



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53260** (13) **U**
(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГІПЕРТРОФІЧНО-ГІПЕРПЛАСТИЧНОГО ТИПУ ОЖИРІННЯ З ОЗНАКАМИ ЗАПАЛЕННЯ

1

(21) u201005303

(22) 30.04.2010

(24) 27.09.2010

(46) 27.09.2010, Бюл.№ 18, 2010 р.

(72) СЕРГІЄНКО ЛОРІАНА ЮРІЇВНА, ПЕРЕЦЬ ОЛЕНА ВІКТОРІВНА, КАРТАВЦЕВА ОКСАНА ВОЛОДИМИРІВНА, ЧЕРЕВКО ГАННА МИКОЛАЇВНА, ТОЛМАЧОВА ЛЮБОВ МИКОЛАЇВНА, БОНДАРЕНКО ТЕТЯНА ВІКТОРІВНА

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

2

ЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб моделювання гіпертрофічно-гіперпластичного типу ожиріння з ознаками запалення, що здійснюють шляхом гестаційного стресування, який **відрізняється** тим, що вагітну саміцю піддають дії соціально-емоційного стресу з 2 по 8, а потім з 15 по 21 день вагітності, отриманих нащадків у віці 11 місяців піддають дії стресу харчової депривації та гіпокінезії.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини, експериментальної фармакології та біології і може бути використана при дослідженні механізмів формування ожиріння та його патогенетичного зв'язку з розвитком широкого кола патологій людини та оцінці біологічних ефектів нових лікарських засобів для лікування як первинного, так і вторинного ожиріння.

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) на сьогодні в різних країнах світу від надмірної ваги та ожиріння страждає від 20 до 60% населення, що загалом складає близько 2 млрд. чоловік [1], при цьому поширеність цієї патології стрімко та постійно зростає, охоплюючи не тільки дорослих, а й дитяче населення [2].

Патогенетичний зв'язок ожиріння з артеріальною гіпертензією, ішемічною хворобою серця, церебральними та нервовими розладами, тяжкими ендокринними захворюваннями, порушеннями опорно-рухового апарату, розладами репродуктивної функції та ін. обумовлює надзвичайно суттєвий негативний вплив цієї патології як на якість та тривалість життя людей, так і на відновлення людської популяції. Боротьба з ожирінням та його наслідками призводить до величезних економічних витрат, особливо в розвинутих країнах [3].

В зв'язку з цим проблема ожиріння є однією з найбільш актуальних медико-соціальних проблем над розв'язанням якої працюють науковці, перш за все, ендокринологічного профілю, оскільки ожиріння є одночасно як причиною, так і наслідком

глибоких метаболічно-гормональних порушень при таких найбільш поширених та важких ендокринопатіях як метаболічний синдром та цукровий діабет 2 типу [4].

Створення адекватних експериментальних моделей ожиріння дозволяє дослідити молекулярно-клітинні механізми утворення надлишкової маси жирової тканини, відокремити внутрішні та зовнішні чинники цього процесу, встановити особливості метаболічних та інкреторних процесів у жировій тканині при ожирінні, оцінити вплив останніх на численні функціональні системи та маніфестацію багатьох клінічних патологій, зокрема на формування метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу.

На сьогодні для моделювання ожиріння використовують два основних підходи - генетичні моделі та моделі, індуковані чинниками довкілля.

Як генетичні моделі ожиріння використовують лінійних тварин. Це миші лінії ob/ob та db/db, щури лінії Obese Zucker Fatty (Fa/fa) та Zucker Diabetic Fatty (ZDF), New Zealand Obese mouse (NZO) [5-7]. Достатньо поширеним є використання також трансгенних або нокаутних за конкретними генами тварин, наприклад, трансгенних мишей з надмірно активованою експресією гена 11 β HSD-1 [8], мишей з надмірною експресією фруктозо-1,6 біфосфатази людини в печінці [9], мишей з IL-6 дефіцитом [10]. Але всім вказаним моделям притаманна висока вартість, а для створення генномодифіко-

(13) **U**
(11) **53260**
(19) **UA**

ваних тварин необхідно мати спеціальне обладнання та персонал відповідної кваліфікації.

Виходячи з того, що формування надлишку жирової тканини залежить від енергетичної цінності та складу вживаної їжі запропоновано ряд моделей ожиріння, що базуються на відтворенні змін якісного складу харчового раціону. Так, для формування у лабораторних тварин ожиріння проводять тривале пероральне введення фруктози, сахарози (цукрози), глюкозаміну та жиру, як окремо, так і в різних комбінаціях [11]. Широкого застосування набула так звана високожирова дієта [12], при якій жири в добовому раціоні щурів складають 60% від загального калоражу. При моделюванні інсулінорезистентності - основної ознаки метаболічного синдрому, з одночасним розвитком дієтичної ожиріння, використовують також такі хімічні сполуки як алоксан, дитизон, стрептозотин, дексаметазон [13]. Останнім часом запропоновано модель з комбінацією чинників: високожирова дієта та стрептозотин [14], при відтворенні якої поряд з гіперглікемією, інсулінорезистентністю розвивається ожиріння, зростають показники неестерифікованих жирних кислот та тригліцеридів у сироватці крові.

На підставі уявлень про пов'язаність метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу в нащадків з умовами їх розвитку в ембріональному періоді було запропоновано ряд моделей відтворення вказаних патологій шляхом порушення харчування вагітної самиці. Вказані моделі базуються на зниженні необхідного калоражу, підвищенні вмісту жирів або порушенні метаболізму глюкокортикоїдів у організмі матері та плодів як шляхом застосування специфічних фармакологічних чинників, так і шляхом операційного втручання [15-19].

Однак ці моделі спрямовані, перш за все, на відтворення таких ознак метаболічного синдрому як гіперглікемія, інсулінорезистентність, гіпертензія, в той час як формування надлишкової жирової тканини розглядається як корелятивний симптом.

Як відомо, запорукою успішної боротьби з будь-яким захворюванням є створення докладної класифікації форм цієї патології на підставі вивчення етіології та патогенезу. На сьогодні загальноприйнятим є розподіл ожиріння на первинне та вторинне (симптоматичне). До первинного ожиріння відносять так звану аліментарно-конституційну форму, а до вторинного - ендокринні форми ожиріння, тобто такі, при яких ендокринні порушення відіграють провідну роль.

В той же час на підставі оцінки кількості, розмірів та активності новоутворення клітин жирової тканини відрізняють гіпертрофічний, гіперпластичний та змішаний (гіпертрофічно-гіперпластичний) типи ожиріння. Гіпертрофічний тип, притаманний аліментарно-конституційній формі ожиріння, характеризується накопиченням ліпідів у жирових клітинах та збільшенням їх розмірів, без ознак активного зростання кількості адипоцитів. Гіперпластичний тип ожиріння супроводжується збільшенням загальної кількості адипоцитів. Вважається, що цей тип ожиріння більш важкий, погано підлягає дієтотерапії та притаманний ендокринним формам ожиріння.

На сьогодні в проблемі ожиріння та його негативних наслідків велика увага приділяється проявам неасептичного запалення, притаманним жировій тканині при гіпертрофічно-гіперпластичному типі її розвитку, характерному для метаболічного синдрому та цукрового діабету 2 типу. Встановлено, що саме вогнища запалення в жировій тканині є джерелом зміни секреції адипокінів, що впливають на дисфункцію β -клітин, на розвиток інсулінорезистентності, підвищують продукцію вільних жирних кислот, сприяючи стеатозу печінки, тобто запалення жирової тканини відіграють патогенетичну роль як у розвитку діабету 2 типу, так і його ускладнень [20].

Крім того, знайдено, що при запаленні в жировій тканині спостерігається активація апоптозу адипоцитів, що є причиною виникнення осередків макрофагальної інфільтрації [21]. Форма кільця або напівкільця, притаманна цим скупченням, дала змогу [22] назвати їх вінець-подібними (crown-like) структурами. Саме ці утворення вважаються структурною ознакою запалення жирової тканини та джерелом цілого переліку адипокінів, що відіграють патогенетичну роль у порушеннях вуглеводного та ліпідного обмінів при метаболічному синдромі та цукровому діабеті 2 типу. Тому створення моделі ожиріння з ознаками запалення конче необхідно для проведення подальших досліджень ролі адипокінів у патогенезі метаболічного синдрому і діабету 2 типу та поглиблення знань про причинно-наслідкові зв'язки між ожирінням та цими ендокринопатіями.

Задача даної корисної моделі полягає в створенні наближеної до реальних життєвих обставин патогенетичної моделі розвитку гіпертрофічно-гіперпластичного типу ожиріння з ознаками неасептичного запалення.

Поставлена задача вирішується тим, що вагітну самицю піддають дії соціально-емоційного стресу з 2 по 8, а потім з 15 по 21 дні вагітності. Отримані нащадки у віці 11 місяців піддаються дії стресу харчової депривації та гіпокінезії.

Технічний результат - розширення арсеналу та підвищення специфічності експериментальних моделей ожиріння шляхом відтворення гіпертрофічно-гіперпластичного типу ожиріння з наявністю ознак неасептичного запалення жирової тканини.

Спосіб апробовано на 35 самцях щурів популяції Вістар - нащадках гестаційно стресованих матерів. Відібрані для експерименту молоді репродуктивнозрілі самиці спаровуються зі статевими активними самцями за відомою методикою [23]. При цьому першим днем вагітності вважають той, коли у вагінальному мазку знаходять сперматозоїди. Вагітну самицю піддають дії соціально-емоційного стресу, для чого її поміщають кожного дня на 12 годин світлової частини доби до клітки, де знаходяться 20-25 статевозрілих невагітних самиць. Решту часу вагітна самиця перебуває в окремій клітці для відпочинку. Таке «занурення» у незнайомий соціум проводять двічі - з 2-го по 8-й день вагітності, а потім з 15-го по 21-й день вагітності. Склад оточення при цьому кожного разу змінюють. Щурята народжуються природним шляхом

та в подальшому утримуються в рекомендованих для цих тварин умовах.

По досягненню тваринами 11-місячного віку їх позбавляють їжі на 2 доби, а через 5 днів після відновлення харчування у них відтворюють стрес гіпокінезії шляхом утримання в спеціальних пеналах (1 година/3 доби). Через 1 місяць після закінчення експерименту тварин зважували, відсепарували та зважували вісцеральну жирову тканину, визначали вагу її мезентеріальної фракції. Мезентеріальний жир фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили заливку в парафін, зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксилін-еозином. Гістологічні препарати досліджені на світловому мікроскопі "Jenaval" (C. Zeiss, Jena), оцінена частота виявлення вогнищ макрофагальної інфільтрації на 100 полів зору [24].

В сироватці крові за допомогою високоспецифічного набору (Mause and rat leptin Elisa) визначали рівень лептину.

Концентрацію неестерифікованих жирних кислот (НЕЖК) у сироватці крові оцінювали фотоколориметрично [25], а рівень тригліцеридів - спектрофотометричним методом [26].

Як контроль використані 11-місячні нащадки інтактних самиць.

Підтвердження наявності ожиріння гіпертрофічно-гіперпластичного типу з ознаками запалення

є результати, отримані нами на 35 самицях щурів популяції Вістар - нащадках гестаційно стресованих матерів у співставленні з результатами дослідження, проведеного на такій же кількості нащадків інтактних самиць.

Отримані дані наведені в таблиці та підтверджені гістологічними дослідженнями (Фіг.1-5).

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що через 1 місяць після закінчення гіпокінезії вага стресованих нащадків та маса їх вісцеральної жирової тканини статистично значуще більша контрольних тварин, що співпадає з виразним зростанням у цієї ж групи концентрації НЕЖК, тригліцеридів та лептину в сироватці крові (табл.)

Гістологічне дослідження зрізів мезентеріальної жирової тканини показало, що основна маса тканини у піддослідних тварин, як і в контрольних, сформована окремими прошарками сполучної тканини, в якій проходять кровоносні судини різного калібру. Часточки складаються з достатньо крупних клітин - адипоцитів, яким притаманна округла або неправильно овальна форма, чіткі клітинні контури, світла, гомогенно зафарбована цитоплазма, плескаті, розташовані ексцентрично ядра. Адипоцити лежать щільно, за розмірами в базальному стані вони різні - від дрібних до крупних (в 2-3 рази більших) (Фіг.1).

Таблиця

Вагові та біохімічні показники обміну нащадків інтактних та ембріонально стресованих самиць щурів, ($\bar{x} \pm S \bar{x}$), n=35

Показники	Групи тварин			
	Контрольні		Стресовані	
	до експерименту	після експерименту	до експерименту	після експерименту
	1	2	3	4
Маса тіла, г	244,4±5,1	246,7±5,2	265,3±6,6 P ₃₋₁ <0,05	273,0±7,4 P ₄₋₁ <0,05 P ₄₋₂ <0,05
Маса вісцеральної жирової тканини, г	8,7±1,6	14,9±1,8	13,3±1,3 P ₃₋₁ <0,05	23,2±3,3 P ₄₋₁ <0,02 P ₄₋₂ <0,05 P ₄₋₃ <0,05
НЕЖК, ммоль/л	0,39±0,06	0,51±0,10	0,94±0,08 P ₃₋₁ <0,05	1,28±0,21 P ₄₋₂ <0,05 P ₄₋₃ <0,05
Тригліцериди, ммоль/л	2,09±0,37	2,40±0,46	3,44±0,28 P ₃₋₁ <0,05	4,70±0,24 P ₄₋₂ <0,05
Лептин	12,64±4,40	16,08±3,46	18,82±3,4	26,64±4,26 P ₄₋₂ <0,05 P ₄₋₃ <0,05

Примітка. P - рівень значущості відмінностей між вказаними групами.

Вже в базальному стані адипоцити стресованих нащадків перебільшують розмір клітин інтактних тварин (Фіг.2), а наприкінці експерименту за рахунок значного накопичення жиру клітини цих щурів стають у 2-4 рази більшими, ніж у базальному стані (Фіг.3).

Разом з тим у жировій тканині щурів - нащадків гестаційно стресованих матерів, що були піддані

дії додаткових стресорів, у великій кількості зустрічаються місця новоутворення жирових клітин. Вогнища гіперплазії різні за розміром (Фіг.4).

Ці місця виглядають як скупчення незрілих жирових клітин - проадипоцитів, характерною ознакою яких є дрібні краплі ліпідів у цитоплазмі, які ще не злилися між собою, за рахунок чого цитоплазма клітин має вигляд решета; ядра часто

ще займають центральне положення. В жировій тканині спостерігаються деструктивні зміни в ендотелії кровоносних судин та діapedез еритроцитів у навколишню сполучну тканину. Загибель гіпертрофічно перероджених адипоцитів індукує формування в таких ділянках скупчень макрофагальних елементів - вінець-подібних структур (Фіг.5).

Таким чином, виразне збільшення маси тіла та вісцеральної жирової тканини з ознаками дисліпідемії (гіпертригліцеридемія, підвищення НЕЖК), з одночасним підвищенням концентрації лептину, а також гістологічно визначене різке збільшення розмірів адипоцитів (гіпертрофія), активне формування осередків їх новоутворення (процес гіперплазії) з одночасною загибеллю частини клітин та активацією макрофагальних елементів свідчить про розвиток у нащадків гестаційно стресованих матерів в умовах дії екзогенних стресорів гіпертрофічно-гіперпластичного типу ожиріння з ознаками запалення.

Спосіб достатньо простий, може бути відтворений у будь-якій науково-дослідній установі, де проводиться вивчення патофізіологічних механізмів розвитку ожиріння та його пов'язаності із всілякими патологіями організму людини.

Література:

1. WHO obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical report Series number 894 [Text]. - Geneva: WHO. - 2000.
2. Hedley, A.A. Overweight and obesity among us children, adolescents and adults. 2001-2002 [Text] / A.A. Hedley, C.L. Ogden, C.L. Jonson // JAMA. - 2002. - Vol.291. - P.2847-2850.
3. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review [Text] / C.A. Monteiro, E.C. Monza, W.L. Conde, B.M. Pokin // Bull. World Helth Organisation. - 2004. - Vol.82. - P.940-946.
4. Ожиріння в практиці кардіолога та ендокринолога [Текст] / О.М. Біловол, О.М. Ковальова, С.С. Попова, О.Б. Тверетінов. - Тернопіль: ГДМУ, Укрмедкнига, 2009. - 618с.
5. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue [Text] / Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei [et al.] // Nature. -1994. - Vol.372. - P.425-432.
6. Bertram, C.E. Animal models and programming of the metabolic syndrome [Text] / C.E. Bertram, M.A. Honson // British Medical. Bulletin. - 2001. - Vol.60. - P.103-121.
7. Terrettaz, J. Contribution of glycerol and alanine to basal hepatic glucose production in the genetically obese (fa/fa) rat [Text] / J. Terrettaz, B. Jeanrenaud // Biochem J. - 1990. - Vol.3. - P.803-807.
8. A Transgenic Model of Visceral Obesity and the Metabolic Syndrome [Text] / H. Masuzaki, J. Paterson, H. Shinyama [et al.] // Science. - 2001. - Vol. 294. - P. 2166-2170.
9. Expression of Human Fructose-1,6-Bisphosphatase in the Liver of Transgenic Mice Results in Increased Glycerol Gluconeogenesis [Text] / B.J. Lamont, S. Visinoni, B.C. Fam [et al.] // Endocrinology. - 2006. - Vol.147. - P.2764-2772.

10. biterleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity [Text] / V. Wallenius, K. Wallenius, B. Ahren [et al.] // Nat Med. - 2002. - Vol.8, N 1. - P.75-79.

11. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat [Text] / M.J. Reed, K. Mesraros, L.J. Entes [et al.] // Metabolism. - 2000. - Vol. 49, N11. - P.1390-1394.

12. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin [Text] / S. Song, S. Andrikopoulos, C. Filippis [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. - 2001. - V.281, №2. - P.E275-282.

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

14. Пат. 38466 UA, МПК G09B23/28 (2008.1). Спосіб моделювання цукрового діабету 2 типу у щурів [Текст] / О.І. Гладких, В.В. Полтораки, Н.С. Красова [та ін.] (UA); заявник і патентовласник ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського АМН України» (UA). - №U200810259; заявл. 11.08.2008; опубл. 12.01.2009, Бюл. №1. - 8с.

15. Snoeck, A. Effects of low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas [Text] / A. Snoeck, C. Remade, B. Reuseus // Biol. Neonate. - 1990. - Vol.57. - P.107-118.

16. Anguita, R. bitrauterine food restriction is associated with obesity in yong rats [Text] / R. Anguita, D. Sigulem, A. Sawaya // J. Nutr. - 1993. - Vol.123. - P.1421-1428.

17. Guo, F. High fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats [Text] / F. Guo, K. Jen // Physiol. Behav. - 1995. - Vol.57. - P.681-686.

18. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 1 lp-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone [Text] / R.S. Lindsay, R.M. Lindsay, B.J. Waddell, J.R. Seckl // Diabetologia. - 1996. - Vol.39. - P.1299-1305.

19. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring [Text] / M.J. Nyirenda, R.S. Lindsay, C.J. Kenyon [et al.] // J. Clin. Invest. - 1998. - Vol.101. - P.2174-2181.

20. Шварц, В. Воспаление жировой ткани [Текст] / В. Шварц // Проблемы эндокринологии. - 2009. - Т.55, №4. - С.44-49.

21. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue [Text] / S. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum // J. Clin. Invest. - 2003. - Vol.112. - P.1796-1808.

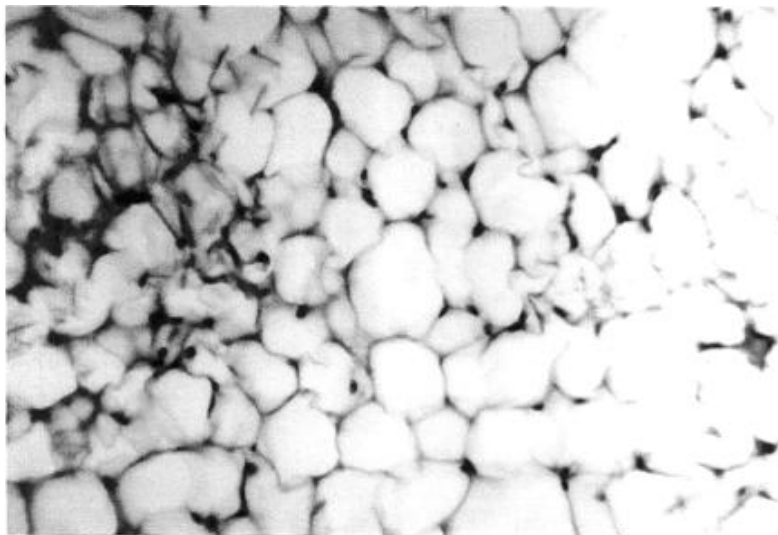
22. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice [Text] / I. Murano, G. Barbatelli, V. Parisani [et al.] // J. Lipid Research. - 2008. - Vol.49. - 1562-1568.

23. Pratt, N. C Effect of social stress during early pregnancy on litter, size, and sex ratio in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) [Text] / N.C. Pratt, R.D. Lisk // J. Reprod. Fertil. - 1989. - Vol.87. - P.763-769.

24. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфология [Текст] / Г. Г. Автандилов. - М.: Медицина, 1990. - 379с.

25. 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.

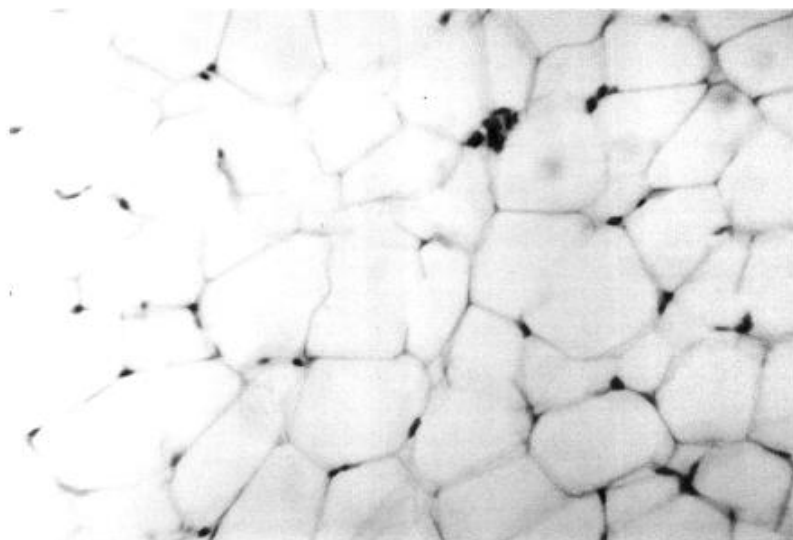
26. Прохорова, Н.И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену [Текст] / Н.И. Прохорова, З.И. Тупикова. - М.: Изд-во Ленингр. унта, 1965. - 168с.



Гістоструктура мезентеріальної жирової тканини самиці щура – нашадка інтактної матері.

Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. х 300.

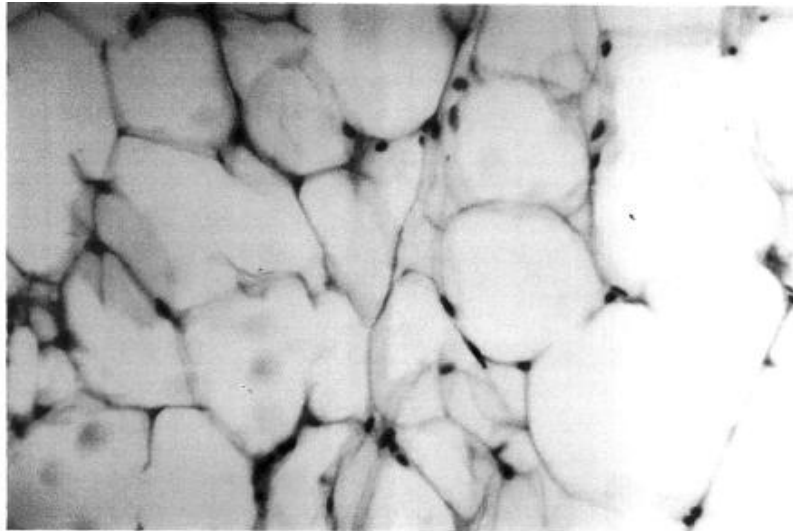
Fig. 1



Гістоструктура мезентеріальної жирової тканини самиці щура – нашадка гестаційно стресованої матері.

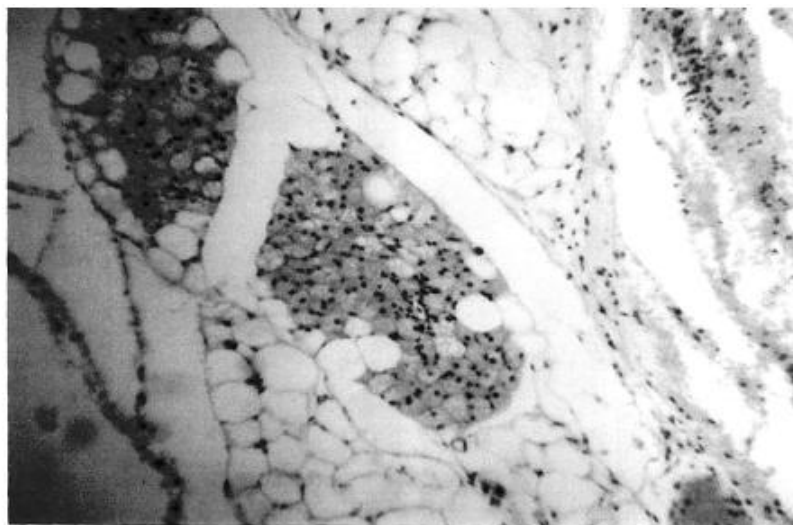
Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. х 300.

Fig. 2



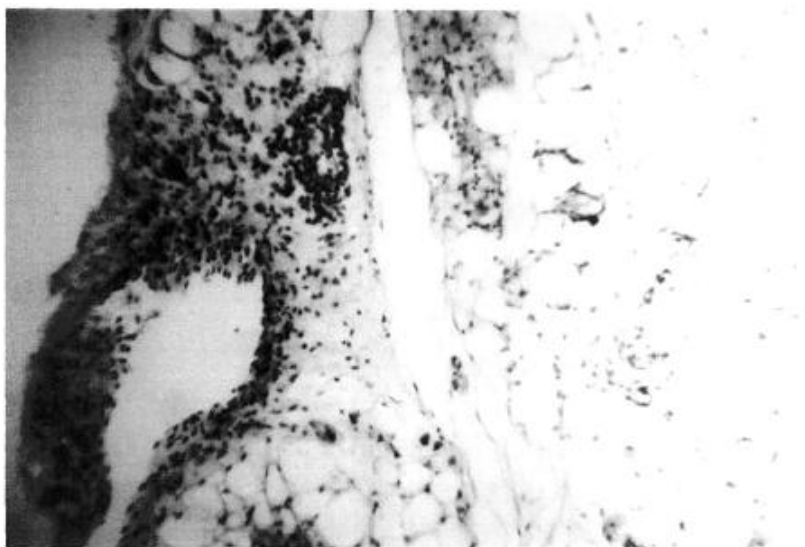
Гістоструктура мезентеріальної жирової тканини самиці щура – нащадка гестаційно стресованої матері після додаткового стресування. Гіпертрофія адипоцитів. Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. х 300.

Фіг. 3



Гістоструктура мезентеріальної жирової тканини самиці щура – нащадка гестаційно стресованої матері після додаткового стресування. Вогнища гіперплазії адипоцитів.

Фіг. 4



Гістоструктура мезентеріальної жирової тканини самиці щура – нащадка гестаційно стресованої матері після додаткового стресування. Вогнище гіперплазії адипоцитів та лімфоцитарної інфільтрації (growth-like формування).

Мікрофото. Фарбування геметоксилін-еозином, зб. х 150.

Fig. 5