



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15753 (13) U
(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ В

1

2

(21) u200600462

(22) 18.01.2006

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Ніколенко Віктор Юрійович, Урюпін Іван Миколайович, Ніколенко Юрій Іванович

(73) ДОНЕЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М. ГОРЬКОГО

(57) Спосіб моделювання хронічного гепатиту В, що включає токсичне ушкодження гепатоцитів чо-

тирихлористим вуглецем і формування на них аутоімунної відповіді, який **відрізняється** тим, що перед чотириразовим введенням чотирихлористого вуглецю дозою 0,25 мл 50% розчину в рафінованій олії тваринам вводять триразово гомогенат гомологічної печінки з повним ад'ювантом Фрейнда дозою 0,5; 0,25; 0,25мл через 15 і 9 днів і дворазово у проміжках азатіоприн дозою 50мг/кг.

Корисна модель належить до медицини, а саме до способів моделювання хронічного гепатиту В.

Є спосіб моделювання токсичного захворювання печінки, який взято нами як прототип (1). Він полягає в тому, що щурам вводять двохразово на тиждень 40% олійний розчин чотирихлористого вуглецю (CCl_4) із розрахунку 0,1мл на 100г маси тіла тварини і через 2 місяці отримують токсичне ураження печінки. Для вивчення аутоімунного ураження печінки беруть окрему другу групу тварин, яких сенсibilізують 3 місяці гомологічним печінковим антигеном з ад'ювантом Фрейнда.

Але цей спосіб має такі недоліки. При цьому способі треба використовувати окремо дві групи тварин для того, щоб, по-перше, вивчити токсичне ураження печінки, яке не носить аутоімунного характеру, що не характерно для хронічного гепатиту В. Захворювання розвивається гостро з біохімічними ознаками гепатиту, але з часом біохімічні ознаки минають. Відтворити типове захворювання можна не у всіх тварин. По-друге, 2 група тварин потребує тривалої сенсibilізації щурів на протязі трьох місяців і не викликає первинного значного ураження самих гепатоцитів, що не характерно для хронічного вірусного гепатиту В.

В основі корисної моделі поставлена задача створення способу моделювання хронічного гепатиту В, в якому забезпечується розвиток хронічного активного гепатиту у всіх без винятку тварин, що узяті в експеримент, який за патогенезом схожий до хронічного гепатиту В.

Ця задача вирішується тим, що в способі моделювання хронічного гепатиту В шляхом токсичного ушкодження гепатоцитів чотирихлористим вуглецем і формування на них аутоімунної відповіді, відповідно до корисної моделі, спочатку тваринам вводять трьохразово гомогенат гомологічної печінки з повним ад'ювантом Фрейнда (ПАФ) у дозі 0,5, 0,25, 0,25мл, а через 15 і 9 днів, у проміжках після чергового введення ПАФ, дворазово азатіоприн у дозі 50 мг/кг, а потім чотирихразового вводять чотирихлористий вуглець у дозі 0,25мл 50% розчину в рафінованій олії з частотою 2 рази на тиждень.

Спосіб виконується наступним чином: в корінь хвоста щурів вводять повний ад'ювант Фрейнда 0,5мл, який містить 0,5мг БЦЖ і 5мг білка гомогената печінки, через 14 днів вводять азатіоприн у дозі 50 мг/кг, а ще через 1 день - повний ад'ювант Фрейнда з гомогенатом печінки 0,25мл, ще через 7 днів - вводять азатіоприн у дозі 50мг/кг, через 2 дні - повний ад'ювант Фрейнда з гомогенатом печінки 0,25мл; після цього через 5 днів під шкіру задньої лапки щурів вводять чотирихлористого вуглецю (CCl_4) у дозі 0,25мл 50% розчину в рафінованій олії чотирихразово з частотою 2 рази на тиждень.

Досліди проведені на 40 білих безпородних щурах з середньою вагою 180,0г. З них зроблено 2 групи. 1 групу становили інтактні тварини (20 щурів). 2 група (20 тварин) з моделюванням хронічного гепатиту В по повній схемі (в корінь хвоста щурів вводили повний ад'ювант Фрейнда 0,5мл, який містить 0,5мг БЦЖ і 5мг білка гомогената печінки, через 14 днів вводили азатіоприн у дозі 50мг/кг, а

(19) UA (11) 15753 (13) U

ще через 1 день - повний ад'ювант Фрейнда з гомогенатом печінки 0,25мл, ще через 7 днів - вводили азатіоприн у дозі 50мг/кг, через 2 дні - повний ад'ювант Фрейнда з гомогенатом печінки 0,25мл; після цього через 5 днів під шкіру задньої лапки щурів вводили чотирьоххлористого вуглецю (CCl_4) у дозі 0,25 мл 50% розчину в рафінованій олії чотирьохразово з частотою 2 рази на тиждень. Через 7 днів після останнього введення чотирьоххлористого вуглецю (CCl_4) тварин забивали під ефірним наркозом.

Головний принцип, що покладений в основу розробленої моделі хронічного гепатиту В, це попереднє аутоімунне ураження частини гепатоцитів повним ад'ювантом Фрейнда, який чергується з азатіоприном у дозі 50мг/кг, що дозволяє викликати загибель частки лімфоцитів, перед усім супресорної ланки Т-лімфоцитів, під час їх розподілу, але яка менша доз, що викликали б загибель інших клітин кісткового мозку, в визначені моменти максимальної імунної відповіді для пригнічення розвитку своїх імуносупресивних механізмів (Т-, В-супресорів і продукції антиідіотипічних антитіл і

лімфоцитів). Таким чином, досягається розхитування аутоімунної реакції в бік прогресування і самопідтримування. Після цього до загибелі значної кількості гепатоцитів приводить введення чотирьоххлористого вуглецю (CCl_4) у дозі 0,25 мл 50% розчину, який вводиться 2 рази на тиждень, що дозволяє досягти ураження різних груп гепатоцитів, близького до хронічного гепатиту, але не викликає значної токсичної дії на весь організм (в тому числі на лейкоцити).

Таким чином, в моделі використані ті фактори, які впливають на людей в житті: одночасний і послідовний вплив імуностимулюючих (вакцини, ліки та ін.) і імуносупресивних факторів (хімічні чинники) та гепатонекротичних факторів (віруси, токсини), які призводять до розвитку хронічного активного гепатиту.

Порівняння результатів біохімічних показників крові у здорових і піддослідних щурів з моделлю гепатиту В свідчить про розвиток гепатиту з порушенням білірубінового і пуринового обміну, а також характерним підвищенням активності ферментів (табл.1).

Таблиця 1

Порівняння результатів біохімічних показників крові у контрольних і піддослідних щурів з моделлю гепатиту В

Групи	I група інтактні	II група піддослідна	P=
Показники	n=20	n=20	
	1	2	
Білірубін загальний, мкмоль/л	10,20±0,59	14,02±0,90*	0,026
АЛТ, мкмоль/чхмл	0,63±0,03	2,69±0,41*	0,004
АСТ, мкмоль/чхмл	0,55±0,03	0,98±0,12*	0,026
Сечова кислота, ммоль/л	0,099±0,006	0,138±0,005	0,001

Примітка: * - різниця між показниками у експериментальних і інтактних тварин статистично вірогідні

Визначення аутоімунних гуморальних і клітинних реакцій проведено в піддослідних і контрольних тварин шляхом використання реакції пасивної гемаглютинації (РПГА) з н-ДНК і тканинним антигеном печінки і пригнічення розповсюдження макрофагів (табл.2).

Із наведених даних видно, що підвищення титрів антитіл до н-ДНК і печінки спостерігається в піддослідній групі у порівнянні з інтактними (I група). Це свідчить про системний розвиток аутоімунних реакцій в організмі тварин піддослідної групи, які пов'язані з поліклональною активацією В-

системи імунітету. Вивчення результатів ПРМ до н-ДНК і тканинних антигенів виявило розвиток у II групі вірогідного зниження показника до н-ДНК і антигену печінки в порівнянні з контролем. Це свідчить про розвиток системної реакції гіперчутливості уповільненого типу до н-ДНК і аутоантигену печінки. Так як, в розвитку аутоімунних захворювань суттєву роль грає розвиток ГУТ, то ці результати говорять на користь розвитку у тварин генералізованого аутоімунного захворювання з залученням гуморальних та клітинних аутоімунних реакцій.

Таблиця 2

Титри аутоантитіл і ПРМ до аутоантигенів у щурів з моделлю хронічного гепатиту В і контрольних тварин ($M \pm m$)

	Групи тварин		
	I група інтактні	II група піддослідна	p<
Антитіла до (ln $M \pm m$):			
н-ДНК	0,80±0,05	3,20±0,15	0,001
печінки	0,82±0,05	3,50±0,25	0,001
ПРМ до антигенів (%):			
н-ДНК	98,2±1,2	52,5±2,6	0,001
печінки	99,2±2,3	69,4±2,3	0,001

Примітка: * - різниця між показниками у експериментальних і інтактних тварин статистично вірогідні

Розвиток токсичного ураження і аутоімунних реакцій могло привести до значних морфологічних змін структури печінки. Гістологічне дослідження печінки у піддослідних і контрольних тварин підтверджує це припущення (табл.3).

Згідно розрахунку критерію $\chi^2=32,73$ в порівнянні з критичною точкою $\chi^2=10,82$ результати гістологічного дослідження виявили достовірну схожість до гепатиту В значної кількості уражень печінки в експерименті, ніж в контрольній групі ($p<0,001$).

Таблиця 3

Гістологічний висновок у піддослідних і контрольних тварин про подібність на хронічний гепатиту В

1 руни	Подібний до гепатиту В	Не подібний до гепатиту В	Усього
Піддослідна група	20	0	20
Контроль	2	18	20
Усього	22	8	40

Таким чином, створена модель хронічного гепатиту В на щурах, відображає гепатонекротичний та аутоімунний процес, який характерний для хронічною активного гепатиту, викликаного вірусом гепатиту В, і може служити його моделлю.

Переваги запропонованого способу є у тому, що захворювання розвивається в короткий строк на 6 тижнів швидше, ніж при аутоімунному аналогові. Це захворювання носить характер хронічного активного гепатиту і поступово уражає печінку, що

більш подібно до хронічного гепатиту В у людини. Модель на білих безпородних щурах найбільш дешева.

Джерела інформації:

Федосов А.А., Брюхин Г.В. Сравнительный анализ субпопуляционного состава тимоцитов и Т-лимфоцитов периферической крови потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени различного генеза // Иммунология. - 2004. - №2. - 83-86.