

**Centar za Biomedicinska Istraživanja
Beograd**

Eksperiment - protokol

Tema: Ispitivanje lekovitih svojstava vode sa izvorišta Slavkovića na dijabetičnim pacovima i njen uticaj na dalji tok bolesti.

2010.

USLOVI

Lokacija: Centar za Biomedicinska Istraživanja, Institut Galenika.

Datum: početak eksperimenta 16.11.2010.
završetak eksperimenta: 27.12.2010

Temperatura vazduha: 21°-26° C

Vlažnost vazduha: 60-70%

Dnevni ciklus: veštačka svetlost, 12 sati svetlo, 12 sati mrak.

Ishrana: Svi pacovi koriste granule za pacove koje proizvodi Vetzavod Subotica.

Smeštaj: pacovi su čuvani pojedinačno u kavezima, sa podlogom od piljevine koje je menjana jednom do dva puta nedeljno.

Eksperiment

Cilj: Ispitati lekovita svojstva vode sa izvorišta Slavkovic, na snižavanje nivoa glukoze u krvi.

Tema: Ispitivanje lekovitih svojstava vode sa izvorišta Slavkovic na dijabetičnim pacovima i njen uticaj na dalji tok bolesti.

Eksperimentalne životinje: 24 pacova, mužjaci, Wistar soj, adultne jedinke stare 60 dana, teške 250g, koji su okoćeni 18.09.2010. a odvojeni su 14.10.2010.

Materijal i pribor:

- voda sa izvorišta Slavkovic
- česmenska voda
- streptozotocin (STZ)
- 0,1M Na-citrat-ni pufer ph 4.5
- hrana za pacove
- kavezi

- pojilice (graduísane boce sa specijalnim nastavkom)
- digitalna vaga
- aparat za merenje nivoa glukoze i triglicerida u krvi (multiCare)
- tračice za glukozu
- tračice za trigliceride
- ph-metar

Tok eksperimenta: Potrebno je početnu populaciju pacova podeliti u dve grupe. Prva grupa predstavlja kontrolnu, a druga eksperimentalnu grupu.

Pacovi moraju gladovati najmanje 4 sata pre početka eksperimenta.

Na početku eksperimenta potrebno je izmeriti i zabeležiti težinu pacova i nivo glukoze u krvi. Kontrolnu grupu od 12 jedinki tretirati sa istom količinom Na-citrtnog pufera, kao i eksperimentalnu grupu (da bi se postigala ista količina stresa), a potom podeliti u dve grupe od po 6 jedinki, od kojih jedinice prve grupe koriste za piće vodu sa izvorišta, a jedinice druge grupe česmensku vodu.

Eksperimentalanu grupu od 12 jedinki, tretirati sa STZ rastvorenim u Na-citrat-nom puferu da bi se veštački izazvao dijabetes, a potom podeliti u 2 grupe od po 6 jedinki, od kojih prva grupa koristi ispitivanu vodu, a druga česmensku vodu.

Vodu sa izvora Slavkovića pacovi će koristiti tek nakon sedam dana od početka eksperimenta, tj. kada kod eksperimentalne grupe bude izazvan dijabetes.

U toku eksperimenta svakog drugog dana, kod svake jedinice pratiti: količinu pojedene hrane, količinu popijene vode i težinu životinje. Nivo glukoze u krvi određivati na svakih sedam dana.

Postupak pravljenja Na-citrtnog pufera:

1. Izmeriti 1.47 g Na-citrata i rastvoriti u 50 ml destilovane vode.
2. Odrediti ph dobijenog rastvora i podesiti da bude 4,5 (ukoliko je ph vrednost manja od 4,5 dodati rastvor NaOH, a ako je ph vrednost veća od 4,5 dodati rastvor limunske kiseline).
3. Napravljene pufer staviti u čistu posudu.

Postupak pravljenja STZ rastvorenog u Na-citrat-nom puferu:

1. STZ mora da se čuva u tamnim posudama na -20°C .
2. Odmeriti 187.5 mg STZ i staviti u odgovarajuću posudu (količina potrebna za ovaj eksperiment).
3. Rastvoriti STZ u 4 ml prethodno pripremljenog pufera.
4. Napravljeni rastvor je dovoljan za 15 pacova.

Svakoj jedinki eksperimentalne grupe dati 0.266 ml napravljenog rastvora, zato što se u toj količini rastvora nalazi 12.5 mg STZ što je ekvivalentna količina prema 50mg/1kg, potrebna za uništavanje β ćelija pankreasa i veštačkog izazivanja DM tip 1.

STZ se rastvara u puferu neposredno pre upotrebe, zato što već nakon 20 minuta dolazi do njegove degradacije.

STZ i Na-citrat-ni pufer davati intraperitonealno.

Vreme trajanja eksperimenta: 28 dana.

Tabela se popunjava tako što se rezultati merenja upisuju pojedinačno za svaku jedinku unutar svoje grupe, pri čemu se za svaki novi datum koristi sledeći sheet.

Pacovi su obeleženi brojevima od 1 do 24, s tim što prvih 6 pripada prvoj grupi, sledećih 6 drugoj grupi, itd.

Oznaka:

K + S - H₂O - kontrolna grupa koja koristi vodu sa izvora Slavkovicica za piće (n=6)

K + Č - H₂O - kontrolna grupa koja koristi česmensku vodu za piće (n=6)

STZ + S - H₂O - grupa tretirana STZ koja koristi vodu sa izvora Slavkovicica za piće (n=6)

STZ + Č - H₂O - grupa tretirana STZ koja koristi česmensku vodu za piće (n=6)

Grupa 1	Tabela 1. Kontrolna grupa koja koristi Slavkovicica vodu			datum: 16.11.2010.
oznaka životinje	težina životinje (g)	količina popijene vode (ml)	količina pojedene hrane (g)	nivo glukoze u krvi (mmol/l)

K + S -H ₂ O 1	249			5,1
K + S -H ₂ O 2	253			9
K + S -H ₂ O 3	242			5,1
K + S -H ₂ O 4	216			9,5
K + S -H ₂ O 5	238			8,1
K + S -H ₂ O 6	241			9,2

Mean 239,8333333 7,666666667

Standard Error 5,275204051 0,833733237

Grupa 2	Tabela 2. Kontrolna grupa koja koristi česmensku vodu			datum: 16.11.2010.
oznaka životinje	težina životinje (g)	količina popijene vode (ml)	količina pojedene hrane (g)	nivo glukoze u krvi (mmol/l)
K + O -H ₂ O 7	260			8,3
K + O -H ₂ O 8	209			8,2
K + O -H ₂ O 9	263			9,7
K + O -H ₂ O 10	251			7,6
K + O -H ₂ O 11	270			9
K + O -H ₂ O 12	249			8,2

Mean 250,3333333 8,5

Standard Error 8,853122487 0,301109061

Grupa 3	Tabela 3. Streptozotocin grupa koja koristi Slavkovicu vodu			datum:16.11.2010.
oznaka životinje	težina životinje (g)	količina popijene vode (ml)	količina pojedene hrane (g)	nivo glukoze u krvi (mmol/l)
STZ + S -H ₂ O 13	250			8,5
STZ + S -H ₂ O 14	267			7

STZ + S -H ₂ O 15	279			7,2
STZ + S -H ₂ O 16	232			8,6
STZ + S -H ₂ O 17	263			7,9
STZ + S -H ₂ O 18	279			10,3

Mean 261,6666667 8,25

Standard Error 7,410203176 0,489046692

Grupa 4	Tabela 4. Streptozotocin grupa koja koristi česmensku vodu			datum: 16.11.2010.
oznaka životinje	težina životinje (g)	količina popijene vode (ml)	količina pojedene hrane (g)	nivo glukoze u krvi (mmol/l)
STZ + O -H ₂ O 19	236			9
STZ + O -H ₂ O 20	255			7,9
STZ + O -H ₂ O 21	259			9,1
STZ + O -H ₂ O 22	265			8,2
STZ + O -H ₂ O 23	277			9,2
STZ + O -H ₂ O 24	248			8,5

Mean 256,6666667 8,65

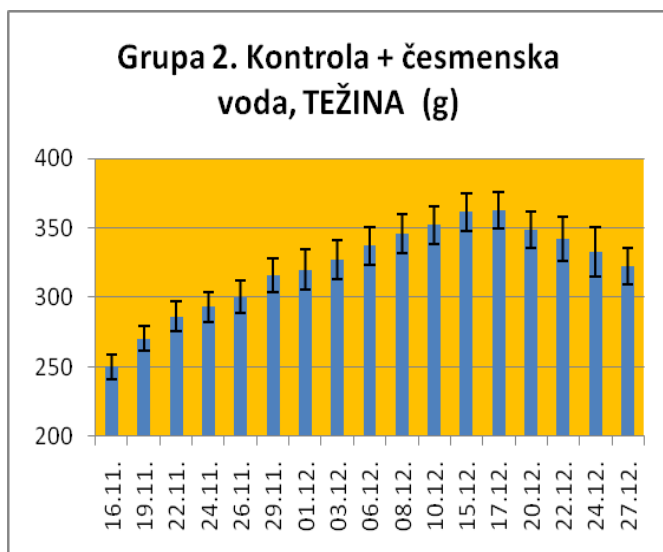
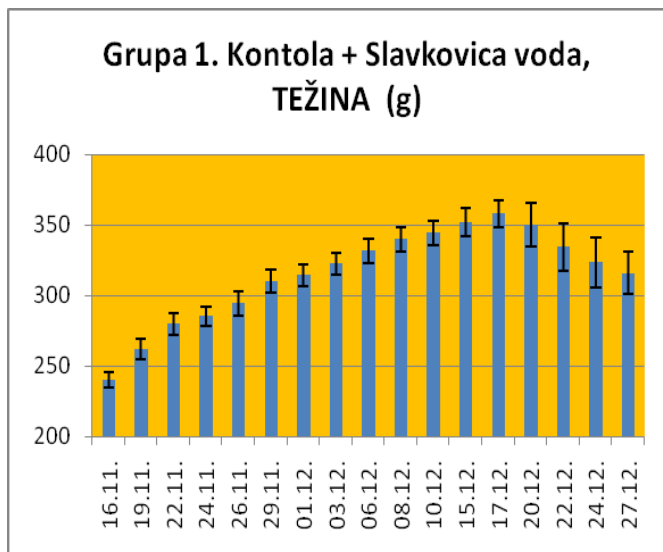
Standard Error 5,754225501 0,217178882

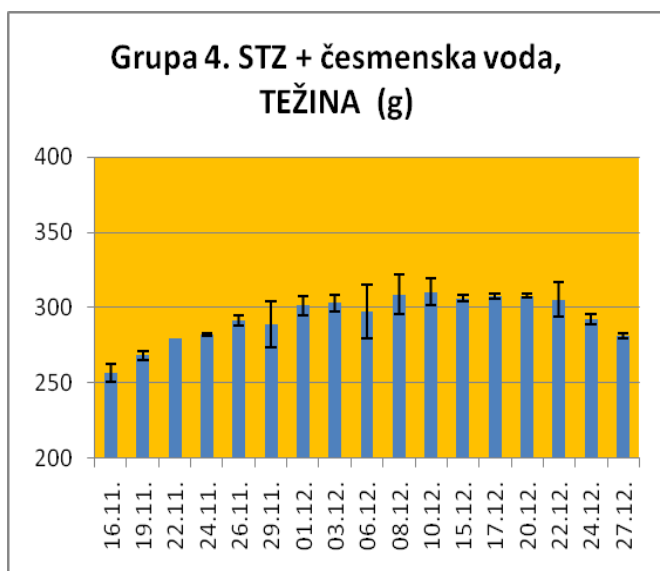
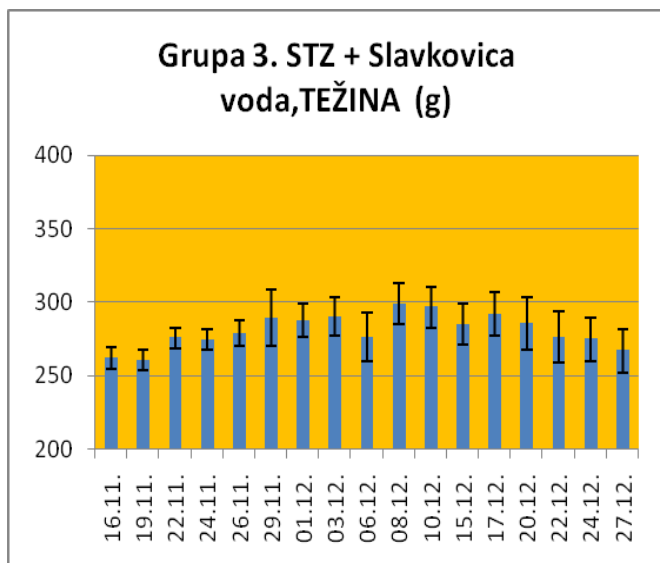
Rezultati

Tokom ovog eksperimenta praćeno je pet parametara, a to su težina pacova, kolićina popijene vode, kolićina pojedene hrane, nivo triglicerida u krvi i najvaŹnija stavka nivo glukoze u krvi.

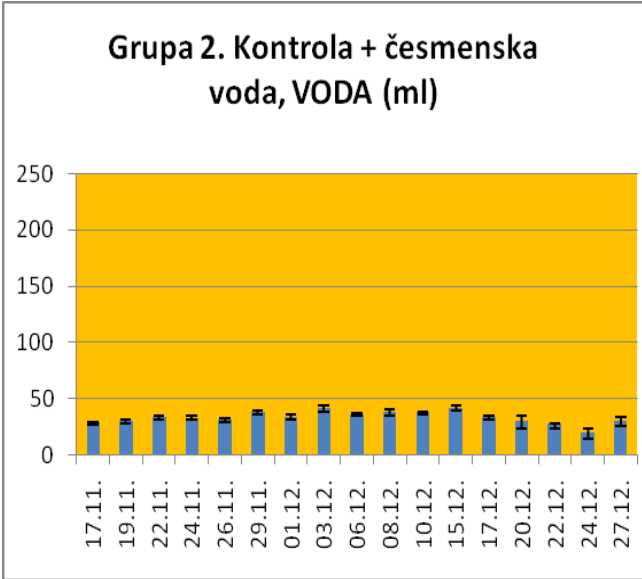
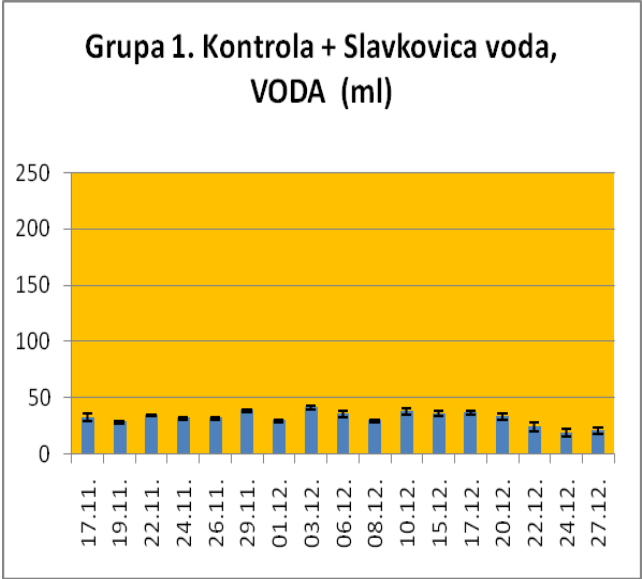
Kod pacova iz dve kontrolne grupe tokom ovog eksperimenta došlo je do konstantnog povećavanja telesne mase, dok nisu dostigli plato.

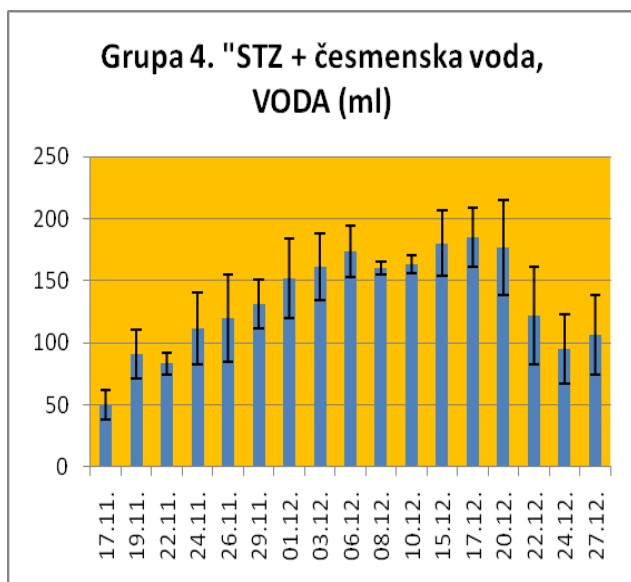
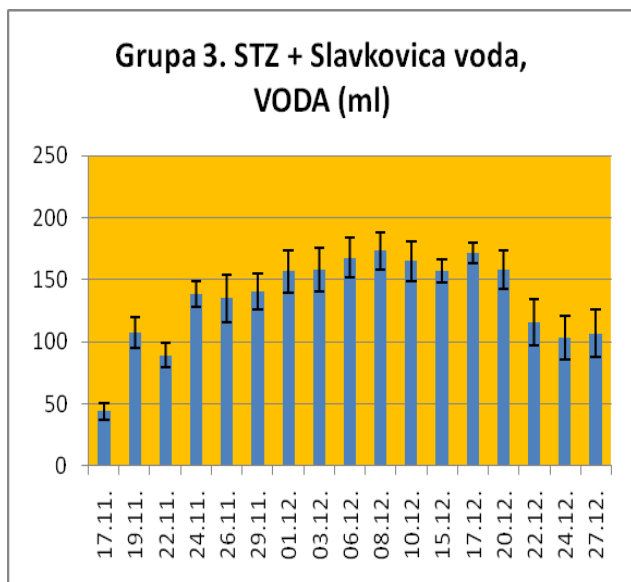
Kod pacova iz eksperimentalnih grupa težina se manje promenila gledajući početnu i poslednju vrednost, ali je zato dolazilo do uspona i padova u teŹi.





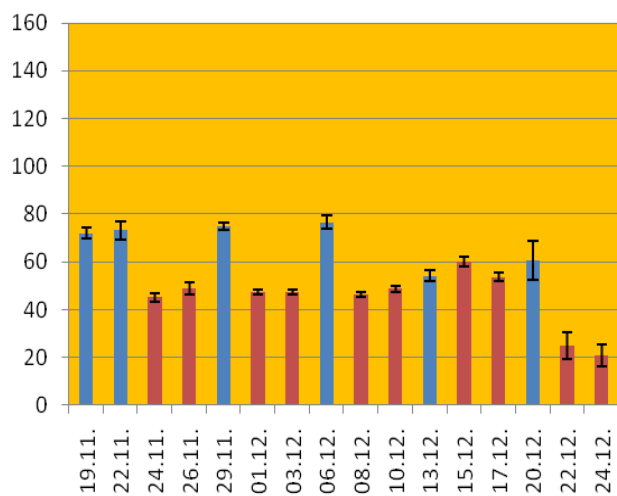
Količina popijene vode kod pacova kontrolnih grupa (grupa 1. i 2.) je manje-više konstantna i iznosi ispod 50 ml na dan, dok kod dijabetičnih pacova iz grupa 3. i 4. količina koju su pili iznosila i preko 200 ml dnevno, bez obzira na tip vode.



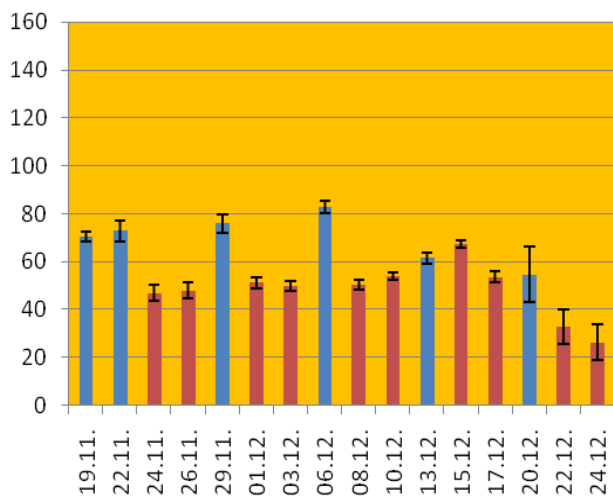


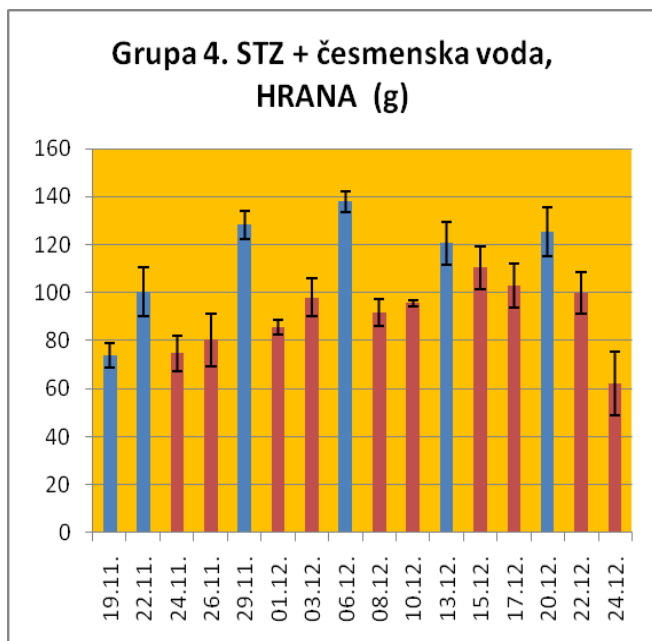
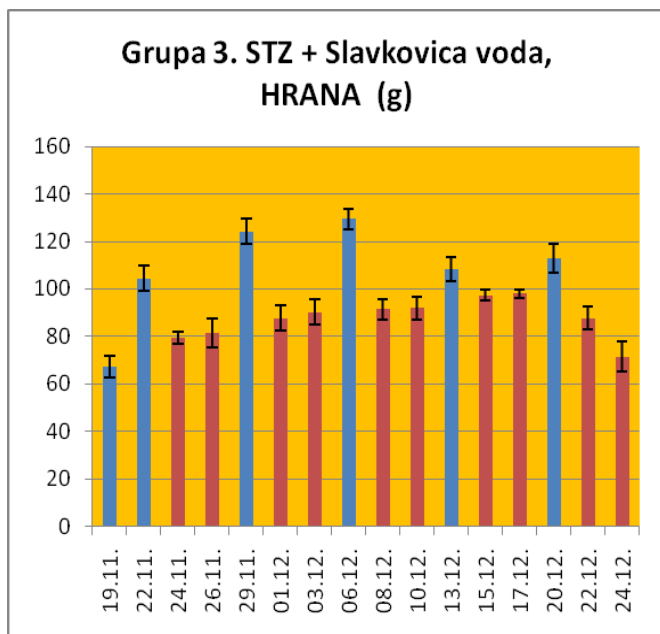
Količina pojedene hrane naravno što su pacovi bili stariji i veći povećavala se kod svih jedinki iz sve četiri grupe. Međutim količina hrane koju su koristili dijabetični pacovi bila je skoro duplo veća nego kod pacova iz kontrolnih grupa.

**Grupa 1. Kontrola + Slavkovicova voda,
HRANA (g)**

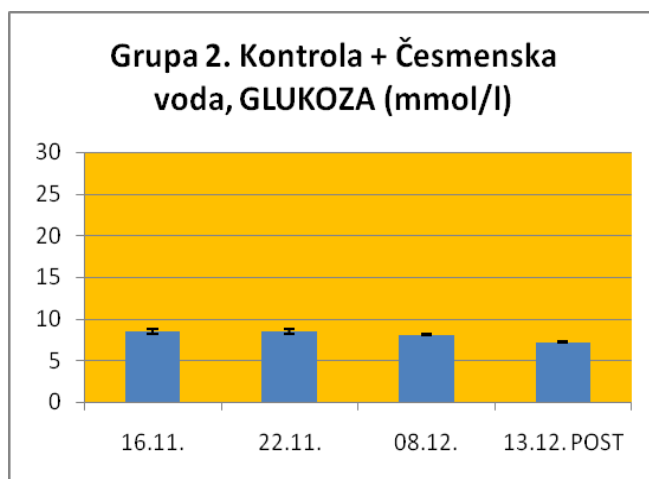
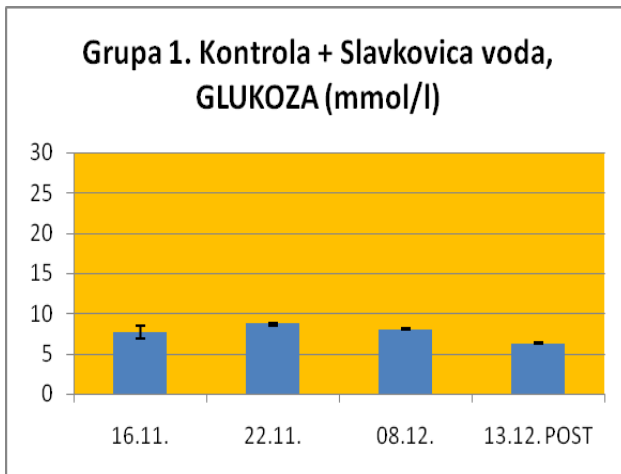


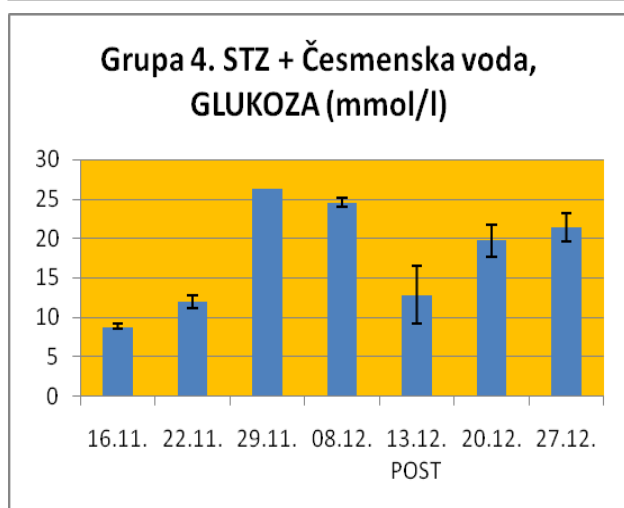
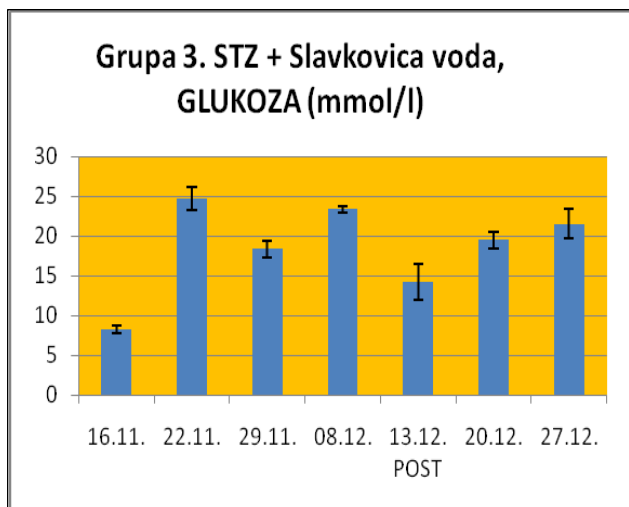
**Grupa 2. Kontrola + česmenska
voda, HRANA (g)**





Ovaj pilot projekat je pokazao da je 29.11.2010. došlo do pada nivoa glukoze u krvi kod grupe 3. (Stz+ Slavkovicica voda) nakon sedmodnevnog korišćenja vode sa izvora Slavkovicica, u odnosu na nivo glukoze koji su ti pacovi imali 22.11.2010. Posle ovoga nije zabeležen novi pad glukoze. Naime, trend pada i rasta su isti kod obe grupe. Ovo se objasnjava da su pacovi pili vodu ad libitum, tako da su posle adaptacije na ovu kolicinu vode prakticno toliko razdredili krv da je trend ostao isti. Za neke konkretne zaključke potrebno bi bilo ponoviti eksperiment i to sa većim brojem pacova. Takodje treba ograniciti kolicinu upotrebe vode!!!





Zaključak I:

Od dobijanja DTM I tj delovanja streptozocina sto se vidi u tabelama kao dan 22.11 I koji predstavlja pocetak dobijanja eksperimentalne vode (dotle su sve grupe pile istu cesmovacu) do 29.11 vidimo jasan trend pada secera kod eksperimentalne grupe ali ne kod kontrole grupe. U

isto vreme raste trend pijenja vode u obe grupe. Od 29.11 taj trend kod obe grupa je oko 150ml vode i nastavlja se do kraja eksperimenta. Pacovi od oko 300gr normalno piju oko 25ml vode. Iz prikazanih rezultata vidimo da eksperimentalna voda deluje signifikantno u ‘normalnim kolicinama’ do sa povecanjem unosa vode trend varijacije glukoze nije izmenjen u obe grupe.

Iz prikazanog mozemo sa sigurnoscu od vise od 95% da tvrdimo da eksperimentalna voda je delovala na mehanizme koje regulisu glukozu nezavisno od insulin.

Napomena: posto kod ljudi unos vode je ogranicen na 2l lako je uocena promena na system koji regulise glukozu.

Oba eksperimenta se dopunjuju i narociti znacaj rezultata dobijeni na pacovima jeste da se iz jednacine izbaci subjektivni elemenat ili placebo koji bi mogao da se pojavi kod coveka.

Zaključak II

Tokom ovog preliminarnog eksperimenta praćeno je pet parametara: težina pacova, količina popijene vode, količina pojedene hrane, nivo triglicerida u krvi i najvažnija stavka nivo glukoze u krvi.

Kod pacova iz dve kontrolne grupe došlo je do konstantnog povećavanja telesne mase sve do postizanja platoa u tezini.

Kod pacova iz eksperimentalne grupe manje su promene u tezini ukoliko se uporedi sa početnom i poslednjom izmerenom vrednosti, ali je zato zapazen naizmenican pad i porast u težini.

Količina popijene vode kod pacova kontrolnih grupa je bila uglavnom konstantna i iznosila je oko 50 ml na dan, dok kod dijabetičnih pacova količina popijene vode je iznosila i preko 200 ml dnevno, bez obzira na tip vode.

Količina pojedene hrane povećavala se kod svih jedinki iz obe grupe. Međutim količina hrane koju su koristili dijabetični pacovi bila je skoro duplo veća nego kod pacova iz kontrolnih grupa.

Ovaj pilot eksperiment, je pokazao da je 29.11.2010. došlo do pada nivoa glukoze u krvi kod dijabetičnih pacova nakon sedmodnevnog korišćenja vode sa izvora Slavkovic, u odnosu na nivo glukoze koji su ti pacovi imali 22.11.2010. **(preko 30,g/dl na nivo od 18 mg/dL, nakon 7 dana, dok je kod jednog dijabetičnog pacova nivo secera pao na 15mg/dl).**

NAPOMENA: Normalni nivo secera se kod pacova Wistar soja kreće od 5 do 13,5 jedinica cineci kogore pomenute pojave u snizavanju nivoa glukoze u prvoj nedelji konzumiranja ispitivane vode, vrlo significantnim.

Nakon 7 dana, nije uocen znacajni pad ili porast u nivou glukoze kod dijabetičnih pacova koji su pili ispitivanu vodu.

PLAN BUDICIH ISPITIVANJA:

Da bi se doslo do novih eksperimentalnih podataka koji bi ukazali na efekte vode iz Slavkovic na kod pacova kod kojih je indukovana dijabetes, neophodno bi bilo ponoviti gore opisane eksperimente na vecem broju pacova . Takodje je neophodno analizirati veci broj bioloskih parametara koji su promenjeni u u stanjima dijabetesa i analizirati da li voda iz Slavkovic ima pozitivan efekat na ostale parametre a ne samo na nivo glukoze. Takodje, bi bilo od znacaja izuciti molekularne mehanizme preko kojih voda iz Slavkovic ostvaruje svoj pozitivan efekat kako na nivo glukoze tako i na ostale promenjen bioloske parametre u stanjima dijabetesa kako tipa 1 tako i tipa 2.

Dr Vladan Bajić , Naucni savetnik , Institut za nuklearne nauke ‘‘Vinca’’

Dr. Esma Isenovic, Naucni savetnik , Institut za nuklearne nauke ‘‘Vinca’’