну (ТТІ), 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
- 15 внутрішньочеревного введення гормону натще (0,2 Од/кг маси тіла) [17]. Протягом експерименту визначали динаміку ваги кролів. Ліпідний обмін досліджували за показниками рівнів ТГ (Liquick Cor-TG, Польща), загального холестерину (Liquick Cor-CHOL, Польща), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (CORMAY YDL, Польща) та ВЖК [18] в сироватці крові.

- 20 Перевірку нормальності розподілу отриманого цифрового матеріалу проведено за допомогою тесту Шапіро-Уїлка [19]. Для оцінки різниці арифметичних середніх був використаний t - критерій Стюдента. Перевірку нульових гіпотез проведено з використанням t критерію [20] на рівні значущості $p < 0,05$.

- 25 В результаті проведеного дослідження було встановлено, що через 30 діб від початку відтворення моделі ЦД 2 типу у кролів групи "Діабет" спостерігалась базальна гіперглікемія, а через 10 діб після припинення введення дексаметазону, тобто на 40 день дослідження зберігалась наявність гіперглікемії та глюкозна інтолерантність, підтвердженням цьому є підвищення показників площі під відповідними глікемічними кривими при проведенні навантажувального тесту з глюкозою (табл.1).

Таблиця 1

Показники глюкозного гомеостазу кролів з цукровим діабетом 2 типу, ($X \pm Sx$)

Група тварин	n	Базальна глікемія на початок експерименту, ммоль/л	Базальна глікемія на 30 добу експерименту, ммоль/л	Базальна глікемія на 40 добу експерименту, ммоль/л	ППК під час ВТТГ на 40 добу експерименту, ммоль/л/хв.
Інтактний контроль	5	4,36 \pm 0,16	3,75 \pm 0,22	3,82 \pm 0,17	305,67 \pm 11,18
Діабет	5	4,31 \pm 0,14	7,83 \pm 0,35 $P < 0,001$	8,51 \pm 0,26 $P < 0,001$	815,93 \pm 25,25 $P < 0,001$

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

30

- За показниками базального рівня інсуліну, рівнів глікемії та ППГ під час проведення ТТІ було доведено наявність виразної інсулінорезистентності в групі "Діабет", оскільки у порівнянні до контрольної, в цій групі була вірогідно знижена реакція на екзогенно введений інсулін (табл.2), а показники базального рівня інсуліну та ПГК значно перевищували верифіковані для інтактних
- 35 тварин.

Таблиця 2

Показники чутливості до інсуліну у кролів з цукровим діабетом 2 типу на 40 добу експерименту, ($X \pm Sx$)

Група тварин	n	Базальний рівень інсуліну, мкЕд/мл	Коефіцієнт чутливості до інсуліну, %	ППК під час ТТІ, ммоль/л/хв.
Інтактний контроль	5	53,40 \pm 5,29	42,12 \pm 3,68	157,61 \pm 7,21
Діабет	5	141,60 \pm 4,16 $P < 0,001$	12,69 \pm 4,60 $P < 0,001$	455,91 \pm 16,69 $P < 0,001$

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

У результаті досліджень було встановлено, що 30-добове введення дексаметазону призводило до порушення ліпідного гомеостазу у піддослідних кролів. Так у групі "Діабет" спостерігалось вірогідне підвищення рівнів загального холестерину, ТГ та ВЖК та виразного зниження рівня холестерину ліпопротеїдів високої щільності в сироватці крові (табл.3).

Наявність вищезазначених порушень ліпідного гомеостазу 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 розвиток ЦД 2 типу.

Таблиця 3

Показники ліпідного обміну у кролів з цукровим діабетом 2 типу на 40 добу експерименту, ($\bar{X} \pm Sx$)

Група тварин	n	Загальний холестерин, ммоль/л	Холестерин ліпопротеїдів високої щільності, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ВЖК, ммоль/л
Інтактний контроль	5	1,50±0,26	0,84±0,09	1,37±0,15	0,52±0,10
Діабет	5	2,43±0,24 P<0,001	0,28±0,06 P<0,05	5,13±0,25 P<0,001	2,56±0,30 P<0,001

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

У кролів обох експериментальних груп не було виявлено достовірної зміни маси тіла відносно показників на початку дослідження.

Таким чином, щоденне підшкірне введення кролям дексаметазону в дозі 100 мкг/кг маси тіла протягом 30 діб викликає розвиток ключових складових, ЦД 2 типу, а саме, базальних гіперглікемії та гіперінсулінемії, глюкозної. інтолерантності, інсулінорезистентності, а також дисліпідемії (підвищення рівнів загального холестерину, ТГ, ВЖК та зниження рівня холестерину ліпопротеїдів високої щільності) 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.

Джерела інформації:

1. Бутрова С.А. Метаболический синдром // Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты / Под ред. И.И. Дедова, Г.А. Мельниченко. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. - С. 45-78.

2. International Diabetes Federation. Diabetes and Impaired Glucose Tolerance [Електрон, ресурс] // IDF Diabetes Atlas. - Режим доступа: <http://www.diabetesatlas.org>.

3. Cheng, D. Prevalens, predisposition and prevention of type 2 diabetes [Text] / D. Cheng // Nutr. Metab. - 2005. - Vol. 18. - P. 2-29.

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

5. Amelioration of high-fat feeding-induced insulin resistance in skeletal muscle with the antiglucocorticoid RU486 [Text] / M. Kusunoki, G. Cooney, T. Hara [et al.] // Diabetes. - 1995. - Vol. 44. - P. 718-720.

6. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle [Text] / G. Dimitriadis, B. Leighton, M. Pany-Billings [et al.] // Biochem. J. - 1997. - Vol. 321. - P. 707-712.

7. Barthel, A. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis [Text] / A. Barthel, D. Schmoll // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. - 2003. - Vol. 285. - P. E685-E692.

8. Andrews, R. Glucocorticoids and insulinresistance: old hormones, new targets [Text] / R. Andrews, B. Walker // Clin. Sci. - 1999. - Vol. 96. - P. 513-523.

9. Pancreatic p cell are important targets for the diabetogenic effect of glucocorticoids [Text] / F. Delaunay, A. Khan, A. Cintra [et. al.] // J. Clin. Invest.-1997. - Vol. 100. - P. 2094-2098.

10. Glucocorticoids and insulin sensitivity: dissociation of insulin's metabolic and vascular actions [Text] / C. Perry, A. Spiers, S. Cleland [et. al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 2003 - Vol. 88. - P. 6008-6014.

11. Insulin resistance in Cushing's syndrome [Text] / R. Nosadini, S. Del Prato, A. Tiengo [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. - 1983. - Vol. 57. - P. 529-536.
12. Cushing syndrome due to surreptitious glucocorticoid administration [Text] / S. Qaddusi, P. Browne, B. Toivola [et al.] // Arch. Intern. Med. - 1998. - Vol. 158. - P. 294-296.
- 5 13. Rosmond, R. Stress induced disturbances of the HPA-axis: a pathway to Type 2 diabetes? [Text] / R. Rosmond // Med. Sci. Monit. - 2003. - Vol. 9. - P. 35-39.
14. Lloyd, C Stress and diabetes: a review of the links [Text] / C. Lloyd, J. Smith, K. Wengler // Diabetes Spectr. - 2005. - Vol. 18. - №2. - P. 121-127.
15. Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: An overview [Text] / K. Srinivasan, P. Ramarao // Indian. J. Med. Res. - 2007. - Vol. 125. - №3. - P. 451-472.
- 10 16. Пат. 53262 UA, МПК(2009) G07B 23/00. Спосіб комбінованого моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів [Текст] / О.І. Гладких, Ж.А. Лещенко, В.В. Полторак [та ін.] (UA); заявник і патентовласник Державна установа "Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського Академії медичних наук України" (UA). - №U201005316; заявл. 30.04.10; опубл. 27.09.10, Бюл. №18. - 4 с.
- 15 17. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with euglycaemic clamp [Text] / A. Akinmokin, P. Selby, K. Ramaiya [et al.] // Diabet. Med. - 1992. - Vol. 9. - №5. - P. 432-437.
18. Dumcombe, W. The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids [Text] / W. Dumcombe // Biochem. J. - 1963. - Vol. 188. - №1. - P. 7-10.
- 20 19. Royston, J. An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples [Text] / J. Royston // Applied Statistic. - 1992. - Vol. 31. - P. 115-124.
20. Атраментова, Л.О. Статистичні методи в біології [Текст]: підручник / Л.О. Атраментова, О. М. Утєвська. - Х.: ХНУ ім. В.Н. Каразіна, 2007. - 288 с.

25

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу у кролів за допомогою хімічного чинника, який **відрізняється** тим, що кролям породи Шиншила вагою $4,5 \pm 0,2$ кг щоденно підшкірного вводять дексаметазон в дозі 100 мкг/кг маси тіла протягом 30 діб.

30

Комп'ютерна верстка А. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601