



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **112103**

(13) **U**

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 02791**

(22) Дата подання заявки: **21.03.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **12.12.2016**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **12.12.2016, Бюл.№ 23**

(72) Винахідник(и):

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

(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання цирозу печінки в експерименті на лабораторних тваринах включає введення тетрахлоретану. Спочатку підшкірно вводять 4 мл/кг 50 % олійного розчину тетрахлорметану протягом трьох днів, а потім два рази на тиждень підшкірно вводять 0,4 мл/кг 10 % розчину тетрахлорметану у вигляді олійного розчину протягом 8 тижнів.

UA 112103 U

Спосіб належить до галузі медицини, а саме до способів моделювання цирозу печінки в експерименті, та може бути використаний в лабораторіях, науково-дослідних установах, для вивчення як патогенетичних механізмів ураження печінки так і ефективності впливу терапевтичних препаратів на морфо-функціональний стан гепатоцитів на прикладі дрібних лабораторних тварин.

Цирози печінки різної етіології - широко поширені і вкрай небезпечні для життя людини хронічні захворювання, число яких в багатьох країнах постійно зростає. У 2011 р. показник поширеності цирозу печінки був зареєстрований на рівні 143,1 на 100 тис. дорослого населення. З 2006 р. відбулось його зростання на 8,6 % (у 2006 р. - 131,8). При цьому, показник уперше встановлених діагнозів за вказані 6 років знизився на 12,5 % і становив у 2011 р. 27,4 проти 31,3 у 2006 р.²

Зростання медичної та соціальної значущості хронічних захворювань печінки вимагає нових зусиль у розробці питань їх етіології, патогенезу, імунології, діагностики, лікування та профілактики. Відтворення в експерименті на тваринах моделей гепатиту та цирозу печінки, близьких до клінічних умов, все ще необхідне. Експериментальні моделі дозволяють дати комплексну оцінку та розробити методи адекватної корекції печінкової недостатності, що не завжди можливо в клінічних дослідженнях.³

Цироз печінки характеризується розростанням сполучної тканини, перебудовою судинного русла паренхіми, загибеллю значної частини гепатоцитів і цілим рядом інших змін, що ведуть до втрати дольової структури органу [-]. Незважаючи на певні успіхи в розумінні патогенезу і терапії цього захворювання, необхідно відзначити, що воно не в повному обсязі вивчено, та часом представлені суперечливі відомості про ступінь пошкодження і значення порушень енергетичного обміну при токсичному ураженні печінки⁵

У лабораторних тварин гостре і хронічне ураження печінки можна викликати різними методами: оперативними - резекція печінки; хімічними - введення токсичних агентів (тетрахлорметан, тноацетамід, діпін та ін.); спеціальними дієтами (холін-дефіцитна та ін.); поєднанням гепатотоксинів з гепатоканцерогенами; генетичні моделі^[6789].

Серед токсичних моделей широке поширення отримала модель ураження печінки, індукованого тетрахлорметаном (CCl_4 , чотирихлористий вуглець). У літературних джерелах наведені суперечливі дані про перевагу тієї чи іншої моделі токсичного пошкодження печінки: вказуються на недоліки і переваги різних моделей^[10].

Найбільш часто як об'єкт для моделювання використовують щурів. Суть моделі полягає у введенні щурам 50 % розчину CCl_4 на оливковій олії з розрахунку 1 мл на кг маси тіла два рази на тиждень. При цьому способі гострий токсичний гепатит розвивається через 2 доби після початку експерименту, цироз печінки - через 2 місяці. Цироз печінки був постнекротичним і переважно мультилобулярним^[11]. Проте, у даній моделі є ряд недоліків. По-перше, при однакових умовах експерименту до 60-ї доби у різних щурів розвивались різні морфологічні зміни в печінці, що свідчить про неоднакову чутливість до тетрахлорметану. По-друге, після відміни препарату фіброзні циротичні зміни в печінці носили оборотний характер. Це пов'язано, в першу чергу, з дуже високою регенераторною здатністю печінки щурів.

Найближчим прототипом до заявленого способу є модель тетрахлорметан-індукованого цирозу, відтворена шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину CCl_4 (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту, і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю^[12]. Через 8 тижнів в печінці щурів відмічались порушення характерні для сформованого цирозу. Але недоліком такого способу моделювання хронічних процесів є поліетіологічна природа виникнення патологічного процесу внаслідок синергії дії як специфічного гепатотоксичного агенту так і незбалансованості раціону харчування. Окрім цього процедура інтрагастрального зондового введення протягом довгого періоду часу є стресуючою для тварин, викликає певні травматичні зміни в стравоході, як наслідок - суттєва летальність в процесі моделювання, крім того дана модель потребує і неабияких навиків та суттєвих працезатрат. Цей спосіб, як найбільш близький до того, що заявляється, за технічною суттю та ефектом, який досягається, вибрано за прототип.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити ефективну модель цирозу печінки, яку можна відтворити за відносно короткий проміжок часу, з максимально вираженими морфологічними змінами в печінці та з мінімальними затратами ресурсів.

Поставлена задача відтворення цирозу печінки вирішується наступним чином: попередньо відтворюється гострий тетрахлорметан-індукований токсичний гепатит за стандартизованою

методикою, в подальшому щурам протягом 8 тижнів вводять два рази на тиждень по 0,4 мл/кг 10 % розчину в оливковій олії тетрахлорметану.

Загальною ознакою з прототипом є використання як гепатотоксину олійного розчину тетрахлорметану та загальна тривалість формування цирозу печінки у щурів.

Відмінною ознакою є те, що моделювання здійснюється шляхом підшкірного введення тетрахлорметану та ґрунтується на переході сформованого гострого токсичного гепатиту в цироз шляхом подальшого підшкірного введення 10 % розчину в оливковій олії тетрахлорметану, що направлено для попередження самореабілітації.

Спосіб здійснюють наступним чином: лабораторним щурам масою 180-230 г, підшкірно вводили тетрахлорметан в дозі 2 мл/кг в вигляді 50 % розчину на оливковій олії протягом трьох днів, після чого два рази на тиждень вводили 0,4 мл/кг тетрахлорметану у вигляді 10 % розчину в оливковій олії протягом 2 місяців. Виведення тварин здійснювали через 8 тижнів від початку моделювання.

Застосування заявленого способу підтвердило модель що супроводжувалась характерними морфологічними змінами. Відтворення гострого гепатиту, що ґрунтується на введенні CCl_4 підшкірно щурам, у вигляді 50 % розчину на оливковій олії протягом чотирьох днів характеризувався 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. Після 8 тижнів введення 0,4 мл/кг тетрахлорметану у вигляді 10 % розчину в оливковій олії у щурів розвивалися початкові стадії мікронодулярного цирозу печінки, дрібно-середньокрапельна жирова дистрофія по периферії часточок та поширена зерниста дистрофія. Відмічалася проліферація жовчних проток, тонкі фіброзні септи з більш вираженим фіброзуванням в області портальних трактів (Фіг. 1). Звертали на себе увагу численні гепатоцити в стані еозинофільної дегенерації (тілця Каунсільмена) по периферії часточок - в тій області, де у інших тварин відзначалося формування фіброзних септ (схема. 2). Ознаки фіброзування було підтверджено при вимірюванні комп'ютерного індексу фіброзу (KIF), який представляє собою співвідношення видимої сполучної тканини до функціональної. Так, у тварин цієї групи KIF становив від 0,0048 до 0,0754 (середнє значення $0,0483 \pm 0,037$).

Печінка щура на 8-й тиждень після початку експериментального дослідження: Фіг. 1. Тонкі фіброзні порто-портальні септи, в деяких портальних трактах неповні. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченко, зб. 100х; Фіг. 2. Фіброзування відсутнє, характерна локалізація тілець Каунсільмена. Забарвлення гематоксином та еозином, зб. 100х;

Через 9 тижнів в печінці експериментальних тварин розвивався мікро-макронодулярний цироз. Відмічалася наявність розсіяних гепатоцитів в стані еозинофільної дегенерації, псевдодольки різного розміру, розширення центральних вен. KIF становив від 0,1599 до 0,1786 (середнє значення $0,167 \pm 0,025$).

Печінка щура на 9-й тиждень після початку експериментального дослідження. Мікро- та макронодулярний цироз. Забарвлення за Маллорі в мод. Слінченко, зб. 100X

Хронічне введення тетрахлоретану викликало у щурів розвиток мікро-макронодулярного цирозу печінки, який не супроводжувався самореабілітацією, морфологічно характеризувався розширенням синусоїдів та значним підвищенням апоптотичної активності.

Все це свідчить про працеспроможність даної методики і дає можливість застосовувати її для вивчення патогенетичних механізмів та впливу лікарських засобів на стан гепатоцитів.

Заявлений спосіб має суттєві відмінні ознаки у порівнянні з прототипом, які разом із вже відомими, дозволять досягнути технічний результат: запропонувати модель цирозу печінки, яка потребує меншого часу та менш затратна.

Джерела інформації:

1. Лебедева Е.И. Морфометрические показатели гепатоцитов белых крыс и человека при токсическом циррозе печени // *Universum: медицина и фармакология*. 2015. - № 7-8 (19). Сб.

2. Степанов Ю.М. Гастроентерологічна допомога населенню України: основні показники здоров'я та ресурсне забезпечення у 2011р. / Ю.М. Степанов, І.Ю. Скирда // *Гастроентерологія*. - 2013 - № 1(47). - С. 8-12.

3. Лызиков А. Н., Осипов Б. Б., Скуратов А. Г., Зиновкин Д. А., Михасев А. М. Модель токсического поражения печени у кроликов // *Проблемы здоровья и экологии*. 2015. - № 2 (44). - С.45-50.

4. Арутюнян И.В. Моделирование цирроза печени на лабораторных животных // *Клиническая и экспериментальная морфология*. - 2012. - № 2. - С. 45-50.

5. Безбородкина Н.Н. Морфометрия митохондриального аппарата гепатоцитов нормальной и цирротически измененной печени крыс // *Цитология*. - 2008. - Т. 50, № 3. - С. 228-235.

6. Constandinou, C. Modeling liver fibrosis in rodents / C. Constandinou, N. Henderson, J. P. Iredale // *Methods Mol Med.* - 2005. - Vol. 117. - P. 237-250.

7. Abrales, J. G. Animal model of portal hypertension / J. G. Abrales, M. Pasarin, J. C Garcia-Pagan // *World J. Gastroenterol.* - 2006. - Vol. 12, № 41. - P. 6577-6584.

5 8. Hayashi, H. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knock out mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* - 2011. - Vol. 300(5). - P. 729-738

9. A stable model of cirrhotic portal hypertension in threat: thioacetamide visited / W. Laleman [etal.] // *Eur. J. Clin. Invest.* - 2006. - Vol. 36, № 4. - P. 242-249.

10 10. Mullen, K. D. Problem with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization / K. D. Mullen, A. J. McCullough // *Hepatology.* - 1989. - №9. - P. 500-503.

11. Экспериментальное моделирование токсического повреждения печени / А.Г. Скуратов [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* - 2011. - № 4 (30). - С. 27-33.

15 12. Криницька І.Я. Морфологічні зміни печінки та легень у щурів з гепатопульмональним синдромом, модельованим шляхом тривалого введення тетрахлорметану. // *Вісник проблем біології і медицини.* - 2012. - Вип.2, Т. 2 (93). - С. 194-197.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20

Спосіб моделювання цирозу печінки в експерименті на лабораторних тваринах, що включає введення тетрахлоретану, який **відрізняється** тим, що спочатку підшкірно вводять 4 мл/кг 50 % олійного розчину тетрахлорметану протягом трьох днів, а потім два рази на тиждень підшкірно вводять 0,4 мл/кг 10 % розчину тетрахлорметану у вигляді олійного розчину протягом 8 тижнів.



Fig. 1



Fig. 2

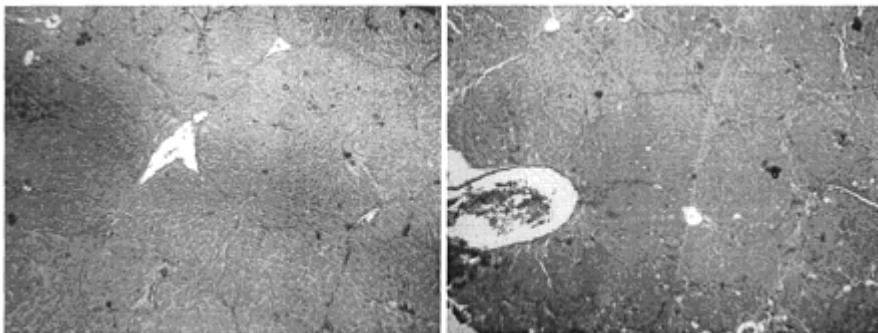


Fig. 3

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