



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **96493**

(13) **U**

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 08832**

(22) Дата подання заявки: **04.08.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2015**

(46) Публікація відомостей **10.02.2015, Бюл.№ 3**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

Горбенко Наталія Іванівна (UA),
Іванова Ольга Володимирівна (UA),
Козар Валентина Вікторівна (UA),
Бориков Олексій Юрієвич (UA),
Таран Катерина Вікторівна (UA),
Звягіна Тетяна Сергіївна (UA),
Кіприч Тетяна Валеріївна (UA)

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ ЗА УМОВ ДЕФІЦИТУ ЕСТРОГЕНІВ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу за умов дефіциту естрогенів шляхом комбінованої дії висококалорійної дієти та хімічного індуктора інсулінової недостатності. Крім цього тримісячних оваріектомованих самиць щурів утримують на висококалорійній дієті протягом 10 тижнів, при цьому через 4 тижні після початку експерименту вводять стрептозотозин внутрішньочеревинно в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів.

UA 96493 U

Корисна модель належить до області медицини, біології та фармакології і може бути використана для вивчення патофізіологічних механізмів розвитку цукрового діабету (ЦД) 2 типу за умов дефіциту естрогенів, фармакологічного скринінгу нових лікарських сполук та дослідження механізму їх дії за умов поєднаної патології.

Відомо, що цукровий діабет 2 типу в комбінації з ожирінням є незалежним фактором ризику кардіоваскулярної патології, яка залишається головною причиною інвалідизації та смертності хворих на ЦД. Негативний вплив ЦД на серцево-судинну систему обумовлений прискоренням атеросклерозу, підвищенням тромбогенезу, активацією системного запалення, що призводить до розвитку ендотеліальної дисфункції, мікро- та макросудинних ускладнень тощо [1].

Метаболічні порушення, індуковані діабетом, безпосередньо впливають на структуру та функцію міокарда незалежно від інших факторів ризику, таких як захворювання коронарних артерій та гіпертензія, викликаючи розвиток діабетичної кардіопатії [2].

За даними епідеміологічних досліджень наявність ЦД 2 типу у жінок підвищує ризик ішемічної хвороби серця в два рази та смертність від серцево-судинних захворювань (ССЗ) - в два-п'ять разів порівняно з особами без діабету [3]. Це може бути пов'язане з тим, що ЦД посилює атерогенну дію інших чинників ризику та знижує протективний ефект естрогенів на серце та судини.

Відомо, що менопауза також супроводжується зростанням ризику кардіоваскулярної патології, зокрема метаболічного синдрому і ЦД 2 типу [4]. Результати клінічних досліджень свідчать, що у постменопаузальних жінок із ЦД 2 типу спостерігається розвиток проатерогенного ліпідного профілю, прозапального та проангіогенного стану, що призводить до зростання кардіометаболічного ризику майже в 5 разів у порівнянні з жінками аналогічного віку без діабету [5].

Вищезазначене свідчить про актуальність проведення подальших досліджень механізмів дії ендогенних та екзогенних естрогенів на серцево-судинну систему за наявності глюкометаболічних порушень, розширення уявлень про патогенез та обґрунтування нових напрямків профілактики та лікування кардіоваскулярних захворювань у постменопаузальних жінок із ЦД 2 типу.

Важливою задачею експериментальної медицини є відтворення адекватної моделі ЦД 2 типу на тлі дефіциту естрогенів, що дало б можливість дослідити механізми взаємодії між естрогенами та глюкозним гомеостазом і інсулінорезистентністю, потенційні патологічні наслідки порушення їх взаємовідносин і участь у розвитку діабетичних судинних ускладнень. Отримані результати можуть стати підґрунтям для розробки гендерно-специфічної профілактики та терапії кардіоваскулярних ускладнень ЦД 2 типу.

На сьогодні запропоновано ряд експериментальних моделей ЦД 2 типу, як загальноприйнятих, так і модифікованих. Для хімічної індукції діабету використовують алоксан, стрептозотон та дексаметазон у різних дозах [6, 7]. Для максимальної відповідності експериментальної моделі ЦД 2 типу метаболічним змінам і патогенезу ЦД 2 типу у людини запропоновані моделі, які поєднують введення низької дози хімічних агентів із комбінованою дієтою (високовуглеводною та/або високожировою) [8].

Так, у роботі [9] ЦД 2 типу моделювали у щурів лінії Sprague-Dawley масою (160-180) г за допомогою високожирової дієти (2 тижні), після чого інтраперитоніально вводили стрептозотон у дозі 35 мг/кг маси тіла тварин.

Для дослідження патогенезу діабетичної кардіоміопатії запропонована модель [10], суть якої полягає в тому, що самців щурів лінії Wistar масою (260±7 г) утримували на високожирової дієті протягом трьох тижнів, через 2 тижні робили внутрішньобрюшинно одну ін'єкцію стрептозотону в низьких дозах 15, 20, 25 або 30 мг/кг маси тіла. Було показано, що високожирова дієта у поєднанні із низькою дозою стрептозотону викликали метаболічні порушення в серці тварин. Зміни метаболізму глюкози, концентрації інсуліну та жирового обміну за умов введення стрептозотону в дозах 15-25 мг/кг були більш наближеними до фенотипу ЦД 2 типу, тоді як більш високі дози стрептозотону індукували зміни, близькі до фенотипу ЦД 1 типу.

Відомий спосіб експериментального моделювання ЦД 2 типу, який полягає в тому, що самців щурів лінії Wistar масою (140-180) г протягом десяти тижнів утримували на висококалорійній дієті, яка складалася із 15 % свинячого жиру, 25 % сахарози, 2,5 % холестеролу, 1 % жовчі та 56,5 % стандартної їжі, після чого вводили внутрішньочеревно цитратний розчин стрептозотону в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів, після чого ще протягом двох місяців тварин утримували на висококалорійній дієті [11]. В експериментальних щурів було встановлено порушення толерантності до вуглеводів, розвиток інсулінорезистентності та дисліпідемії. Проте, дана модель ЦД 2 типу була індукована на

самцях, що не дозволяє відтворити сполучення вищезазначеної патології з гіпоестрогенією у самиць.

Найбільш близьким по суті і результату до способу, що заявляється, є процес моделювання постменопаузального метаболічного синдрому на тлі цукрового діабету, який полягає в тому, що оваріектомованих щурів-самиць лінії Вістар утримували на високожировій дієті протягом 12 тижнів, наприкінці дослідження експериментальним тваринам вводили інтраперитонеально дексаметазон у дозі 1 мг/кг маси тіла протягом 5 діб [12]. Було встановлено, що утримання експериментальних тварин на високожировій дієті викликає розвиток порушеної толерантності до глюкози, інсулінорезистентності та ожиріння. Введення високих доз дексаметазону поглиблювало метаболічні порушення, індуковані високожировою дієтою, та призводило до розвитку відносної інсулінової недостатності, що підтверджувалося наявністю базальної гіперглікемії, порушеннями ліпідного обміну, ожирінням та розвитком оксидативного стресу в мітохондріях кардіоміоцитів у експериментальних тварин. Проте, в цьому способі був відтворений швидкоплинний цукровий діабет 2 типу, який зникає через тиждень після відміни дексаметазону, що підтверджується нормалізацією базальної глікемії.

Задача корисної моделі - створення експериментальної моделі стійкого цукрового діабету 2 типу за умов дефіциту естрогенів у щурів.

Поставлена задача вирішується тим, що тримісячних оваріектомованих щурів популяції Вістар масою (140-180) г утримують на висококалорійній дієті протягом 10 тижнів, при цьому через чотири тижні після початку експерименту вводять внутрішньочеревинно стрептозотоцин в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів.

Технічний результат - відтворення метаболічних порушень, характерних для цукрового діабету 2 типу за умов дефіциту естрогенів, що дозволяє отримати експериментальну модель для вивчення патофізіологічних механізмів розвитку макросудинних ускладнень та фармакологічного скринінгу лікарських сполук і дослідження механізму їх дії за умов поєднаної патології.

Даний спосіб моделювання полягає в тому, що ЦД 2 типу викликають у статевозрілих щурів-самиць шляхом комбінованої дії різних чинників: дефіциту естрогенів, тривалої висококалорійної дієти та індуктора інсулінової недостатності стрептозотоцину, що дозволяє відтворити основні патогенетичні ланки захворювання у людини, а саме, інсулінорезистентність та знижену секрецію інсуліну на тлі гіпоестрогенії.

Для здійснення способу, що заявляється, у тримісячних щурів-самиць гіпоестрогенію викликали шляхом двосторонньої оваріектомії під легким ефірним наркозом. Цукровий діабет розпочинали моделювати через 2 тижні після хірургічного втручання: оваріектомовані щури і щури із інтактними яєчниками протягом десяти тижнів знаходилися на висококалорійній дієті, яка складалася із 15 % жиру, 25 % сахарози, 1 % жовчних кислот та 56,5 % стандартної їжі. Контрольні інтактні та контрольні оваріектомовані тварини протягом десяти тижнів отримували стандартну дієту віварію. Через чотири тижні після початку експерименту щурам, які отримували висококалорійну дієту, вводили внутрішньочеревинно цитратний розчин стрептозотоцину в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів. Контрольні тварини за аналогічною схемою отримували внутрішньочеревинно цитратний буфер.

Розвиток ЦД 2 типу оцінювали за показниками:

- стану глюкозного гомеостазу (базальна глікемія та глікемія під час внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3 г/кг маси тіла), чутливість до інсуліну за допомогою короткого інсулінового тесту (0,5 Од/кг маси тіла)),
- концентрації фруктозаміну,
- ожиріння (маса тіла та загального вісцерального жиру),
- ліпідного профілю (концентрація загальних ліпідів та тригліцеридів в сироватці крові).

Усі експериментальні тварини були розподілені на наступні групи: інтактний контроль; цукровий діабет; оваріектомія; оваріектомія + цукровий діабет.

В результаті проведених досліджень встановлено, що дефіцит естрогенів не викликає порушень глюкозного гомеостазу і ліпідного метаболізму та не впливає на приріст маси тіла і масу загального вісцерального жиру, підтвердженням чому була відсутність статистичної різниці між показниками оваріектомованих та інтактних тварин (табл. 1, 2).

У той же час, цукровий діабет 2 типу у щурів із інтактними яєчниками характеризувався розвитком базальної гіперглікемії, інтолерантності до глюкози, інсулінорезистентності та ожиріння, підвищенням концентрації фруктозаміну та порушенням ліпідного обміну порівняно з інтактними контрольними тваринами (див. табл. 1, 2).

Таблиця 1

Показники глюкозного гомеостазу у самиць щурів
із експериментальним ЦД 2 типу за умов різної забезпеченості естрогенами, (X+Sx, n=6)

Група	Базальна глікемія, ммоль/л	ППК під час ВЧТТГ, ммоль/л *хв.	Коефіцієнт чутливості до інсуліну, %	Концентрація фруктозаміну, ммоль/л
Інтактний контроль	4,27±0,20	982,9±81,2	32,92±1,15	1,55±0,06
Діабет	8,10±0,25 ¹⁾	1306,3±163,8 ¹⁾	22,81±0,91 ¹⁾	2,49±0,16 ¹⁾
Оваріектомія	3,89±0,32 ²⁾	945,2±10,4 ²⁾	31,29±1,29 ²⁾	1,37±0,09 ²⁾
Оваріектомія + діабет	8,40±0,42 ¹⁾³⁾	1680,7±45,4 ¹⁾²⁾³⁾	13,02±0,74 ¹⁾²⁾³⁾	2,69±0,39 ¹⁾³⁾

¹⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "інтактний контроль", p≤0,05;

²⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "діабет", p≤0,05;

³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "оваріектомія", p≤0,05.

Таблиця 2

Вплив цукрового діабету 2 типу на інтегральні показники та ліпідний профіль у самиць щурів за умов різної забезпеченості естрогенами, (X±Sx, n=6)

Група	Приріст маси тіла, %	Відносна вага вісцерального жиру, %	Загальні ліпіди, г/л	ТГ, ммоль/л
Інтактний контроль	46,61±1,41	4,08±0,56	1,97±0,08	0,68±0,04
Діабет	73,27±5,93 ¹⁾	6,75±0,93 ¹⁾	3,39±0,29 ¹⁾	1,50±0,21 ¹⁾
Оваріектомія	50,46±3,12 ²⁾	3,48±0,67 ²⁾	1,82±0,17 ²⁾	0,47±0,07 ²⁾
Оваріектомія + діабет	81,50±5,84 ¹⁾³⁾	7,97±1,36 ¹⁾³⁾	3,53±0,62 ¹⁾³⁾	1,67±0,36 ¹⁾³⁾

¹⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "інтактний контроль", p≤0,05;

²⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "діабет", p≤0,05;

³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "оваріектомія", p≤0,05.

5 Сполучення ЦД 2 типу з дефіцитом естрогенів не призводило до подальшого підвищення рівня базальної гіперглікемії, концентрації фруктозаміну, приросту маси тіла та вісцерального жиру, проте поглиблювало порушення толерантності до глюкози та резистентності до інсуліну у порівнянні з групою діабетичних тварин без гіпоестрогенії (див. табл. 1, 2).

10 Тобто, розроблена експериментальна модель ЦД 2 типу на тлі гіпоестрогенії за патогенетичними ознаками є максимально наближеною до гормонально-метаболічних порушень, які спостерігаються у постменопаузальних жінок із ЦД 2 типу.

15 Таким чином, запропонований спосіб є адекватним методом моделювання ЦД 2 типу за умов дефіциту естрогенів, який дозволяє відтворити такі патофізіологічні складові захворювання, як інтолерантність до вуглеводів, інсулінорезистентність, відносну інсулінову недостатність, ожиріння та дисліпідемію. Це дозволяє підвищити релевантність отриманих результатів стосовно ролі взаємовідносин між естрогенами та глюкозним гомеостазом в патогенезі серцево-судинних ускладнень у жінок хворих на цукровий діабет 2 типу після менопаузи.

Джерела інформації:

20 1. Stratmann B., Tschoepe D. The diabetic heart: sweet, fatty and stressed // Expert Rev. Cardiovasc. Ther. - 2011. - Vol. 9, № 9. - P. 1093-1096.

2. Sack M. N. Type 2 diabetes, mitochondrial biology and the heart // Molec. Cell Cardiol. - 2009. - Vol. 46, № 6. - P. 842-849.

3. Preis S.R., Hwang S.J., Coady S. et al. Trends in all-cause and cardiovascular disease mortality among women and men with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study, 1950 to 2005 // *Circulation*. - 2009. - Vol. 119, № 13. - P. 1728-1735.

4. Harman S.M., Naftolin F., Brinton E.A., Judelson D.R. Is the estrogen controversy over?
5 Deconstructing the Women's Health Initiative study: a critical evaluation of the evidence // *Ann. NY Acad. Sci.* - 2005. - Vol. 1052, № 7. - P. 43-56.

5. Mascarenhas-Melo F., Marado D., Palavra F. et al. Diabetes abrogates sex differences and aggravates cardiometabolic risk in postmenopausal women // *Cardiovasc. Diabetol.* - 2013. - Vol. 12, № 4. - P. 61-75.

10 6. Tripathi A.S., Mazumder P.M., Chandewar A.V. Changes in the pharmacokinetic of sildenafil citrate in rats with Streptozotocin-induced diabetic nephropathy // *J. Diabetes Metab. Disord.* - 2014. - Vol. 13, № 1. - P. 8.

7. Sebai H., Selmi S., Rtibi K. et al. Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats // *Lipids Health Dis.*
15 - 2013. - Vol. 12, № 1. - P. 189.

8. Yu W., Wu J., Cai F. et al. Curcumin alleviates diabetic cardiomyopathy in experimental diabetic rats // *PLoS One*. - 2012. - Vol. 7, № 12. - e52013.

9. Srinivasan K., Viswanad B., Asrat L. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening // *Pharmacol. Res.* - 2005. - Vol. 52, № 4. - P.313-320.
20

10. Mansor L.S., Gonzalez E.R., Cole M.A. et al. Cardiac metabolism in a new rat model of type 2 diabetes using high-fat diet with low dose streptozotocin // *Cardiovasc. Diabetol.* - 2013. - Vol. 12, № 1. - P. 136-146.

11. Lin S., Yang J., Wu G. et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy // *J. of Biomed. Sci.* - 2010. - Vol. 17, Suppl. 1. - P. 46-56.
25

12. Пат. 67278 UA, МПК G09B 23/28 (2006.01). Спосіб моделювання постменопаузального метаболічного синдрому [Текст] /Н.І. Горбенко, В.В. Козар, К.В. Таран [та ін.] (UA); заявник і патентовласник ДУ "Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМН України" (UA) -№ u2011092237; заявл. 25.07.11; опубл. 10.02.12, Бюл. № 3. - 8 с.
30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу за умов дефіциту естрогенів шляхом комбінованої дії висококалорійної дієти та хімічного індуктора інсулінової недостатності, який
35 **відрізняється** тим, що тримісячних оваріектомованих самиць щурів утримують на висококалорійній дієті протягом 10 тижнів, при цьому через 4 тижні після початку експерименту вводять стрептозотозин внутрішньочеревинно в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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