



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **68239** (13) **U**
(51) МПК (2012.01)
G09B 23/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2011 08148	(72) Винахідник(и):	Руденко Анатолій Іванович (UA), Кленіна Інна Анатоліївна (UA), Челкан Віра Володимирівна (UA), Плотніченко Наталя Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	29.06.2011	(73) Власник(и):	ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, пр. Правди, 96, м. Дніпропетровськ, 49074 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	26.03.2012		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.03.2012, Бюл.№ 6		

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГЕПАТИТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання гепатиту в експерименті включає введення лабораторним тваринам хімічної сполуки. Спочатку тварин адаптують до умов експерименту, після чого вводять препарат NG-нітро-L-аргінін.

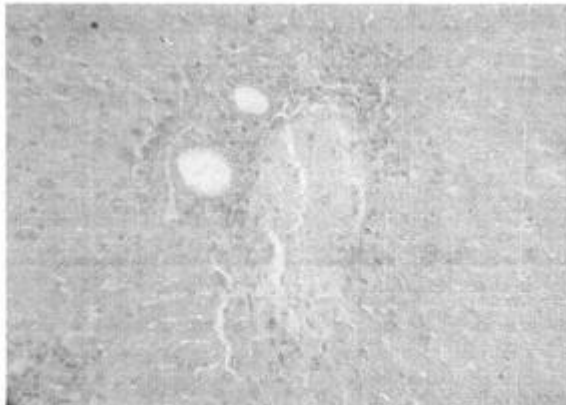


Схема 1 Печінка щура в умовах пригнічення NO-синтаз. Портальний тракт. Венозний стаз крові і розширення жовчних проток. Лейкоцити в стромі. Поширений апоптоз гепатоцитів прикордонної пластини. Фарбування гематоксиліном та еозином. X 200.

UA 68239 U

Корисна модель належить до біології і медицини, а саме до патофізіології, токсикології, і може бути застосований в експериментальній гастроентерології для вивчення патогенезу хронічного токсичного гепатиту.

Хронічні дифузні захворювання печінки (ХДЗП) не вірусної етіології є предметом активного вивчення останніх кількох десятиків років. До них належить група захворювань, викликаних тривалим впливом різних гепатотоксичних сполук, які порушують структуру та функцію печінки. Головними формами ХДЗП як послідовних стадій єдиного патологічного процесу є стеатоз печінки, хронічний гепатит (ХГ) (стеатоз печінки з некрозами гепатоцитів та мезенхімальною реакцією) та цироз печінки (незворотній і неодмінно прогресуючий процес).

Відомо, що важливу роль в стимуляції проліферації зірчастих клітин відіграють ендотеліальні фактори: ендотелій-1, монооксиду нітроген, ангіотензин-П, тромбін та інші, і що найменший дисбаланс у складній і взаємопов'язаній ендотеліальній системі призводить до тяжких пошкоджень в діяльності гепатоцитів. Фіброзування печінкової тканини належить до статичних (незворотних) чинників зростання печінкового судинного опору. Динамічними, або ж зворотними, факторами є дисбаланс місцево діючих вазоактивних речовин: монооксиду нітрогену та ендотеліну-1. Ці медіатори продукуються ендотелієм судин та синусоїдальними клітинами. Тому участь NO в розвитку патологічного процесу не викликає сумніву.

Існує багато методів моделювання гепатиту в експерименті. Перев'язка ворітної вени і печінкової артерії або емболії цих судин у тварин була використана багатьма дослідниками як одного з основних методів вивчення в експерименті гепаторенального синдрому (Саркисов Д. С., Ремисов П. И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте / Москва, 1960, 780 с.).

Недоліком таких методів є те, що некротичні зміни в печінці виникають уже через 8-12 годин, тобто спостерігається розвиток гострого гепатиту, який не переходить у хронічну фазу, тому що тварини гинуть.

Крім того для отримання дистрофічних змін в гепатоцитах у тварин широко застосовуються різні органічні і неорганічні хімічні речовини. Використання їх дає можливість вивчати як патогенез і динаміку розвитку деструктивних змін в печінці, так і деякі питання фізіології печінкових клітин. Показано, що під впливом одних з цих речовин вражаються вибірково центральні відділи печінкових часточок, при дії других - периферія їх і, нарешті, в деяких випадках ушкоджуються, головним чином, ділянки, розташовані між центрами часточок і їх периферією (так звані середньозональні некрози). На підставі цих спостережень ряд авторів висловлює думку про неоднакову функціональну значущість часточок печінки в різних відділах.

Один з найбільш поширених способів отримання у тварин дистрофії печінки заснований на використанні чотирехлористого вуглецю (Скаун Н. П., Писько Г. Т., Мосийчук И. П. Поражение печени четырехлористым углеродом / НИИТЭХИМ Москва, 1989, 105 с.). Досліди ставляться на собаках, кішках, кроликах, морських свинках, щурах і мишах, яким чотирехлористий вуглець вводиться різними способами (під шкіру, через рот і інгаляційно) у вигляді 40-50 % розчину на соняшниковій або персиковій олії. Як найближчий за технічною суттю та ефекту, що досягається, цей спосіб вибрано за прототип.

Недоліком способу є велика токсичність чотирехлористого вуглецю, що веде до утворення токсичного гепатиту з переходом його у цироз печінки, що негативно впливає на результати моделювання.

Відома участь NO-синтаз (NOS) в розвитку експериментального гепатиту, особливо при надлишку NO, тоді як в умовах його недостаті при інгібуванні всіх ізоформ (NOS iNOS, eNOS і nNOS) може спричинити порушення печінкового кровообігу і привести до розвитку функціонально-морфологічних змін гепатоцитів. У зв'язку з цим правомірним є створення нової моделі експериментального гепатиту, що ґрунтується на інгібуванні неспецифічної NOS (Шерлок III., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей. / Пер. с англ. - М: ГЭОТАР-МЕД, 2002. - С. 864).

Загальними ознаками способу, що заявляється, і прототипу є використання хімічної речовини для досягнення заявленого ефекту ураження печінки у лабораторних тварин.

Відмітними ознаками є те, що корисна модель заснована на інгібуванні неспецифічної NOS і може бути реалізована за допомогою використання препарату NG-нітро-L-аргінін.

Виконання способу моделювання хронічного гепатиту здійснюється наступним чином: лабораторних щурів масою 180-220 г спочатку 10-12 днів адаптували до умов експерименту (для зняття стану стресу), тобто проводилась імітація введення внутрішньочеревної ін'єкції неспецифічного блокатора NO синтази. Тільки після цього приступали до моделювання хронічного гепатиту невірусної етіології, яке здійснювалось за допомогою 12-и денного введення NG-нітро-L-аргініну. Тривале введення NG-нітро-L-аргініну супроводжувалось

погіршенням апетиту, а також відмічалось незначне схуднення на 5,0-9,0 грам маси тіла кожної тварини.

Зміна загального стану тварин супроводжувалась морфологічними змінами в печінці. Так, у більшості щурів на 12-й день недостатності NO синтази визначалась морфологічні зміни за допомогою морфологічних і біохімічних досліджень.

Так, у більшості щурів на 12-й день створення дефіциту NO визначались зміни гістоструктури печінки: стазом крові у венах портальних трактів (який проявлявся поширенням діаметру просвіту вен, заповнених плазмою та елементами крові (схема 1). Аналогічна картина була у центральних венах печінкових часток (схема 2). Одночасно спостерігався апоптоз гепатоцитів прикордонної пластинки портальних трактів, у перипортальній, інтермедіарній і періцентральної зонах паренхіми печінкових часток. У портальних трактах накопичувались лейкоцити (схеми 1, 2). Типовим був дрібнокраплинний жировий гепатоз печінки (схема 3).

У корисній моделі пригнічення відомих NO-синтаз за допомогою неспецифічного інгібітора викликали деструктивні зміни у печінці, внаслідок порушення в ній кровообігу (застій крові, циркуляторна гіпоксія), зниження антиоксидантної активності печінки (апоптоз, дрібнокраплинна жирова дистрофія).

Морфологічні зміни в печінці при моделюванні дефіциту NO супроводжувались змінами білкового обміну в організмі щурів.

Результати досліджень біохімічних показників білкового обміну сироватки крові у щурів при тривалому дефіциті NO наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Вміст загального білку та білкових фракцій сироватки крові щурів на 6-ту та 12-ту добу експериментального гепатиту

Групи	ЗБ, г/л	Фракції, %				
		A1	$\alpha 1$	$\alpha 2$	β	γ
Інтактні тварини (n=7)	51,91 \pm 5,60	57,75 \pm 2,09	4,20 \pm 1,30	8,58 \pm 1,2	10,25 \pm 0,7	15,87 \pm 3,1
6-та доба (n=7)	37,15 \pm 1,92	37,88 \pm 1,0**	11,57 \pm 1,3	10,70 \pm 1,0**	16,37 \pm 1,4	21,59 \pm 2,5
12-та доба (n=7)	31,95 \pm 3,40	31,30 \pm 2,66*	10,20 \pm 2,0	10,34 \pm 0,94	15,46 \pm 2,3	24,46 \pm 3,3

Примітки:

1. * - $p < 0,05$ вірогідність змін між показниками щурів в порівнянні з інтактними;

2. ** - $p < 0,01$ вірогідність змін між показниками щурів в порівнянні інтактними;

Як свідчать дані таблиці 1 у тварин з експериментальний гепатит (ЕГ) на 6-ту добу пригнічувалась білковосинтетична функція печінки, про що свідчило зниження вмісту загального білка (ЗБ) в 1,4 разів до (37,15 \pm 1,92) г/л, в основному за рахунок підвищення глобулінових фракцій ($\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -глобулінів). В подальшому на 12-ту добу зниження вмісту ЗБ було ще більш вираженим - в 1,6 разів до (31,95 \pm 3,40) г/л. Відбувалось також і порушення співвідношення між альбумінами та глобулінами, що слугує переконливою ознакою глибини функціонального порушення печінки.

Виявлено, що у щурів, як на 6-ту так і на 12-ту добу, у сироватці крові відбувається Так, у щурів на 6-ту добу було виявлено зниження вмісту альбуміну в 1,5 разів до (37,88 \pm 1,0) %, ($p < 0,01$); на 12-ту добу вміст альбуміну сироватки крові знижувався в 1,8 разів до (31,30 \pm 2,66) %, ($p < 0,05$). Зниження альбуміну свідчить про зниження синтезуючої здатності печінки, а дефіцит його поповнюється збільшенням кількості однієї чи декількох фракцій глобулінів.

Найбільш стабільною є β -фракція, зміни якої відбуваються при крайніх ступенях дегенеративних змін печінки, що можна спостерігати у щурів на 6-ту та 12-ту добу, де вміст β -глобулінів був підвищеним в 1,6 разів до (16,37 \pm 1,45) %, та в 1,5 разів до (15,46 \pm 2,3) %.

У щурів, як на 6-ту так і на 12-ту добу, вміст α -глобулінів був підвищений що свідчить про преволування дегенеративних процесів у печінці.

Було виявлено підвищення γ -глобулінів у щурів на 6-ту добу - в 1,3 разів до (21,59 \pm 2,59) %, та на 12-ту добу - в 1,5 разів до (25,47 \pm 2,24).

Виявлений підвищений вміст γ -глобулінів, більш виражений у щурів на 12-ту добу, що можливо обумовлено інфільтрацією печінки мононуклеарними елементами ретикуло-ендотеліальної системи, яка мобілізує купферовські клітини, фагоцитуючих детритні маси загублених клітин та накопичують γ -глобуліни.

Таким чином, у щурів виявлено порушення білково-синтетичної функції печінки, що супроводжувалося гіпоальбумінемією та гіпергаммаглобулінемією.

Таблиця 2

Характеристика змін біохімічних показників сироватки крові щурів з експериментальним гепатитом.

Показники	МДА, нМоль/мл	ЦП, мг/мл
	M±m	M±m
Інтактні тварини (n=7)	3,62±0,13	254,85±9,17
ЕГ 6-та доба (n=5)	4,94±0,35*	298,75±10,39**
ЕГ 12 доба (n=7)	5,67±0,88*	457,13±21,2***

1. * - $p < 0,05$ вірогідність змін між показниками щурів у порівнянні з інтактними;
2. ** - $p < 0,01$ вірогідність змін між показниками щурів у порівнянні з інтактними;
3. *** - $p < 0,001$ вірогідність змін між показниками щурів у порівнянні з інтактними.

5 Як видно з таблиці 2, вміст малоновий деальдегід (МДА) у контрольній групі складав (3,62±0,13) нмоль/л. Після введення препарату на 6-ту добу вміст вторинного продукту ПОЛ - МДА підвищувався в 1,4 разів і складав (4,94±0,35) нмоль/л, ($p < 0,05$). На 12 добу після введення нітро-L-аргініну вміст МДА був максимально підвищеним - у 1,6 разів (5,67±0,88) нмоль/л, ($p < 0,05$).

10 Цирулоплазмін (ЦП) оцінюється як головний циркулюючий фермент АОЗ плазми, який має супероксидазну активність. Збоку неклітинного антиоксиданту ЦП виявлене відповідне компенсаторне підвищення його активності у відповідь на інтенсифікацію процесів ПОЛ. Так у щурів на 6-ту добу вміст ЦП підвищувався в 1,2 разів до (298,75±10,39) мг/мл, ($p < 0,01$), а на 12 добу - в 1,8 разів до (457,13±21,2) мг/мл, ($p < 0,001$).

15 Відповідно, після введення нітро-L-аргініну відбувається накопичення токсичного вторинного продукту ПОЛ - МДА вже на 6 добу, максимум його накопичування реєструвався на 12 добу.

Таким чином, моделювання гепатиту після введення нітро-L-аргініну у тварин призводило до паталогічних змін усіх визначуваних біохімічних показників білкового обміну та ПОЛ вже на 6 добу. Підвищення активності ферменту антиоксидантного захисту - ЦП у щурів може бути розцінено, як позитивна прогностична ознака, необхідний для захисту біологічних мембран ушкоджених клітин від дії перекисів.

Максимальна вираженість паталогічних змін спостерігалась на 12 добу після введення нітро-L-аргініну.

25 У порівнянні з прототипом, запропонована модель токсичного гепатиту є легше відтворюваною, потребує менше часу та менш працезатратна.

Таким чином, нами розроблено нову модель варіанту стеатогепатиту (з ознаками дрібнокраплинної жирової дістрофії, апоптозу гепатоцитів, появою лейкоцитів в портальних трактах).

30 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання гепатиту в експерименті, який включає введення лабораторним тваринам хімічної сполуки, який **відрізняється** тим, що спочатку тварин адаптують до умов експерименту, після чого вводять препарат NG-нітро-L-аргінін.

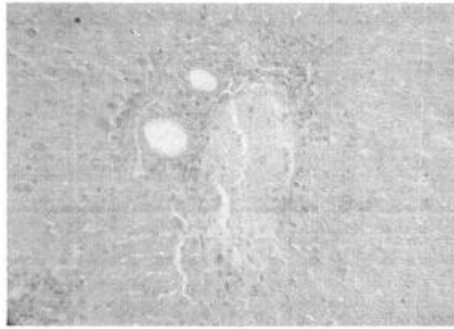


Схема 1 Печінка щура в умовах пригнічення NO-синтаз. Портальний тракт. Венозний стаз крові і розширення жовчних проток. Лейкоцити в стромі. Поширений апоптоз гепатоцитів прикордонної пластини. Фарбування гематоксиліном та еозином. X 200.



Схема 2 Печінка щура в умовах пригнічення NO-синтаз. Стаз крові в центральній венулі. Дрібнокраплинна ліпідна дистрофія гепатоцитів перивенозної зони. Апоптоз поодиноких гепатоцитів. Фарбування гематоксиліном і еозином. X 200.

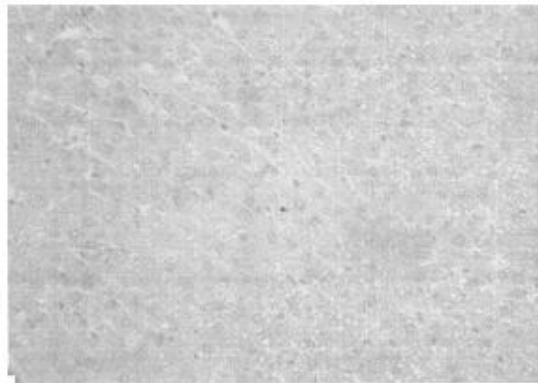


Рис. 3 Печінка щура в умовах пригнічення NO-синтаз. Зональна дрібнокраплинна жирова дистрофія печінки. Фарбування гематоксиліном та еозином. X 200.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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

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