



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 101314

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 14081**

(22) Дата подання заявки: **29.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.09.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.09.2015, Бюл.№ 17**

(72) Винахідник(и):

**Степанов Юрій Миронович (UA),
Діденко Володимир Ізотович (UA),
Руденко Анатолій Іванович (UA),
Ошмянська Наталія Юріївна (UA),
Кленіна Інна Анатоліївна (UA),
Макарчук Вікторія Анатоліївна (UA),
Галінський Олексій Олексійович (UA)**

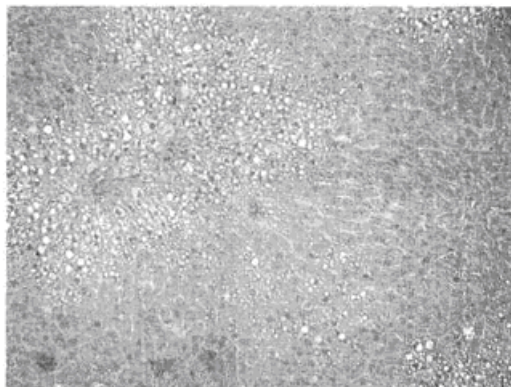
(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ
ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",
пр. Правди, 96, м. Дніпропетровськ, 49074
(UA)**

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання гострого токсичного гепатиту в експерименті включає введення лабораторним тваринам тетрахлористого вуглецю, який вводять однократно після п'ятидобового введення нітропрусиду натрію.



Фіг.1

UA 101314 U

Спосіб належить до галузі медицини, а саме до способів моделювання гострого токсичного гепатиту в експерименті, може бути використана у лабораторіях, науково-дослідних установах, для вивчення ефективності терапевтичних агентів та при експериментальних дослідженнях, пов'язаних з вивченням впливу розвитку гепатиту пов'язаного з порушенням балансу рівнів оксиду азоту на морфо-функціональний стан організму на прикладі дрібних лабораторних тварин.

В останні роки дослідниками активно вивчається роль оксиду азоту (NO) в регуляції шлунково-кишкового тракту в нормі та при патології і, зокрема, при захворюваннях печінки невірусної етіології [1, 2, 3]. Відомо, що NO має потужну вазодилататорну дію і може служити причиною гіпердинамічного кровообігу, отже, розвитку асцити, гепаторенального синдрому та портальної гіпертензії. NO синтезується в ендотелії з L-аргініну; його дія пов'язана з активацією гуанілатциклази. Активність NO-синтаз можна змінювати введенням, наприклад, NO-монометил-L-аргініну (L-NMMA), який усуває багато судинорозширюючих ефектів NO [3, 4]. Так, у щурів із портальною гіпертензією цей препарат зменшував прояви гіпертонічного кровообігу, при цирозі печінки у цих тварин чуттєвість до супресорної дії інгібіторів NO підвищена; їхнє введення підвищує тиск у воротній вені [5]. Останнім часом з'явився інтерес до вивчення ензиму - аргінази (AP), в зв'язку за її участі в метаболізмі NO, невідомим є той факт, які зміни будуть відбуватися між вмістом AP та метаболітів оксиду азоту (NOx) при надлишку NO, а також при блокуванні його синтезу. Дослідження властивостей AP та співставлення її з вмістом метаболітів NO можуть мати важливе значення в з'ясуванні біохімічних механізмів, які протікають в печінці на тлі дисбалансу NO в умовах моделювання експериментального гепатиту [6, 7].

Один з найбільш поширених способів отримання у тварин дистрофії печінки пов'язаний з введенням чотирехлористого вуглецю (CCl_4). Цей спосіб нами був використаний як основа для відпрацювання моделі експериментального гепатиту в умовах дисбалансу NO. Враховуючи той факт, що при тривалому блокуванні активності всіх видів синтаз за допомогою неспецифічного блокатора нітро-L-аргініну в наших попередніх дослідженнях ми отримали порушення кровообігу в печінці, застою крові в малих та великих венах портального тракту, яке створювало гіпоксичні умови для функціональної діяльності гепатоцитів [8, 9]. Залишається відкритим питання щодо впливу дисбалансу NO на тлі одноразового введення CCl_4 на формування патологічного процесу в печінці, ми припускаємо, що даний спосіб моделювання гепатиту може викликати морфологічну деструкцію та функціональні зміни печінки з певними особливостями.

Тривале порушення синтезу оксиду азоту викликає порушення кровообігу в печінці, застій крові в малих та великих венах портального тракту, що створювало гіпоксичні умови для функціонування гепатоцитів [8, 9].

Найбільш поширені способи отримання гепатиту в експерименті ґрунтуються на введенні дрібним лабораторним тваринам хлор органічних сполук. Проте існуючі моделі не враховують вплив порушення регуляторних систем на формування гострого ураження печінки.

Існує спосіб відтворення хронічного токсичного гепатиту у щурів, що передбачає застосування гепатотоксичних отрут, який відрізняється тим, що щурам з масою тіла 70-80 г інтрагастрально вводять 20 % олійний розчин CCl_4 в дозі 0,1 мл/100 г маси двічі на тиждень протягом 3 місяців, паралельно для пиття замість води тваринам дають 5 % розчин етанолу [8, 9, 10]. Ця модель досить точно відтворює клінічну ситуацію у пацієнтів з токсичним отруєнням на фоні хронічної алкоголізації, однак потребує великої кількості часу для відтворення, а також специфічних навичок роботи з тваринами.

Так, існує спосіб моделювання гострого гепатиту, що ґрунтується на введенні підшкірно щурам CCl_4 в вигляді 50 % розчину на оливковій олії протягом чотирьох діб [12]. Ця модель характеризується розвитком некрозу, білковою та жировою дистрофією, локалізованих в центральній печінковій дольці, з превалюванням продукції токсичних метаболітів, що характерно для розвитку гострого токсичного ураження печінки у відносно-здорового організму. Цей спосіб, як найбільш близький до того, що заявляється за технічною суттю та ефектом, який досягається, вибрано за найближчий аналог. Недоліком цього способу є те, що він не дає можливості відтворити передпатологічний функціональний стан, регуляторних систем піддослідної тварини.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити ефективну модель гострого токсичного гепатиту, яку можна відтворити за відносно короткий проміжок часу, максимально ілюструє морфологічні зміни в печінці, які викликані токсичним агентом на фоні порушення регуляторних механізмів, та дає змогу отримати нові уявлення щодо механізмів розвитку гострої патології печінки. Поставлена задача вирішується тим, що для відтворення моделі

гострого токсичного гепатиту щурам попередньо порушують баланс рівня оксиду азоту в організмі, з подальшим однократним введенням CCl_4 .

Загальною ознакою є введення підшкірно щурам CCl_4 в вигляді 50 % розчину на оливковій олії

5 Відмінною ознакою є те, що для відтворення гострого токсичного гепатиту спочатку протягом п'яти діб вводиться донатор готових молекул оксиду азоту - нітропрусид натрію.

Спосіб здійснюють наступним чином: лабораторним щурам масою 180-230 г, протягом 5 діб внутрішньочеревно вводили 1 % розчину натрію нітропрусида на фізіологічному розчині, в дозі 2,5 мг/кг ваги тіла. На останню добу підшкірно вводили 50 % розчин CCl_4 на оливковій олії в дозі 10 0,4 мл на 100 г маси тварини. Тварин виводили з експерименту на четверту добу після введення CCl_4 . Розчини готували безпосередньо перед введенням (згідно з рекомендаціями виробника препаратів).

Встановлено, що через 7 днів після чотириразового введення CCl_4 в печінці щурів розвивається гострий гепатит, основою якого є переважно поширена жирова дистрофія, яка 15 займає 40-80 % всієї площі, та завжди локалізована навколо портальних трактів з найбільшим ураженням I-II зони ацинусів (Схема. 1). Запальна інфільтрація відсутня. Переважна більшість гепатоцитів, не порушених дистрофією, перебуває у стані еозинофільної дегенерації. Локально у I зоні ацинуса зазначалося прогресування дистрофії з розвитком балонної.

Фіг. 1. Печінка щура, вплив CCl_4 на тлі введення натрію нітропрусидного. Локалізована 20 жирова дистрофія, переважно в 1 зоні ацинуса, елементи балонної дистрофії. Портальні тракти розширені, переповнені кров'ю. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб. $\times 100$.

Розвиток гострого гепатиту на тлі надлишку оксиду азоту у 75 % тварин супроводжувалося менш поширеною, але більш вираженою жировою дистрофією з локальними фокусами некрозу (Схема. 2 А).

Фіг. 2. А. Печінка щура, вплив CCl_4 на тлі введення натрію нітропрусидного. Локалізована 25 жирова дистрофія, переважно в 1 зоні ацинуса, елементи балонної дистрофії. Портальні тракти розширені, переповнені кров'ю. Забарвлення гематоксиліном та еозином, зб. $\times 100$; Б. Печінка щура, вплив CCl_4 на тлі введення NG-нітро-L-аргініну (L-NNA). Локалізована жирова дистрофія, переважно в 1 зоні ацинуса. Розширення синусоїдів та центральної вени. Забарвлення 30 гематоксиліном і еозином, зб. $\times 100$.

При моделюванні гострого гепатиту на тлі введення донатора NO активність AP мала тенденцію до підвищення на 9,9 % в порівнянні з групою контролю та виявлена тенденція до зниження NOx на 16,1 %, що аналогічно для біохімічних показників в I групі, де модель гепатиту створювали класичним способом.

Застосування заявленого способу підтвердило модель гострого токсичного гепатиту шляхом 35 одноразового введення CCl_4 на тлі надлишку NO, що підтверджувалося характерними для гепатиту морфологічними змінами та компенсаторною відповіддю організму у вигляді підвищення активності аргінази та зменшення вмісту метаболітів оксиду азоту в гомогенаті печінки, що також свідчить про напруження регуляторних систем, його працеспроможність і 40 можливість застосування при моделюванні експериментального гепатиту.

Заявлений спосіб має суттєві відмінні ознаки у порівнянні з найближчим аналогом, які разом із вже відомими, дозволять досягнути технічний результат: запропонувати легковідтворювану модель токсичного гепатиту, яка потребує меншого часу та менш затратна.

Джерела інформації:

45 1. Картіфузова Ж.В. Вплив даларгіну на морфоструктуру тканини печінки та активність ферментів сироватки крові щурів за умов моделювання підгострого алкогольного гепатиту /Ж.В. Картіфузова, Є.М. Решетнік, Павлович С.І., Пустовалов А.С. та ін. //Вісник наукових досліджень. - 2010. - № 1. - С. 88-91.

2. Наконечна О.А. Активність індикаторних ферментів печінки та вміст альбуміну в крові 50 щурів за умов тривалої дії протистих поліефірів. //Медицина сьогодні і завтра. - 2008. - № 4. - С. 12-14.

3. Дереча Л.М. Активність металоферментів органів і тканин експериментальних тварин при дії етанолу /Л.М. Дереча, М.В. М'ясоєдов, Ю.Г. Беспалов, К.В. Носов //Медицина сьогодні і 55 завтра. - 2009. - № 1. - С. 4-9.

4. Самбуева З.Г. Влияние липосомальной формы перхлорона на морфо-функциональное состояние печени и почек у белых крыс /З.Г. Самбуева, Г.Н. Малханова, И.А. Павлов, С.М. Гуляев и др. //Сибирский медицинский журнал. - 2009. - № 3. - С. 24-26.

5. Эндотелиальная синтаза оксида азота как важный фактор при экспериментальном фиброзе печени /Tung-Ming Leung, George I. Tipoe, Emily C Liong, [et al] /Сучасна 60 гастроентерологія. - 2010. - № 5 (55). - С. 109-119.

6. Оцінка протеїнсинтезуючої функції печінки за експериментального гепатиту /В.А. Грищенко, В.А. Томчук, О.М. Литвиненко, В.О. Чернищенко [та ін.] //Укр. біохім. журнал. - 2011. - Т.83. - № 1. – С. 63-68.

7. Воробець З.Д. Аргіназна система в організмі людини при розвитку патологічних процесів /З.Д. Воробець, У.П. Єфремова, О.І. Якубець /Клінічна та експериментальна патологія. - Т XI. - № 3 (41), Ч. 2. - 2012. - С. 153-160.

8. Функціонально-морфологічні зміни печінки при експериментальному гепатиті /А.І. Руденко, Л.Я. Мельниченко, І.А. Кленіна та ін. /Вісник проблем біології та медицини. - 2012. - Вип. 3. - Том 2 (95). – С. 191-194.

9. Патент № 68239 Україна, МПК (2012.01) G09B 23/00 Спосіб моделювання гепатиту в експерименті Руденко А.І., Кленіна І.А., Челкан В.В., Плотніченко Н.В. - Заявл. 29.06.2011. - Опубл. 26.03.2012. - Бюл. № 6.

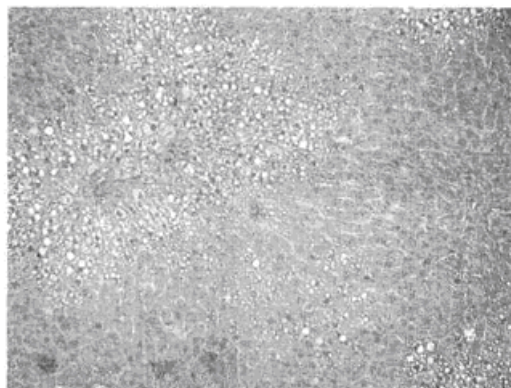
10. Патент № 43704 Україна, МПК (2009) G09B 23/00 Спосіб моделювання хронічного токсичного гепатиту та цирозу печінки у нестатевозрілих щурів Рикало Н.А., Незгода І.І., Рауцкіс В.А. - Заявл. 10.04.2009. - Опубл. 25.08.2009. - Бюл. № 16.

11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /под общ. ред. Р.У. Хабриева, 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина. - 2005. - С. 685.

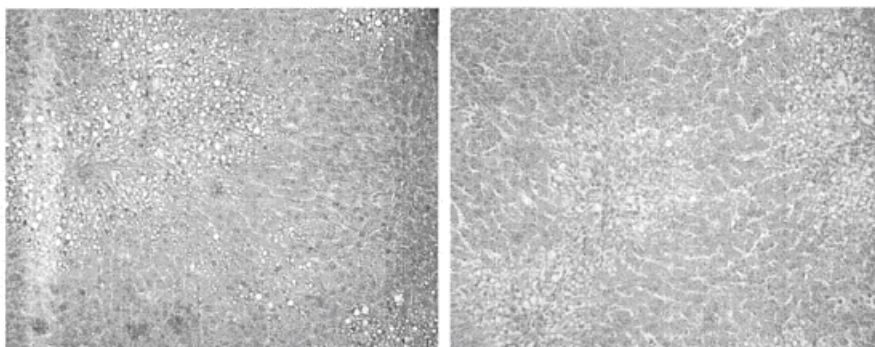
20

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання гострого токсичного гепатиту в експерименті, який включає введення лабораторним тваринам тетрахлористого вуглецю, який **відрізняється** тим, що тетрахлористий вуглець вводять однократно після п'ятидобового введення нітроприсида натрію.



Фіг.1



А.

Б.

Фіг.2

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601