



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **93351** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
A61B 5/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 04698	(72) Винахідник(и): Макогон Наталія Володимирівна (UA), Вознесенська Тетяна Юріївна (UA), Павлович Світлана Іванівна (UA), Бризгіна Тетяна Михайлівна (UA), Мартінова Тетяна Василівна (UA), Шепель Олена Анатоліївна (UA), Грушка Наталія Георгіївна (UA), Сухіна Віра Степанівна (UA), Литвиненко Аліна Петрівна (UA), Блашків Тарас Вірославович (UA), Янчій Роман Іванович (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.05.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2014, Бюл.№ 18	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАНУ, вул. Богомольця, 4, м. Київ-24, 01024 (UA)

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ СИСТЕМНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ У МИШЕЙ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей включає внутрішньовенне введення антигену - бичачого сироваткового альбуміну із зростаючою дозою. Після цього визначають функціональний стан яєчників та матки, життєздатність та загибель клітин імунної системи, гістоструктуру печінки, селезінки, нирок та аорти мишей.

UA 93351 U

Корисна модель належить до галузі медицини. Дана модель дає можливість вивчення механізмів розвитку хвороб у людини, що мають імунокомплексний компонент, а також сприятиме розробці та визначенню ефективності терапевтичних підходів за цих патологічних процесів.

На сьогодні імуноопосередковане ушкодження відіграє суттєву патогенетичну роль при значній кількості захворювань. Останнім часом засвідчують широку розповсюдженість патологічних процесів із наявністю імунокомплексного компонента при аутоімунних, алергічних, запальних та інфекційних хворобах (системний червоний вовчак, гломерулонефрити, ревматоїдний артрит, системні васкуліти тощо) [1, 2, 3].

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є модель хронічної гіперімунокомплексемії, що відтворюється на щурах [4], з модифікаціями в залежності від конкретних задач дослідження [5]. Тварини, яким моделювалась хронічна гіперімунокомплексемія в хвостову вену вводився бичачий сироватковий альбумін (БСА) з розрахунку 200 мг/кг кожні 7 днів протягом 8 тижнів. Однак всі розроблені на сьогоднішній день моделі імунокомплексної патології мають обмеження і не повністю відповідають механізмам та перебігу хвороб у людини. Досі не існує детально охарактеризованої моделі такої патології у мишей, оскільки відтворення імунокомплексного ушкодження у цих тварин має певні труднощі, пов'язані з особливостями функціонування їх систем природного і адаптивного імунітету. Розробка та характеристика такої моделі імунокомплексного ушкодження будуть корисними, зважаючи на те, що фізіологія та генетика мишей детально досліджені, а для 99 % генів цих тварин встановлено аналоги у людини. Відтворення імунокомплексної патології у мишей надасть можливість використати всю потужність генетичних підходів. Крім того, з практичної та економічної сторони є доцільним використання відносно недорогих малих тварин (мишей) для розробки та визначення ефективності терапевтичних підходів, оцінки побічних ефектів фармакологічних препаратів, їх токсичності та наслідків для наступних поколінь протягом відносно короткого часу [6].

Задачею корисної моделі є створення способу моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей з метою дослідження механізмів патоморфологічних змін судин, селезінки, печінки, нирок, яєчників та матки, а також з метою оцінки і визначення ролі гуморальної та клітинної ланок імунної системи за даної експериментальної патології.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей включає внутрішньовенне введення антигену - бичачого сироваткового альбуміну з визначенням ефекту введення антигену на рівень імунних комплексів в крові та їх відкладання в тканинах організму, згідно з корисною моделлю, що введення антигену відбувається із зростаючою дозою (150 мг/кг; 200 мг/кг; 250 мг/кг; 250 мг/кг; 300 мг/кг; 300 мг/кг маси миші) протягом 6 тижнів (раз на тиждень), після цього визначають функціональний стан яєчників та матки, життєздатність та загибель клітин імунної системи, гістоструктуру печінки, селезінки, нирок та аорти мишей.

Технічним результатом корисної моделі, що заявляється, є висока ефективність тестування засобів лікування хвороб з наявністю імунокомплексного компонента в патогенезі.

Спосіб дозволяє за допомогою введення мишам антигену - бичачого сироваткового альбуміну спричиняти активацію імунокомпетентних клітин і утворення патологічних імунних комплексів, що викликає системне імунокомплексне ушкодження органів і систем. Посилення клітинних і гуморальних реакцій імунної системи призводить до патологічних змін в усіх досліджуваних органах мишей (селезінка, печінка, нирки, аорта, яєчник, матка).

Суть способу полягає в тому, що мишей імунізують протягом 6 тижнів (раз на тиждень) антигеном бичачого сироваткового альбуміну (150 мг/кг; 200 мг/кг; 250 мг/кг; 250 мг/кг; 300 мг/кг; 300 мг/кг маси миші), після чого визначають ефект введення антигену на: рівень імунних комплексів в крові та їх відкладання в тканинах організму; функціональний стан, життєздатність та загибель клітин імунної системи; гістоструктуру печінки, селезінки, нирок та аорти мишей. Модель надає можливість досліджувати механізми ушкодження різних органів за умов імунокомплексної патології, в тому числі яєчників (мейотичне дозрівання ооцитів та експресію окремих генів в клітинах фолікулярного оточення ооцитів) та матки мишей (скоротливу активність).

Приклад.

Дослідження проводилися на статевозрілих самцях мишей лінії СВА масою 18-22 г. При роботі дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Патологічний процес моделювали за допомогою внутрішньовенної імунізації мишей зростаючими дозами антигену - бичачого сироваткового альбуміну (БСА, Sigma, USA) раз на тиждень протягом 6 тижнів за такою схемою: 1 введення - 150 мг БСА/кг; 2-200 мг/кг; 3-250 мг/кг;

4-250 мг/кг; 5-300 мг/кг; 6-300 мг/кг маси миші. На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для подальшого дослідження.

Проведені дослідження показали, що за умов інтенсивного впливу антигенного стимулу (БСА) відбувається активація клітин як адаптивного, так і природного імунітету.

5 Ступінь клітинної сенсibiliзації до БСА визначали за допомогою реакції гальмування адгезії лімфоцитів, яка має достатню чутливість та специфічність. Було виявлено статистично вірогідні зміни адгезії лімфоцитів імунізованих мишей, які інкубувалися в присутності БСА. Так, для клітин лімфовузлів контрольних мишей було характерним посилення прилипання до скла при їх інкубації з БСА на 10,5 % (розкид від -28,4 % до +45,1 %), тоді як для лімфоцитів імунізованих тварин, що були інкубовані в присутності антигену, відзначалося зменшення кількості адгезованих клітин на 33,6 % (розкид від -75,0 % до -5,5 %), ($P < 0,01$) при порівнянні ступеня адгезії в контролі та за умов введення БСА. Ці дані вказують на активацію клітинної ланки адаптивного імунітету, зокрема антиген-специфічних лімфоцитів.

15 Встановлено також значне посилення функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності (за даними НСТ-тесту нейтрофілів периферичної крові мишей). Збільшувався відсоток формаган-позитивних клітин та індекс активації нейтрофілів (Табл. 1).

Таблиця 1

Показники клітинного складу лейкоцитів крові за умов моделювання системного імунотокплексного ушкодження у мишей

	Паличкоядерні нейтрофіли, %	Індекс активації нейтрофілів
Контроль	3,5±0,5	0,34±0,09
Введення БСА	15,5±1,8***	1,05±0,19**

** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$ - відносно контролю

20 Посилена активність клітин-ефекторів запалення із збільшенням продукції біологічно активних речовин, в тому числі активних форм кисню, є одним з важливих патогенетичних механізмів ушкодження різних тканин за умов імунотокплексної патології.

Свідченням індукованого імунізацією (БСА) запалення є зсув лейкограми крові вліво, із зростанням кількості паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів (Табл. 1).

25 Відомо, що розвиток імунної відповіді з посиленням проліферації та диференціації імунотокпетентних клітин супроводжується активаційною загибеллю лімфоцитів. Введення БСА в нашому експерименті призводило до посилення клітинної загибелі. Кількість живих клітин, виділених з лімфовузлів, зменшувалась за умов імунізації БСА (Табл. 2). Подібні зміни спостерігалися в лімфоцитах, виділених з тимуса.

Таблиця 2

Відсоток живих лімфоцитів за умов моделювання системного імунотокплексного ушкодження у мишей

	Клітини лімфовузлів, %	Клітини тимуса, %
Контроль	87,1±4,8	91,7±2,5
Введення БСА	76,9±3,9***	87,6±4,1*

* - $P < 0,05$; *** - $P < 0,001$ - відносно контролю.

30 Було встановлено посилення апоптозу імунотокпетентних клітин в 1,6 разу в порівнянні з контролем ($P < 0,01$). При цьому збільшувалася експресія Fas-рецептору (CD 95) на імунотокпетентних клітинах, виділених з лімфовузлів, за оцінкою середнього цитохімічного коефіцієнту реакції (контроль - 0,19±0,02; введення БСА 0,49±0,03 ($P < 0,001$)). Ці дані свідчать про індукцію активаційного, Fas-опосередкованого апоптозу імунотоктитів на фоні інтенсивного впливу антигенного стимулу (БСА).

40 Поряд з активацією клітин природного і адаптивного імунітету за умов введення БСА спостерігалися зміни гуморальної ланки імунної системи. Спостерігали збільшення вмісту малих циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові мишей з 54,7±9,5 у.о. в контролі до 66,1±11,2 у.о. за умов імунізації БСА, ($P < 0,05$).

Схема довготривалої імунізації БСА призводить до утворення і накопичення імунних комплексів в тканинах, причому в більшому ступені в кліренсних органах (селезінка, печінка). На відміну від інших моделей гіперімунотоксичності, які відтворюють в більшій мірі саме імунний гломерулонефрит [6], у імунізованих за розробленою нами схемою мишей не спостерігалось

максимальної фіксації імунних комплексів в нирках, тобто дані умови експерименту призводять саме до системних змін імунотоксичного генезу.

Показано, що у розробленій нами моделі відзначається ушкодження судинної системи, тобто відтворено деякі особливості патологічного процесу імунотоксичного генезу у людини, для якого характерною ознакою є наявність системних васкулітів.

Встановлено суттєве ушкодження яєчників мишей, у яких відтворювалась модель системного імунотоксичного ушкодження. У тварин виявлено зменшення кількості зрілих фолікулів, що виділялися з яєчника (великих фолікулів з яйцеклітиною з вираженою прозорою оболонкою та оточеною багатьма шарами фолікулярних клітин). Збільшувалася (у порівнянні з контролем) кількість ооцитів з атипічною морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою, ознаками фрагментації цитоплазми). В фолікулах мишей, імунізованих БСА, спостерігалася також дегенерація фолікулярних клітин. У тварин при культивуванні зменшувався відсоток клітин, що розчиняли зародковий пухирець (відновлення мейозу) та здатних до формування першого полярного тільця (Табл. 3), що засвідчує пригнічення оогенезу у тварин, імунізованих БСА.

Таблиця 3

Мейотичне дозрівання ооцитів за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження у мишей

	Відновлення мейозу, %	Формування першого полярного тільця, %
Контроль	84,1±3,5	57,0±1,2
Введення БСА	62,2±4,9*	41,1±4,4*

* - $P < 0,05$ - відносно контролю.

Зміна експресії оваріальних генів в фолікулярному оточенні ооцитів за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження у мишей зображена на кресленні.

Експресія гена HAS2 в клітинах фолікулярного оточення ооцитів зменшувалась в 1,7 рази, а гена GREM1 - в 1,4 рази /* - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ - відносно контролю/, що вказує на погіршення якості ооцитів

Ці результати свідчать, що системне імунотоксичне ушкодження призводить до порушення мейотичного дозрівання ооцитів мишей, що в подальшому позначиться на запліднюваності та розвитку ембріона.

За умов імунізації БСА скоротливість міометрію миші зазнавала функціональних змін. Виявлене ушкодження скоротливої активності матки може призвести до погіршення нідатції, виношування ембріонів та до патологічних пологів.

Отже системне імунотоксичне ушкодження, відтворене за допомогою імунізації мишей антигеном - бичачим сироватковим альбуміном призводить до патологічних змін в різних органах у мишей. Вважаємо, що виявлені нами патоморфологічні зміни пов'язані з активацією клітин неспецифічного та адаптивного імунітету, утворенням антитіл та патогенних імунних комплексів. Це призводить до секреції потужних вазоактивних і прозапальних чинників з наступним збільшенням клітинної загибелі, що в комплексі веде до посилення некротичних, запальних та аутоімунних процесів на системному рівні.

Таким чином, створення способу моделювання системного імунотоксичного ушкодження у мишей дає можливість для вивчення механізмів розвитку хвороб у людини, що мають імунотоксичний компонент, а також сприятиме розробці та визначенню ефективності терапевтичних підходів за цих патологічних процесів.

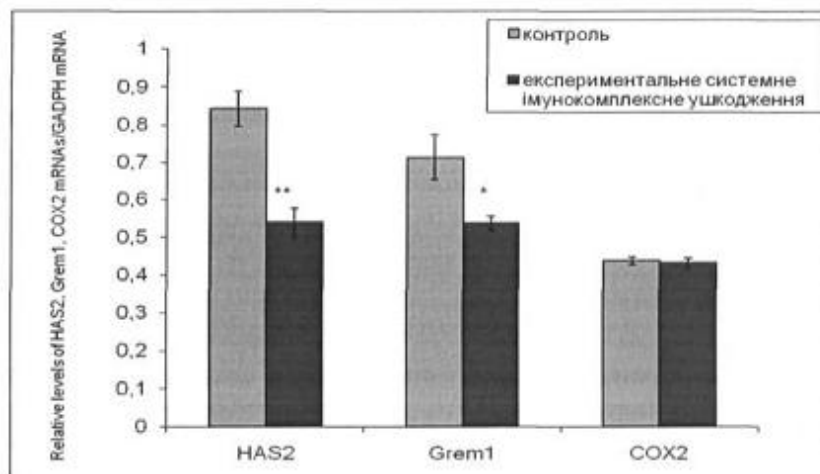
Джерела інформації:

1. Скрипченко и др. // Журнал инфектологии. - 2010. - Т.2, № 1. - С. 7-17;
2. Шмагель, Черешнев // Биохимия. - 2009. Т.74, № 5. - С. 581-592;
3. Jancar, Crespo // TRENDS in Immunology. - 2005. - Vol.26, № 1. - P. 48-55.
4. Cochrane, Koffler // Adv. Immunol. - 1973. - Vol. 16. - P. 185-264.
5. Чоп'як та ін. // Вісн. Наук. докл. - 2007. № 1. - С. 5-8.

6. Borza et al. // Am. J. Clin. Exp. Immunol. - 2013. - Vol. 2, № 2. - P. 135-145.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 5 Спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей, що включає внутрішньовенне введення антигену - бичачого сироваткового альбуміну з визначенням ефекту введення антигену на рівень імунних комплексів в крові та їх відкладання в тканинах організму, який **відрізняється** тим, що введення антигену відбувається із зростаючою дозою (150 мг/кг; 200 мг/кг; 250 мг/кг; 250 мг/кг; 300 мг/кг; 300 мг/кг маси миші) протягом 6 тижнів (раз на тиждень),
- 10 після цього визначають функціональний стан яєчників та матки, життєздатність та загибель клітин імунної системи, гістоструктуру печінки, селезінки, нирок та аорти мишей.



Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

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