



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
*G09B 23/28* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2019123999, 30.07.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.07.2019

Дата регистрации:  
24.01.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.07.2019

(45) Опубликовано: 24.01.2020 Бюл. № 3

Адрес для переписки:

308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.  
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой  
Н.Д.

(72) Автор(ы):

Покровский Михаил Владимирович (RU),  
Гудырев Олег Сергеевич (RU),  
Замыцкий Ярослав Михайлович (RU),  
Солдатов Владислав Олегович (RU),  
Поветка Елена Евгеньевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего  
образования "Белгородский государственный  
национальный исследовательский  
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2400822 C1, 27.09.2010. RU  
2534411 C1, 27.11.2014. RU 2611936 C1,  
01.03.2017. А.А. Спасов, М.П. Воронкова, Г.Л.  
Снигур, Н.И. Чепляева, В.М. Чепурнова  
Экспериментальная модель сахарного диабета  
типа 2. Биомедицина. 2011.

(54) Способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета у крыс

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии, и может быть использовано для изучения патофизиологии остеопороза на фоне сахарного диабета и поиска инновационных препаратов для лечения осложнений сахарного диабета. Способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета включает однократное введение стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг внутривенно в хвостовую вену крысам линии Wistar с дальнейшим мониторингом уровня гликемии, затем через 7 дней от первого введения

производится повторное введение стрептозотоцина в дозе 20 мг/кг животным с уровнем гликемии менее 15 ммоль/л, после чего на 57 сутки при помощи аппарата мультиспектральной системы визуализации проводят анализ плотности костной ткани. Изобретение обеспечивает снижение летальности у животных с высокой чувствительностью к стрептозотоцину и снижение процента выздоровления у животных с низкой чувствительностью к стрептозотоцину. 1 табл., 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*G09B 23/28* (2019.08)

(21)(22) Application: **2019123999, 30.07.2019**

(24) Effective date for property rights:  
**30.07.2019**

Registration date:  
**24.01.2020**

Priority:

(22) Date of filing: **30.07.2019**

(45) Date of publication: **24.01.2020** Bull. № 3

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.  
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovoj N.D.**

(72) Inventor(s):

**Pokrovskij Mikhail Vladimirovich (RU),  
Gudyrev Oleg Sergeevich (RU),  
Zamytskij Yaroslav Mikhailovich (RU),  
Soldatov Vladislav Olegovich (RU),  
Povetka Elena Evgenevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe  
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj  
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU  
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR MODELING OSTEOPOROSIS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS IN RATS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, particularly to experimental pharmacology, and can be used for studying the pathophysiology of osteoporosis on the background of diabetes mellitus and searching for innovative preparations for treating complications of diabetes mellitus. A method for modeling osteoporosis with a background of streptozotocin-induced diabetes mellitus involves administering streptozotocin single dose 45 mg/kg intravenously into a tail vein in Wistar rats with further glycemia

monitoring, then 7 days after the first introduction, streptozotocin 20 mg/kg is repeated in animals with glycemia level less than 15 mmol/l; thereafter, bone density is analyzed on 57<sup>th</sup> day using a multispectral imaging system apparatus.

EFFECT: invention provides reduced mortality in animals with high sensitivity to streptozotocin and reduced percentage of recovery in animals with low susceptibility to streptozotocin.

1 cl, 1 tbl, 1 ex

Изобретение относится к медицине, в частности к экспериментальной фармакологии.

Согласно литературным источникам на сегодняшний день сахарный диабет является одной из актуальных медико-социальных проблем современного общества. Рост заболеваемости позволяет говорить о глобальной эпидемии сахарного диабета (Javeed N, Matveyenko AV. Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. Physiology (Bethesda). 2018;33(2):138-150. DOI: 10.1152/physiol.00003.2018; Schmidt AM. Highlighting Diabetes Mellitus: The Epidemic Continues. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(1):e1-e8. DOI: 10.1161/ATVBAHA.117.310221). Широкая распространенность сахарного диабета и многообразие патогенетических вариантов данного заболевания обуславливают актуальность поиска и разработки новых пероральных противодиабетических препаратов.

Одним из закономерно вытекающих осложнений сахарного диабета является постепенное снижение плотности костной ткани, приводящее к развитию остеопороза.

Для изучения патофизиологических изменений, в том числе и остеопороза, у экспериментальных животных на фоне сахарного диабета и поиска инновационных препаратов для лечения осложнений сахарного диабета в лабораторной практике наибольшее распространение получили стрептозотоцин-индуцированные модели СД. (А.А.Спасов, М.П.Воронкова, Г.Л.Снигур, Н.И.Чепляева, В.М.Чепурнова Экспериментальная модель сахарного диабета типа 2. Биомедицина. 2011. №3 С. 12-18).

Недостатком данного решения является то, что моделирование остеопороза на фоне СД требует поддержания гипергликемии в течение длительного времени, а при известных схемах моделирования стрептозотоцин-индуцированного СД происходит выбывание значительной части экспериментальных животных вследствие гибели или выздоровления. При описанной методике введение стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг осуществляется внутрибрюшинно, что протекает с образованием спаечных процессов кишечника ввиду агрессивности среды вводимого вещества и требует предварительного введения никотинамида в дозе 230 мг/кг.

Задачей предлагаемого изобретения является создание более эффективного способа моделирования сахарного диабета у крыс, позволяющего сформировать остеопоротические нарушения в костной ткани с сохранением большего количества животных в эксперименте и получением стабильно высоких цифр гипергликемии на протяжении длительного периода.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного СД, подтверждаемый морфологическими изменениями костной ткани при микроскопии, снижением плотности костной ткани при денситометрии, а также низкой летальностью животных и стабильной гипергликемией.

Поставленная задача достигается тем, что предложен способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, включающий однократное введение стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг внутривенно в хвостовую вену крысам линии Wistar с дальнейшим мониторингом уровня гликемии, затем через 7 дней от первого введения повторное введение стрептозотоцина в дозе 20 мг/кг животным с уровнем гликемии менее 15 ммоль/л, после чего на 57 сутки при помощи аппарата мультиспектральной системы визуализации проводят анализ плотности костной ткани.

Основным преимуществом предлагаемого способа является двухэтапное введение стрептозотоцина, позволяющее снизить летальность у животных с высокой чувствительностью к стрептозотоцину и снизить процент выздоровления у животных

с низкой чувствительностью к стрептозотоцину.

### СПОСОБ ОСУЩЕСТВЛЯЕТСЯ СЛЕДУЮЩИМ ОБРАЗОМ

Исследование проводилось на 50 самцах крыс линии Wistar массой 200-250 г. Введение стрептозотоцина в 0,1 М цитратном буфере производили натошак в хвостовую вену, после чего в течение 24-48 ч экспериментальным животным заменяли воду на 5 % раствор глюкозы.

Первое введение стрептозотоцина в дозе 45 мг/кг проводилось всем крысам. Через 7 дней после первого введения животным, имеющим уровень гликемии ниже 15 ммоль/л производили повторное введение стрептозотоцина в дозе 20 мг/кг. В течение эксперимента животные содержались в индивидуальных клетках, ежедневно фиксировались уровень глюкозы крови (Select OneTouch), объем выпитой жидкости и масса потребляемого корма.

На 3 сутки после начала эксперимента количество умерших крыс составило 7. Средняя концентрация глюкозы крови у выживших животных составил  $14,1 \pm 2,7$  ммоль/л. В последующие дни у 10 крыс из 43 наблюдалась тенденция к стойкому увеличению уровня глюкозы (<20 ммоль/л), в то время как у оставшихся уровень гликемии постепенно снижался, доходя до физиологических значений к седьмому дню эксперимента. После повторного введения стрептозотоцина у 51,5 % произошло стойкое повышение уровня глюкозы крови выше 20 ммоль/л, оставшиеся животные были исключены из эксперимента.

В последующие 1,5 месяца эксперимента у 55% животных уровень глюкозы составил от 20 до 33 ммоль/л и у 45% - выше 33 ммоль/л.

Было замечено, что животные, потреблявшие более 150 мл воды за сутки, имели уровень глюкозы крови выше 33,3 ммоль/л. Кроме того, в ходе наблюдений экспериментально был отработан оптимальный режим кормления крыс – 2 раза в день, утром и вечером, что обеспечило стабильно высокий уровень гипергликемии.

У 7 крыс в эксперименте возникло нагноение хвоста в месте инъекции стрептозотоцина, которое наблюдалось на 2-3 неделе наблюдения. Это нагноение интерпретировано как следствие паравазального введения стрептозотоцина и устранено с помощью обработки фукорцином.

На 57-е сутки при помощи аппарата мультиспектральной системы визуализации In-Vivo MS FX PRO производства компании Bruker с программным модулем денситометрии проводили анализ плотности костной ткани. Денситометрию проводили на изъятых и очищенных от окружающих тканей бедренных костях *ex vivo*. Анализу подвергались три участка бедренной кости: дистальный и проксимальный метафизы и диафиз. Учитывались следующие показатели: «Bone column density» (BCD) – характеризует степень затухания рентгеновского излучения при прохождении через столб длинной трубчатой кости; «Bone Surface Density» (BSD) – плотность поверхности костной ткани в изучаемой локализации. Первичные результаты подвергали статистической обработке в MS Excel с расчетом в группах средних значений и стандартных ошибок; достоверность отличий определяли по t-тесту Стьюдента.

### ПРИМЕР КОНКРЕТНОГО ВЫПОЛНЕНИЯ

Уровень глюкозы в крови у крыс с моделированием СД начиная с 3-го дня после введения стрептозотоцина достоверно превосходил таковой у интактных животных. При этом уровень гипергликемии нарастал в течение 21 дня, а затем держался на достигнутом уровне ( $\pm 10\%$ ) до конца исследования.

При проведении денситометрии на 57 сутки обнаружили статистически значимое снижение изучаемых показателей плотности костной ткани у крыс с СД по сравнению

с интактными животными, кроме того, изучаемые показатели варьировали в зависимости от области исследования.

Так, значения показателя «Bone column density» (BCD) составили у интактных крыс: в проксимальном метафизе –  $7,04 \pm 0,18 \text{ г/см}^3$ , в диафизе –  $8,93 \pm 0,05 \text{ г/см}^3$ , в дистальном метафизе –  $6,71 \pm 0,29 \text{ г/см}^3$ . В то же время значения данного показателя у крыс с СД равнялись  $6,11 \pm 0,11 \text{ г/см}^3$ ,  $7,99 \pm 0,09 \text{ г/см}^3$  и  $5,88 \pm 0,25 \text{ г/см}^3$  соответственно ( $p < 0,001$ ). Значения показателя «Bone Surface Density» (BSD) составили у интактных крыс: в проксимальном метафизе –  $0,292 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$ , в диафизе –  $0,129 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$ , в дистальном метафизе –  $0,296 \pm 0,02 \text{ г/см}^2$ . В то же время значения данного показателя у крыс с СД равнялись  $0,22 \pm 0,02 \text{ г/см}^2$  ( $p < 0,05$ ),  $0,124 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$  ( $p > 0,05$ ), и  $0,225 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$  соответственно ( $p < 0,05$ ). Результаты денситометрического исследования бедренной кости *ex vivo* у крыс с 8-недельным сахарным диабетом и интактных животных приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Денситометрические показатели	Интактные крысы			Крысы с СД 8 недель		
	Проксимальный метафиз	Диафиз	Дистальный метафиз	Проксимальный метафиз	Диафиз	Дистальный метафиз
«Bone column density» (BCD)	$7,04 \pm 0,18 \text{ г/см}^3$	$8,93 \pm 0,05 \text{ г/см}^3$	$6,71 \pm 0,29 \text{ г/см}^3$	$6,11 \pm 0,11 \text{ г/см}^3$ *	$7,99 \pm 0,09 \text{ г/см}^3$ *	$5,88 \pm 0,25 \text{ г/см}^3$ *
«Bone Surface Density» (BSD)	$0,292 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$	$0,129 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$	$0,296 \pm 0,02 \text{ г/см}^2$	$0,22 \pm 0,02 \text{ г/см}^2$ *	$0,124 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$	$0,225 \pm 0,001 \text{ г/см}^2$ *

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  в сравнении с группой интактных животных.

Таким образом, применение предлагаемого изобретения позволит создавать более эффективный способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, подтверждаемого морфологическими изменениями костной ткани при микроскопии, снижением плотности костной ткани при денситометрии, а также низкой летальностью животных и стабильной гипергликемией.

#### (57) Формула изобретения

Способ моделирования остеопороза на фоне стрептозотоцин-индуцированного сахарного диабета, включающий однократное введение стрептозотоцина в дозе  $45 \text{ мг/кг}$  внутривенно в хвостовую вену крысам линии Wistar с дальнейшим мониторингом уровня гликемии, затем через 7 дней от первого введения повторное введение

стрептозотоцина в дозе 20 мг/кг животным с уровнем гликемии менее 15 ммоль/л, после чего на 57 сутки при помощи аппарата мультиспектральной системы визуализации проводят анализ плотности костной ткани.

5

10

15

20

25

30

35

40

45