



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46201 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G09B 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ АВТОІМУННОГО ПОШКОДЖЕННЯ МІОКАРДА

1

2

(21) u200906638

(22) 24.06.2009

(24) 10.12.2009

(46) 10.12.2009, Бюл.№ 23, 2009 р.

(72) РЯБЕНКО ДМИТРО ВАСИЛЬОВИЧ, СИДО-  
РИК ЛЮДМИЛА ЛЕОНІДІВНА, БОБИК ВАСИЛЬ  
ІВАНОВИЧ(73) ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕ-  
ТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ(57) 1. Спосіб моделювання автоімунного пошко-  
дження міокарда, що передбачає введення лабо-

раторним тваринам екзогенного антигену, який **відрізняється** тим, що як екзогенний антиген за-  
стосовують міозин, виділений з міокарда шлуноч-  
ків хворих на дилатаційну кардіоміопатію, який  
вводять підшкірно у дозі 100 мкл разом з 100 мкл  
повного ад'юванту Фрейнда.

2. Спосіб моделювання автоімунного пошкоджен-  
ня міокарда за п. 1, який **відрізняється** тим, що  
здійснюють повторне введення 100 мкл міозину та  
100 мкл повного ад'юванту Фрейнда через 7 днів  
після першого введення.

Розробка відноситься до експериментальної  
біології і медицини, а саме до експериментальної  
кардіології, і може бути використаним, зокрема,  
для моделювання автоімунного пошкодження міо-  
карда.

З практики експериментальної біології і меди-  
цини в даний час відомі способи моделювання  
різних видів пошкодження міокарда у лаборатор-  
них тварин.

Їх можна поділити на дві великі групи:

1) накладення лігатури на коронарну артерію  
або іншу механічну ушкоджувальну дію на судини  
серця [Коган А.Х., Райзман В.Р., Литвицкий П.Ф.  
Муфта для сужения коронарных сосудов в экспе-  
рименте, а.с. 1398844, 1988; Литвицкий П.Ф. и др.  
// Бюл. экспер. биол. и мед. - 1983, №1, С.24-27;  
Ишемия: патофизиологические и фармакологиче-  
ские аспекты. Сборник научных трудов, Кемерово,  
1989. / Под редакцией проф. А.В. Сапожкова и  
доц. А.Я. Евтушенко];

2) введення екзогенного антигену. До цієї гру-  
пи відноситься введення гістотоксичних доз сим-  
патомиметиків [Марамаа С.Я. Адаптація миокар-  
да к повреждающему действию симпатомиметиков (экспер. исследование), автореф. дис.  
на соиск. ученой степени доктора мед. наук. Тар-  
ту, 1973] та зараження лабораторних тварин збуд-  
никами інфекцій (віруси, хламідії тощо) [Kawai C.  
From myocarditis to cardiomyopathy: Mechanisms of  
inflammation and cell death // Circulation. - 1999. -  
Vol.99. - P.1091-1100; Дерюгин М.В., Бойцов С.А.

Хронические миокардиты. СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2005  
- 288с.].

Проте відомі способи мають ряд істотних не-  
доліків:

- для накладення лігатури на коронарні судини  
необхідне проведення операції на серці;

- при операції на серці у лабораторних тварин  
необхідна штучна вентиляція легенів;

- штучна вентиляція легенів викликає перева-  
нтаження правих відділів серця і тим самим додат-  
кові зміни на електрокардіограми;

- операція на серці лабораторних тварин тех-  
нічно складна і травматична для організму твари-  
ни, часто викликає загибель тварини в ранньому  
післяопераційному періоді;

- складно провести аналіз характеру поразки  
міокарда при проведенні операції на серці;

- при парентеральному введенні гістотоксич-  
них доз відомих симпатомиметиків спостерігається  
велика загибель лабораторних тварин;

- при зараженні збудниками хронічних інфек-  
цій, ураження міокарду виникає лише у 45% лабо-  
раторних тварин.

Застосовувані у відомих способах моделю-  
вання гістотоксичні дози симпатомиметиків забез-  
печують моделювання лише окремих сторін по-  
шкодження міокарда що супроводжують  
автоімунне пошкодження міокарда. Відомі гістото-  
ксичні симпатомиметики не забезпечують прямого  
моделювання автоімунного пошкодження міо-  
карда.

(13) U  
(11) 46201  
(19) UA

Найбільш близькими до пропонованого є способи моделювання пошкодження міокарду у мишей, що включає внутрішньо-черевинне введення екзогенного антигену - *Chlamydia pneumoniae* та/або *Herpes simplex virus 1 et 2* в дозах  $10^{-3}$  та  $10^{-4}$  [Дерюгин М.В., Бойцов С.А. Хронические миокардиты. СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2005 -288с.].

При даному способі моделювання в міокарді частини лабораторних тварин поступово збільшується кількість вогнищ некрозу та запальних лейкоцитарних інфільтратів, та загальна площа фіброзу. Ці явища починаються через 21 день і поступово збільшуються до 94 дня дослідження.

Загалом, спосіб моделювання, який формує процес пошкодження міокарда протягом тривалого часу, дозволяє проводити дослідження деталей процесу аутоімунного пошкодження міокарду. Однак, як і попередні, відомий спосіб забезпечує моделювання лише окремих сторін пошкодження міокарда, що супроводжують аутоімунне пошкодження міокарда.

Однак до недоліків даного способу слід віднести необхідність роботи з екзогенним агентом, який є суттєвим інфекційним патогеном і збудником інфекції, що пов'язано з підвищеним ризиком проведення досліджень,

Крім того до серйозних недоліків даного способу слід віднести обмеження можливості отримання пошкодження міокарду, зокрема лише у 45% дослідних.

Завданням розробки є створення способу моделювання аутоімунного пошкодження міокарда в якому за рахунок застосування нових речовин та режимів їх введення забезпечується пряме моделювання аутоімунного пошкодження міокарда, та розвиток у тварин аутоімунних реакцій, підвищення рівня циркулюючих антитіл, розвиток та поступове збільшення кількості різного ступеня альтеративних ушкоджень кардіоміоцитів та формування вогнищ замісного фіброзу.

Для вирішення цього завдання спосіб моделювання аутоімунного пошкодження міокарда передбачає введення лабораторним тваринам екзогенного антигену.

Новим у способі є те, що у якості екзогенного антигену застосовують міозин, виділений з міокарду шлуночків хворих на дилатаційну кардіоміопатію. Виділений антиген розводять фізіологічним розчином до кінцевої концентрації 2мг/мл. Мишам підшкірно вводять 100мкл антигену (концентрація 1мг/мл) разом з 100мкл повного ад'юванту Фрейнда.

В особливих випадках застосування способу здійснюють повторне підшкірне введення 100мкл антигену та 100мкл повного ад'юванту Фрейнда через 7 днів.

Застосування нових ознак способу забезпечує пряме моделювання аутоімунного пошкодження міокарда, та розвиток у тварин аутоімунних реакцій (підвищення рівня циркулюючих антитіл), розвиток та поступове збільшення кількості різного ступеня альтеративних ушкоджень кардіоміоцитів та формування вогнищ замісного фіброзу через 6-7 місяців після введення антигену.

Пропонованим способом досягається наступне:

- спосіб є простий і доступний для прямого моделювання аутоімунного пошкодження міокарду у лабораторних тварин;

- спосіб відрізняється хорошою відтворюваністю, низькою летальністю експериментальних тварин в процесі моделювання і після розвитку моделі;

- спосіб дозволяє дослідження деталей процесу моделювати аутоімунного пошкодження міокарду на протязі тривалого часу;

- спосіб дозволяє використовувати його для пошуку та відбору лікарських препаратів, які володіють властивостями при аутоімунного пошкодження міокарда;

- спосіб дозволяє максимально зберігати тварин від загибелі при моделюванні аутоімунного пошкодження міокарда.

Пропонований спосіб може бути розширений і розроблений для клінічної кардіології і клінічної фармакології для підбору та дослідження дії лікарських засобів, що володіють кардіопротекторними або імуномодулюючими властивостями.

Запропонований спосіб ілюструється прикладами його виконання.

Для здійснення наведених нижче прикладів міозин виділяли, з міокарду шлуночків хворих на дилатаційну кардіоміопатію. Міозин отримували з препаратів актоміозину шляхом хроматографічного очищення на DEAE-Sephadex A-50 в присутності 40мМ пірофосфату натрію при рН 7,0. Міозіновий пік збирали при 150мМ NaCl.

Для наведених нижче прикладів препарат актоміозину виділяли з міокарду за методом S.Margossian [Margossian S. Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis // J.Biol.Chem. - 1985. - V.260. - P.13747-13754.]. Усі операції проводили на холоді. Подрібнену навіску міокарда заливали буфером (у співвідношенні 1 до 3), який містив 30мМ KCl, 1мМ EDTA, 10мМ 2-меркаптетанолу, 10мМ MgCl<sub>2</sub>, 10мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (рН-7,0), 1мМ NaN<sub>3</sub> та 0,1мМ PMSF. Осад збирали за допомогою центрифугування. Операцію повторювали двічі. Осад гомогенізували в буфері, що описаний вище, котрий містив 1% тритону X-100. Після центрифугування осад декілька разів відмивали від тритону X-100 тим же буфером. На подальшому етапі осад заливали трьома об'ємами буферу який містив 0,2М KCl, 0,15М трис (рН-8,0), 1мМ EDTA, 5мМ MgCl<sub>2</sub>, 5мМ ATP, 1мМ NaN<sub>3</sub>, 0,2мМ PMSF та залишали на 1 годину. Надосад відокремлювали за допомогою центрифугування (15000g, 30 хвилин), доводили рН до 6,2 0,1М CH<sub>3</sub>COOH, осаджали 10-кратним розбавленням холодною водою та залишали на ніч. Осад збирали за допомогою центрифугування та розчиняли у буфері, який містив 0,6М KCl, 5мМ трис (рН-7,5), 1мМ NaN<sub>3</sub>, 0,5мМ DTT. Розчин освітлювали за допомогою центрифугування (15000g, 15 хвилин). Надосад збирали та багаторазово переосажували водою. Отримані препарати зберігали у вигляді суспензії на протязі 1-2 тижнів, а для більш тривалого збереження переводили у буфер та зберігали у рідкому азоті.

#### Приклад 1.

35 мишам (самці лінії BALB/c віком 12-16 тижнів) підшкірно вводили 100мкл міозину змішаного з 100мкл повного ад'юванту Фрейнда. Повторне введення 100міозину та 100мкл повного ад'юванту Фрейнда здійснювали через 7 днів. Вже через 7 днів після другого введення антигену у крові мишей відзначається підвищений рівень антитіл до міозину, що був виділений з міокарду здорових мишей. Підвищений рівень даних антитіл (від 7,4 рази до 22% вищий ніж у не імунізованих тварин) спостерігався на протязі всього періоду дослідження - до 3 місяця після введення антигену.

На 4 місяць після введення антигену в міокарді мишей відзначається збільшення гемоциркуляторних порушень та значне підвищення розповсюдженості контрактурних пошкоджень кардіоміоцитів, які носять головним чином зворотній характер.

На шостий місяць після імунізації в серці тварин піддослідної групи значно зростали явища венозного повнокрів'я, помітно збільшувалась частка дилатованих або спазмованих елементів артеріального коліна судинного русла серця. Дистрофічні зміни в кардіоміоцитах поєднувались з посиленням малюнку міжклітинних щілин через накопичення фуксинофільних волокнистих елементів по ходу кровоносних капілярів з ознаками поживлення клітини фібробластичного ряду, до яких інколи приєднуються гістоцити і круглоклітинні елементи. У навколосудинних зонах зустрічались окремі дрібні лімфо-гістоцитарні інфільтрати з незначним домішком плазмочитів, а інколи - сегментоядерних лейкоцитів. Часто зустрічались явища внутрішньоклітинного набряку, поєданого з лізисом контрактильних структур. Розповсюдженими були зони стертості посмугованості робочих клітин міокарда та зменшення їх оптичної активності в поляризованому світлі. В окремих зонах, переважно під ендокардом, зустрічались зони великовогнищевих "розсмоктування" кардіоміоцитів, яке не супроводжувалось скільки-небудь помітною клітинною реакцією, що свідчить про переважно внутрішньоміоцитарний розвиток цього патологічного процесу. Характерною ознакою була присутність як поширених, але ще зворотніх лізисних уражень кардіоміоцитів, так і футлярного міоцитолизиса, фінальна фаза якого виглядала як ареактивна "депаренхіматизація" міокарда з утворенням більш чи менш щільних сітчастих рубчиків при колапсі згрубілого ендо- і перимізіума. Разом з прогресуючими лізисними ураженнями кардіоміоцитів другим, менш частим варіантом поступового розвитку великовогнищевих альтерацій міокарда, були явища брильчастого розпаду клітин. Об'ємні ураження серцевого м'яза подібного типу призводили до формування грануляційної тканини у фокусах розсмоктування і сполучнотканинного заміщення незворотно пошкоджених кардіоміоцитів з поступовим утворенням на їх місці зірчастих рубчиків, що здатні зливатися між собою, з фібротизованими вогнищами "депаренхіматизації" міокарда і з в тій чи іншій мірі склерозованими периваскулярними зонами.

На сьомий місяць після введення антигену зміни в міокарді різних тварин досить помітно відрізнялись. У одних тварин ділянки скоротливого міокарда, що раніше піддалися гострим, інколи досить поширеним альтеративним змінам з заміщенням їх грануляційною тканиною, перетворюються на різні за розміром зіркоподібні рубчики. Це стає головною морфологічною ознакою "імунозапальнозалежного кризу", що відбувся у попередній термін спостережень. У інших тварин структурні прояви зпровакованого патологічного процесу практично нівелюються. Однак в частині цієї ж групи спостережень зберігались обмежені, помірні порушення інтрамуральної гемоциркуляції та гемотканинного гомеостазу рідини. У них також виявлялись дисеміновані дрібновогнищеві ураження КМЦ переважно лізисного типу з утворенням окремих більш-менш значних круглоклітинних інфільтратів. Ще один варіант судинно-тканинної реакції полягав у формуванні досить значних за об'ємом пошкоджень міокарда, цілком подібних до описаних у попередній серії спостережень.

#### Приклад 2.

Дослідження проводили у 45 мишах-самцях лінії BALB/c віком 12-16 тижнів, яким вводили міозин, що був виділений з вентрикулярних кардіоміоцитів осіб, що померли від дилатаційної кардіоміопатії через прогресуючу серцеву недостатність. 100мкл міозину змішаного з 100мкл повного ад'юванту Фрейнда вводили мишам підшкірно. Вдруге введення 100міозину та 100мкл повного ад'юванту Фрейнда здійснювали через 7 днів.

Вже через місяць після повторного введення антигену в серцях піддослідних тварин виникає венозна гіперемія, певні реактивні зміни тонуру інтрамуральних артерій і резистивних судин серця та порушення гемотканинного балансу рідини. З подовшенням терміну спостережень до цих змін приєднується плазматичне просочування стінок артерій. Разом з тим в вентрикулярних кардіоміоцитах починають з'являтися ознаки пластичної недостатності з лізисними пошкодженнями контрактильного апарату.

Найбільш значні зміни спостерігались через шість-сім місяців після введення антигену. В цей період розповсюдженість дистрофічних змін кардіоміоцитів і явища альтерації їх скоротливого апарату набули крупнозонального характеру з переважною локалізацією у субендокардіальних ділянках серцевої стінки. Крім того спостерігалася міграція круглоклітинних елементів з кровоносного русла в інтерстіцій, де вони дифузно розсіювались в тканині, інколи утворюючи дрібні навколосудинні скупчення. Поступово в міокарді поруч з відносно мало зміненими регіонами визначалися значні вогнища пошкодження кардіоміоцитів з їх заміщенням грануляційною тканиною, що дозріває у зірчасті рубчики. Фокуси "депаренхіматизації" міокарда з колабуванням попередньо існувавших і новоутворених сполучнотканинних структур, виявили тенденцію до злиття між собою з об'єднанням в той чи інший спосіб сформованих ділянок фібротизації.

