



ISSN 2072-2419

№ 3

Международный ВЕСТНИК ВЕТЕРИНАРИИ

INTERNATIONAL BULLETIN
OF VETERINARY MEDICINE



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ - 2016

www.spbgavm.ru

	• Тромбоцитарная агрегационная активность у телят айрширской породы молочного питания. <i>Медведев И.Н., Ошуркова Ю.Л.</i>	93
	• Методические основы повышения квалификации для работы с лабораторными животными. Сообщение 1. <i>Уша Б. В., Луцай В.И., Концевая С.Ю., Фатеева Е.И.</i>	99
Хирургия	• Информативность показателей системы гемостаза у собак при хирургических операциях. <i>Баруздина Е.С.</i>	107
	• Препараты Т-НEXX для профилактики и лечения язвы рустергольца у коров. <i>Стекольников А. А., Ладанова М. А.</i>	111
	• Диагностика и лечение ассоциированной эрозивно-язвенной бактериальной инфекции хвостовой лопасти у белухи. <i>Капустина Е.Ю, Смирнова Л.И.</i>	116
	• Температурный мониторинг при использовании тромбоцитарной аутоплазмы в лечении ран и язв у животных. <i>Семенов Б.С., Кузнецова Т.Ш., Гусева В.А.</i>	119
Акушерство гинекология	• Коррекция нарушений минерального обмена и восстановление воспроизводительной функции у коров при применении препарата «Маримикс». <i>Дорохова Я.Д., Племяшов К.В.</i>	124
	• Комбинированный противозендометритный препарат метрин. <i>Андреева Н.Л., Соколов В.Д., Евелева В.В.</i>	128
Незаразные болезни	• Распространение и клинико-гематологическая характеристика гепатоза у высокопродуктивных коров. <i>Курдеко А.П.</i>	133
	• Эффективность медикаментозного лечения мочекаменной болезни у норок. <i>Яшин А.В., Щербаков Г.Г., Куляков Г.В, Киселенко П.С.</i>	138
	• Физиологизация состояния гемостаза у новорожденных телят с дефицитом железа в результате применения ферроглюкина, полизона и крезацина. <i>Завалишина С.Ю.</i>	142
	• Роль различных звеньев врожденного иммунитета в патогенезе бронхопневмонии у свиней. <i>Крячко О. В.</i>	149
Экспериментальная фармакология	• Особенности проведения глюкозотолерантного теста у мелких лабораторных грызунов (мыши и крысы). <i>Горячева М.А., Макарова М.Н.</i>	155
	• Обзор экспериментальных моделей для изучения препаратов, применяемых при кожных заболеваниях. <i>Ковалева М.А., Крышень К.Л., Макарова М.Н., Алякринская А.А.</i>	160
	• Карликовые свиньи как объект доклинических исследований. <i>Рыбакова А.В., Ковалева М.А., Калатанова А.В., Ванатиев Г.В., Макарова М.Н.</i>	168
	• Математическая статистика в ветеринарии. малые независимые выборки. <i>Иголинская М.К., Смирнова Е.М., Лебединская Н.А.</i>	177
	• Математическая статистика в ветеринарии. малые зависимые выборки. <i>Иголинская М.К., Смирнова Е.М., Лебединская Н.А.</i>	181



ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНОГО ТЕСТА У МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ГРЫЗУНОВ (МЫШИ И КРЫСЫ)

Горячева М.А. – фармаколог, Макарова М.Н. – д.м.н., директор (ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»)

Ключевые слова: глюкозотолерантный тест, концентрация глюкозы, время голодания животных. Key words: glucose tolerance test, concentration of glucose, animals fasting time.



РЕФЕРАТ

Глюкозотолерантный тест (ГТТ) является лабораторным методом оценки метаболизма глюкозы в организме, в ходе которого уровень глюкозы измеряется натощак и затем через каждые 30 минут в течение 2 часов после углеводной нагрузки (введения глюкозы). В «классическом тесте» концентрация глюкозы измеряется в 5 точках: до углеводной нагрузки (натощак - фон), затем через 30, 60, 90 и 120 минут после. В клинической практике, в зависимости от целей, анализ может быть выполнен в трех или двух точках. Стандартная углеводная нагрузка для человека составляет 75 г глюкозы в не зависимости от массы тела. На основании результатов теста строят график, который позволяет охарактеризовать этапы метаболизма глюкозы. Нарастание ее уровня после углеводной нагрузки называется гипергликемической фазой и отражает особенности всасывания глюкозы. Снижение уровня глюкозы называется гипогликемической фазой и косвенно отражает скорость выработки инсулина и чувствительность тканей к данному гормону. Последняя фаза нарушена у пациентов с преддиабетом (нарушением толерантности к глюкозе) и сахарным диабетом 2-го типа (СД). Оценка гипогликемической фазы имеет ведущее значение в диагностике СД у пациентов, в случае если заболевание протекает бессимптомно. Кроме того, с помощью ГТТ можно рассчитать два дополнительных критерия, гипергликемический и постгликемический коэффициенты, которые также используются для оценки метаболизма глюкозы.

В связи с высокой информативностью и простотой выполнения ГТТ широко используется при выполнении доклинических исследований. Приведенные в статье методики выполнения ГТТ позволяют получать стабильные результаты и адекватно оценивать состояние углеводного обмена у лабораторных животных.

ВВЕДЕНИЕ

Глюкозотолерантный тест является наиболее распространенным исследованием в эндокринологии для диагностики нарушения толерантности к глюкозе и

сахарного диабета. В ходе проведения теста уровень глюкозы измеряют натощак и затем через каждые 30 минут в течение 2 часов после углеводной нагрузки. У человека, как правило, под тощаковой

гликемией понимают концентрацию глюкозы в крови после ночного голодания (около 12-16 часов). В клинической практике используют стандартную нагрузку глюкозой в количестве 75 г. без поправки на массу тела пациента. Референтные значения концентрации глюкозы в крови приведены в таблице 1.

При проведении ГТТ у мелких лабораторных животных (мышей и крыс) в ходе доклинического исследования существует стандартный подход к выбору дозы углеводной нагрузки, которая составляет 2 г/кг [2,6]. В литературных источниках приведены данные о влиянии различных факторов на результат. При проведении ГТТ рекомендовано включать в исследование животных схожего возраста, пола, вида, линии [4,5]. Предложены рекомендации по отбору проб крови, который зависит от используемой тест-системы, желаемого объема образца, навыков исследователя и других факторов. В случае проведения только ГТТ оптимально проводить забор микроколичеств крови с последующей экспрес-оценкой концентрации глюкозы с использованием глюкометров. Данный метод оправдан, поскольку позволяет визуализировать данные в реальном времени и уменьшать влияние стресса. Так, для мышей представлены убедительные данные, свидетельствующие о том, что длительная фиксация животного при взятии крови приводит к искажению реальной концентрации глюкозы в крови. Авторы связывают данный факт с развитием у животного стресса, что в свою очередь приводит к увеличению концентрации катехоламинов следовательно, к быстрому увеличению концентрации глюкозы в крови [3]. Не однозначно описано время голодания лабораторных животных перед определением фоновых значений концентраций глюкозы. В литературных источниках предложено использовать время голодание 4-5 часов (в утреннее время) или 14-16 часов (в ночное время). Ряд

авторов полагает, что длительное голодание (свыше 14 часов) активирует катаболические процессы [7], что в дальнейшем может приводить к искажению данных, полученных в ходе ГТТ. При данном режиме голодания у мышей регистрируют уменьшение массы тела в среднем на 15% [3]. В литературных источниках описываются 2 основных пути введения глюкозы: внутрибрюшинный и внутрижелудочный [6]. Последний является более физиологичным.

На основании вышеизложенного целью нашего исследования стало определение оптимального срока голодания лабораторных мышей и крыс, сравнительное изучение данных ГТТ при разных путях введения углеводной нагрузки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на мышах аутбредных самцах и аутбредных крысах самцах, возраст животных 10-12 недель. Исследование проводили в два этапа. Животные содержались в стандартных условиях вивария. На первом этапе определяли концентрацию глюкозы в крови в зависимости от времени голодания животных. Для первого этапа исследования животные были рандомизированы и разделены на 2 группы по 12 животных: 1-ая – аутбредные мыши самцы; 2-ая аутбредные крысы самцы [1]. Животных лишали корма (при этом доступ к воде был не ограничен). Измерение концентрации глюкозы проводили спустя 4, 6, 8 и 16 часов, с целью определения оптимального времени голодания лабораторных животных. На втором этапе исследования каждая экспериментальная группа была разделена на две подгруппы (А и Б по 6 животных в каждой) для проведения ГТТ. Лабораторные животные получали углеводную нагрузку однократно в дозе 2 г/кг. Подгруппам А раствор глюкозы вводили внутрижелудочно с использованием атравматичного зонда, подгруппам Б – внутрибрюшинно. Концентрацию глюко-

зы измеряли до углеводной нагрузки (фон) и спустя 30, 60, 90 и 120 минут после.

Концентрацию глюкозы определяли в цельной крови с использованием глюкометра OneTouch Ultra®. Для этого по ходу хвостовой вены животного (как у крыс, так и у мышей) медицинской иглой делали прокол, подносили прибор с вставленной тест-полоской, глюкометр автоматически отбирал 1,5 мкл крови. Метод определения глюкозы электрохимический, в основе которого лежит биосенсорный глюкозо-оксидазный принцип.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе первого этапа исследования у лабораторных мышей и крыс определяли концентрацию глюкозы в периферической крови спустя 4, 6, 8 и 16 часов голодания. Полученные данные представлены в таблице 2.

Из данных таблицы видно, что наименьшее значение концентрации глюкозы

в крови у мышей и крыс установлено спустя 16 часов голодания. Однако спустя 8 часов голодания концентрация глюкозы (как у крыс, так и у мышей) была статистически значимо ниже по сравнению со значением данного показателя до лишения животных корма. Перед измерением концентрации глюкозы спустя 16 часов голодания у животных дополнительно была определена масса тела. У мышей уменьшение данного показателя по отношению к массе тела животных до лишения корма составило в среднем 5%, у крыс 3%. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что оптимальное время голодания для лабораторных грызунов составляет 8-16 часов.

На втором этапе исследования у мышей и крыс проводили ГТТ, глюкозу вводили в дозе 2 г/кг внутривентриально и внутривентриально. В ходе исследования было установлено, что гипергликемиче-

Таблица 1
Референтные значения концентрации глюкозы в крови здорового человека при проведении ГТТ

Время измерения	Концентрация глюкозы, ммоль/л
Глюкоза натощак	4,1 - 5,9
Глюкоза через 30 мин. после глюкозной нагрузки	6,1- 9,4
Глюкоза через 60 мин. после глюкозной нагрузки	6,7- 9,4
Глюкоза через 90 мин. после глюкозной нагрузки	5,6- 7,8
Глюкоза через 120 мин. после глюкозной нагрузки	4,1- 6,7

Таблица 2
Концентрация глюкозы в периферической крови (ммоль/л) животных в зависимости от времени голодания

Вид животных	Концентрация глюкозы до лишения корма	Время голодания, часы			
		4	6	8	16
Мыши	6,4±0,6	6,0±0,5	5,9±0,3	4,8±0,2*	4,2±0,4*
Крысы	6,8±0,7	6,2±0,3	5,7±0,2	5,2±0,1*	4,3±0,1*

* - $p < 0,05$ t – критерий Стьюдента

ская кривая у мышей имела схожий характер вне зависимости от пути введения глюкозы в организм животного (рис. 1, 2).

У крыс при внутрибрюшинном введении углеводной нагрузки наблюдали более выраженное повышение концентрации глюкозы на 30 минуте (рис. 3). Однако к 120 минуте концентрация глюкозы имела сходные значения (рис. 4) и в среднем составляла 6 ммоль/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных оптимальное время голодания животных (мыши, крысы) в исследовании составляет 8-16 часов. Для проведения ГТТ у мышей могут быть использованы два пути введения углеводной нагрузки (внутрибрюшинный и внутрижелудочный). У крыс характер гликемической кривой в зависимости от пути введения

был различным. Для данного вида животных рекомендовано использовать внутрижелудочный путь введения глюкозы. В ходе планирования доклинического исследования при выборе пути введения углеводной нагрузки следует учитывать, что внутрижелудочное введение глюкозы является более физиологичным, что позволяет адекватно воспроизводить методику ГТТ для оценки метаболизма глюкозы.

Special aspects of glucose tolerance test in small laboratory rodents (mice and rats). M. Goryacheva, M. Makarova

ABSTRACT

Glucose tolerance test (GTT) is a laboratory procedure for estimation of glucose metabolism in the body, when first fasting glucose level is measured, and then – it is checked every 30 minutes within 2 hours after glucose load has been given. In a

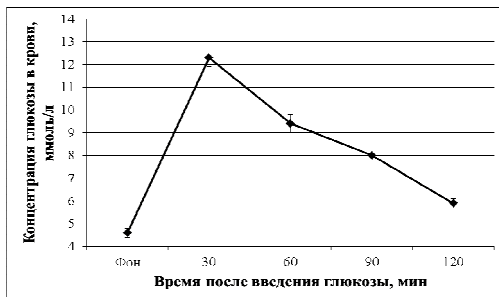


Рисунок 1 – Результаты ГТТ у мышей самцов после внутрибрюшинного введения глюкозы



Рисунок 2 – Результаты ГТТ у мышей самцов после внутрижелудочного введения глюкозы

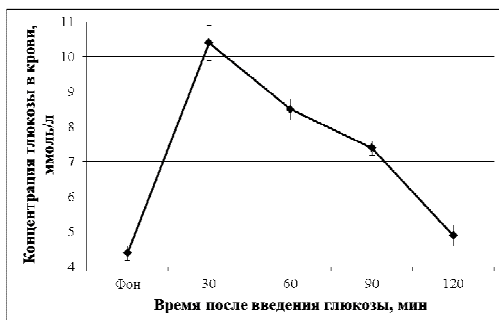


Рисунок 3 – Результаты ГТТ у крыс самцов после внутрибрюшинного введения глюкозы



Рисунок 4 – Результаты ГТТ у крыс самцов после внутрижелудочного введения глюкозы

"classical test" glucose concentration is measured five times: before glucose load (fasting - baseline), in 30, 60, 90 and 120 minutes afterwards. In clinical practice, depending on the purposes, the analysis can be performed two or three times. A standard glucose load for a man is 75 g of glucose irrespectively of body weight. The chart characterizing different stages of glucose metabolism is built on the results of the test. Increase of glucose level after a glucose load is called hyperglycemic phase and it reflects characteristics of glucose absorption. Decrease of glucose level is called hypoglycemic phase and it indirectly reflects the rate of insulin secretion and sensitivity of tissues to this hormone. The last phase is disturbed in patients with pre-diabetes (impaired glucose tolerance) or diabetes mellitus type 2. Evaluation of hypoglycemic phase has a leading role in the diagnostics of diabetes in patients, if the disease has asymptomatic character. Furthermore, using GTT one can calculate two additional criteria, hyperglycemic and post-glycemic indexes, which are also used for estimation of glucose metabolism.

Due to the fact that GTT is highly informative and easy to perform it is widely used in pre-clinical trials. Procedure for performing GTT described in this article makes it possible to obtain reliable results and adequately estimate condition of carbohydrate metabolism in laboratory animals.

ЛИТЕРАТУРА

1. Селезнева, А. И. Методы рандомизации

животных в эксперименте / А. И. Селезнева, М. Н. Макарова, А. В. Рыбакова // *Международ. вестн. ветеринарии*. - 2014. - № 2. - С. 84-89.

2. Argmann, C. A. Evaluation of glucose homeostasis / C. A. Argmann, M. F. Champy, J. Auwerx // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* - 2007. - Chap. 29, Unit 29B-23. - P.27-73.

3. Considerations in the design of hyperinsulinemic-euglycemic clamps in the conscious mouse / J. E. Ayala, D. P. Bracy, O. P. McGuinness, D.H. Wasserman // *Diabetes*. - 2006. - Vol. 55. - P. 390-397.

4. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats / C. R. Carvalho, S. L. Brenelli, A. C. Silva, A. L. Nunes, L. A. Velloso, M.J. Saad // *Endocrinology*. - 1996. - Vol. 137. - P.151-159.

5. Gender and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism / Y. Macotela, J. Boucher, T. Tran, C.R. Kahn // *Diabetes*. - 2009. - Vol. 58. - P. 803-812.

6. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage/ R. Muniyappa, S. Lee, H. Chen, M.J. Quon // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 294. P. E15-E26.

7. The full expression of fasting-induced torpor requires beta 3-adrenergic receptor signaling / S. J. Swoap, M.J. Gutilla, L.C. Liles, R.O. Smith, D. Weinschenker // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. P. 241-245.

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающимся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц. Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

Тел/факс (812) 365-69-35, Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com