

ТУРШИЛТЫН ХАРХАНД 4 ХЛОРТ НҮҮРСТӨРӨГЧӨӨР ӨДӨӨГДСӨН ЭЛЭГНИЙ ФИБРОЗЫН ЭМГЭГ ЗАГВАР ҮҮСГЭХ АРГАЗҮЙН ТОХИРОМЖТОЙ ГОРИМ

Тэгшбаяр Даваасамбуу¹, Батбаяр Батчимэг¹, Рагчаасүрэн Мөнх-Эрдэнэ№, Соёллхам
Бадамцэцэг№, Лхаасүрэн Ренчиндорж№, Лувсан Хүрэлбаатар^{1,2}, Баяраа Оюунчимэг^{1*}

¹Эм судлалын хүрээлэн, ²Монос Групп

*цахим хаяг: oyunchimeg.bay@monos.mn

REVIEW: OPTIMAL CONDITIONS OF CARBON TETRACHLORIDE INDUCED RAT HEPATIC FIBROSIS FOR EXPERIMENTAL MODELS

Davaasambuу Tegshbayar¹, Batchimeg Batbayar№, Munkh-Erdene Ragchaasuren№,
Badamtsetseg Soyollkham№, Renchindorj Lkhaasuren№, Khurelbaatar Luvсан^{1,2}, Oyunchimeg
Bayaraa№

№Drug research institute, ²Monos Group

*email: oyunchimeg.bay@monos.mn

ABSTRACT

Liver fibrosis is a key process in the progression of chronic liver diseases. It occurs when liver cells experience repeated damage and regeneration, leading to an excessive build-up and abnormal distribution of extracellular matrix components, such as collagen, glycoproteins, and proteoglycans, in the liver.

In vivo models of hepatic fibrosis are crucial for studying the development of liver fibrosis and evaluating potential antifibrotic therapies. These models aim to replicate the progressive scarring of liver tissue that occurs in chronic liver diseases. In vivo hepatic fibrosis models can be classified based on their underlying causes, including chemical, dietary, surgical, transgenic, and immune-mediated models. For instance, carbon tetrachloride (CCl₄) is known to induce significant fibrosis, while models of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) are used to investigate advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Among various models, the carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver fibrosis model is one of the most widely used experimental approaches. Its popularity stems from its reliability, reproducibility, cost-effectiveness, ease of implementation, and resemblance to human fibrotic liver injury. While this model is considered the gold standard in fibrosis research, it has several limitations that researchers must carefully consider. For instance, an overdose of CCl₄ can lead to substantial hepatocellular necrosis, particularly in the centrilobular area. This can cause acute liver failure, which may result in rapid death rather than fibrosis. This review aims to outline the optimal experimental parameters for the CCl₄-induced liver fibrosis model. It covers aspects such as the appropriate doses of CCl₄, routes of administration, duration, frequency, and the choice of vehicle needed to establish a pathologically relevant model of liver fibrosis in experimental animals. The review also seeks to investigate therapeutic effects and contribute to the development of new medications.

УДИРТГАЛ

Элэгний фиброз нь элэгний эсийн гаднах матриксд холбогч эд, эластин, ламинин, фибронектин уургуудын нийлэгжилт нэмэгдсэнээр коллагены хуримтлал үүсч элэгний эс гэмтэж сорвижилт өөрчлөлт үүсэхийг хэлнэ. Элэгний одлог эсүүд (Hepatic stellate cells, HSCs) нь энгийн үед идэвхгүй

хэлбэртэй байдаг бөгөөд липотоксик чанар буюу липидийн солилцооны завсрын ба эцсийн бүтээгдэхүүнүүд элэгний эдэд хуримтлагдсанаас одлог эс идэвхтэй байдалд ордог ба үүнийг элэгний фиброз гэнэ. Элэгний эдийн гэмтэл нь нөхөн сэргэх боломжтой архаг хэлбэрийн элэгний гэмтэл гэж үздэг¹. Липотоксикоос үүдэлтэй гэмтлийн улмаас

элэгний эс гэмтэхэд элэгний одлог эсүүд идэвхтэй хэлбэрт шилжиж миофибробласт төст эс болж хувиран коллагеныг ихээр нийлэгжүүлдэг. Өөрөөр хэлбэл ихэнх элэгний архаг өвчний үед коллаген, өөх тос зэрэг эсийн гаднах матрицын уургийн хэт их хуримтлал болж элэгний фибрин холбогч эдээр солигдож элэгний сорвижилт буюу элэгний фиброз үүсгэдэг^{2,3}. Элэгний фиброз нь архаг явцтай үрэвслийн процесс бөгөөд энэ нь дэлхий дахинд хүн амын өвчлөлийн нийт нас баралтын 45%-ийг эзэлдэг⁴. Монгол Улсын хувьд хоол боловсруулах тогтолцооны өвчний дотор элэгний өвчлөл нь 2019 оны байдлаар 11.8%-ийг эзэлж байна. Үүнээс элэгний архаг гепатит 43%, элэгний хатуурал 32.4% гэсэн статистик мэдээлэл байдаг. Элэгний фиброз ба цирроз нь өвчний ОУ-ын 10-р ангилалын ICD10 ба K40 кодтой элэгний өвчлөлд хамаарна⁵. Элэгний фиброзд нөлөөлөх ургамлын гаралтай эм бэлдмэлүүдийг in vivo нөхцөлд судлах нь элэгний өвчлөлийг бууруулах чухал ач холбогдолтой. Тиймээс бид туршилтын амьтдад элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх төрөл бүрийн аргачлалыг судлан тохиромжтой аргачлалыг сонгон туршилт судалгаанд нэвтрүүлэх ажлын хүрээнд элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх туршилтын горимыг тогтоохын тулд энэхүү тойм судалгааг хийлээ. Тухайн элэгний фиброзын эмгэг загвар нь өвчин эхлэх үеийн эс болон молекулын механизмыг тайлбарлахад дөхөм болох бөгөөд элэгний фиброз цаашлаад элэгний цирроз өвчнийг судлахад тохиромжтой юм. Хүний элэгний өвчлөлийн байдал, нас баралт, ёс зүйн хэм хэмжээ нь биопсийн материалыг судалгаанд ашиглахыг ихээхэн хязгаарладаг. Тиймээс сүүлийн жилүүдэд нэмэгдэж буй элэгний архаг өвчнүүд болох элэгний фиброз болон циррозыг судлах арга зүйг амьтан дээр загварчлах нь илүү тохиромжтой юм⁶.

1. Туршилтын амьтанд элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх аргууд

Туршилтын амьтдад элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх хэд хэдэн аргачлал байдаг (Хүснэгт 1). Үүнд:

1. Дархлаа тогтолцооны эмгэгийн гаралтай элэгний фиброз
2. Архины шалтгаант элэгний фиброзын эмгэг загвар
3. Хоол тэжээлийн солилцоогоор үүссэн элэгний фиброз
4. Мэс заслын аргаар элэгний фиброзын эмгэг загвар
5. Химийн бодисоор өдөөгдсөн элэгний фиброзын эмгэг загвар

1.1. Дархлааны тогтолцооны эмгэгийн гаралтай элэгний фиброз:

Энэ ангилалд автоиммуны гаралтай элэгний гепатит (AIH/Autoimmunity hepatitis), вирүсийн гаралтай элэгний эсийн гэмтэл багтана. Автоиммуны гаралтай элэгний фиброзын эмгэг загварыг ихэвчлэн хулганад конканавалин А (ConA) болон бразилийн буурцаг (Brazilian kidney bean)-наас гарган авсан лектинээр үүсгэдэг⁷. Конканавалин А нь элгэнд Т-эсийг идэвхжүүлснээр хүний элэгний В гепатиттай төстэй өвчлөл үүсдэг⁸⁻⁹. Хулганад конканавалин А-г 20 мг/кг тунгаар тарихад хүнийхтэй төстэй I хэлбэрийн автоиммуны гаралтай элэгний гепатитын эмгэг үүсдэг нь тогтоогдсон. Энэхүү аргачлалын тусламжтайгаар туршилт судалгаа хийснээр фиброзын үеийн дархлаа тогтолцооны үр дүнг үнэлдэг¹⁰. Конканавалин А-р өдөөгдсөн элэгний сэртэнт эсүүдийн цочмог гэмтлийн үед TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) ба TGF- β 3 (Transforming Growth Factor- β 3) уургийн хэмжээ эрс идэвхждэг¹¹.

1.2. Архины шалтгаант элэгний

фиброзын эмгэг загвар: Архины шалтгаант элэгний өвчин (АШЭӨ) нь удаан хугацаагаар согтууруулах ундаа хэтрүүлэн хэрэглэснээр үүсдэг элэгний архаг өвчлөл юм. Энэ нь элгэнд өөх тос хуримтлагдсанаас үүдэлтэй элэгний гепатитаар эхэлж элэгний фиброз болон элэгний хатуурлаар хүндэрдэг. Элэгний эс дотор стеролийн зохицуулалтын элемент агуулсан уургийн [SREBP-1c] нийлэгжилтийг нэмэгдүүлж пероксисом пролифератор идэвхжүүлсэн рецептор альфа [PPAR- α]-ийн хэмжээг багасгаж тосны хүчлийн нийлэгжилтийг өдөөн, тосны хүчил β -исэлдэлтийг дарангуйлах замаар архины шалтгаант элэгний фиброз үүсдэг. Туршилтын хулганад 5 гр/кг тунгаар 32%-ийн спиртийг 12 цагийн давтамжтай 3

удаа уулгах нь элэгний эдэд нейтрофил эсийг ихэсгэснээр фиброзын эмгэг загвар үүсдэг¹². Энэхүү аргын гол механизм нь өөхний эдэд этанол хуримтлагдаж липидийн хэт исэлдэлтийг ихэсгэснээс болж макрофаг эс идэвхжиж үрэвслийн медиатор болох TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), IL-6 (Interleukin-6) цитокинуудыг ялгаруулснаас болж адинонектин уургийн нийлэгжил дарангуйлагддаг. Мөн хепатоцит эсэд ацетилальдегид ихээр үүссэнээр липидийн хэт исэлдэлт ихсэж ингэснээр AMPK (AMP-activated protein kinase)-ыг дарангуйлдаг. Согтууруулах ундаа хэтрүүлэн хэрэглэдэг ихэнх хүмүүсийн элэг өөхөлдөг боловч 20-40% нь хүндэрч архины шалтгаант элэгний өвчлөл болдог^{13,14}.

Table 1. Advantages and disadvantages of different methods in hepatic fibrosis models.

Model type	Model	Species	Method	Advantages	Disadvantages	References
Immune damage-induced liver fibrosis model	Concanavalin A	Mouse/Rat	tail vein injection	High success rate, low animal mortality and simple operation	Similar to liver fibrosis caused by chronic virus or autoimmunity in humans	9, 10
	Alcohol	Mouse/Rat	Gavage	Suitable for the study of alcoholic liver disease	Alcohol tolerance in rodents	12,13,14
Alcohol-induced liver fibrosis model	Alcohol combined with chemical poisons	Mouse/Rat/Pig	Gavage	Suitable for the study of alcoholic liver disease, short model cycle	Alcohol tolerance in rodents	12, 15, 16
	Dietary deficiencies	Mouse/Rat	Feeding	Close to human NASH	Long time to develop mild fibrosis	17,18, 19, 20
Diet metabolism-induced liver fibrosis model	Dietary deficiencies combined with chemical poisons	Mouse/Rat	Feeding	Close to human NASH	—	
	Surgical bile duct ligation	Mouse/Rat	Surgery	Fast molding and high repeatability Close to human cholestatic injury	Surgical operation required, high mortality rate	22, 23, 24

Chemical drug-induced liver fibrosis model	Carbon tetrachloride	Mouse/Rat	Intraperitoneal injection/ inhalation	Simplicity of operator, commonly used, high reproducibility	Highly toxic and volatile, different from human liver fibrosis	33, 35
	Thioacetamide	Mouse/Rat/ Monkey	Intraperitoneal injection	Simplicity of operator, commonly used, high reproducibility	Highly toxic	25, 26, 28,29,39
	Dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine	Mouse/Rat/ Zebra fish	Intraperitoneal injection	Simplicity of operator, commonly used, high reproducibility	Highly toxic and volatile	28, 29
	Acetaminophen	Mouse/Rat	Intraperitoneal injection, gavage	Simplicity of operator, similar to the drug liver fibrosis	—	30

Хэдийгээр мэрэгч амьтдын хувьд хүмүүсээс дархлааны тогтолцоо болон архины нөлөө харьцангуй ялгаатай байдаг ч гэсэн хүний архины шалтгаант элэгний хатуурлыг судлахад энэхүү аргачлалыг өргөн хэрэглэдэг^{15,16}.

1.3. Хоол тэжээлийн солилцоогоор үүссэн

элэгний фиброз: Архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлт өвчин (АБШЭӨӨ) нь архины шалтгаант элэгний эмгэгийн гистопатологийн шинжүүдтэй төстэй ч тус бүрийн эмнэл зүйн ямар өөрчлөлтүүд илэрч байгааг ажиглан тогтоосоны дараа ялгаврлан оношлоно. Энэ нь таргалалт, инсулины дөжрөл (IR), чихрийн шижин хэв шинж 2 (T2DM), артерийн гипертензи, атероген дислипидеми (гиперлипидеми) зэрэг эмгэгтэй нягт холбоотой үүсдэг¹⁷. АБШЭӨӨ нь суугаа амьдралын хэв маягийн өөрчлөлтөөс үүдэлтэй үүссэн элэгний архаг гэмтэл юм. Энэ үед элэгний эсэд тосон бөмбөлгүүд хуримтлагдан элэгний эдэд фиброз үүсдэг. Цаашлаад элэгний хатуурал үүсэх эрсдэлтэй байдаг¹⁸. Холин багатай, L-амин хүчил баялаг өөх тос ихтэй хоолны дэглэм архины бус шалтгаант элэгний өөхлөлтийг нэмэгдүүлдэг бөгөөд хүнд хэлбэрийн өөхжилт, элэгний үрэвсэл,

элэгний фиброз үүсгэдэг нь хулгана дээр хийгдсэн судалгаагаар батлагдсан^{19,20}. Туршилтын хархыг биеийн жингийн 25%-д дүйцүүлэн coconut oil-ийн тос болон 1%-ийн холестрол агуулсан тэжээлээр 26 хоногийн турш тэжээхэд цусны ийлдсэнд бага нягтралтай липопротеин, нийт холестрол болон элэгний эдэд холестролын хэмжээ статистик хамааралтай ($p < 0.001$) нэмэгдсэн. Түүнчлэн их нягтралтай липопротеины хэмжээ, триацилглицерол (triacylglycerols)-ийн хэмжээ эрс багассан үр дүнтэй байсан²¹.

1.4. Мэс заслын аргаар үүсгэсэн элэгний фиброзын эмгэг загвар:

Цөсний урсгалыг хаах мэс засал хийснээр цөсөнд агуулагдах холестаза (cholestasis) нь элгэнд эргэн шимэгдэж цөсний сувгийн хананы эс болон элэгний эсийг гэмтээж, элэгний эсийн гаднах матрицд миофибробластыг хуримтлуулж элэгний фиброз үүсгэдэг²². Цөсний урсгалыг боох мэс заслын аргачлал нь туршилтын хулгана болон харханд элэгний фиброз үүсгэх сонгодог загвар бөгөөд мэс засал хийснээс хойш 7-10 хоногийн дараа цөсний сувгийн нарийсал, цөсний сувгийн даралт ихсэх,

цөсний сувгийн дээд урсгал тэлэх, элэгний хэмжээ ихсэх буюу гиперплази ажиглагддаг²³. Туршилтын харханд мэс засал хийгдсэний дараа 27 хоногт цусны биохимийн шинжилгээний үр дүнгээр ALT (Alanine transaminase), TBARS (Thio-barbituric acid reactive substances) болон гидроксипролин (hydroxyproline)-ы хэмжээ эрс нэмэгдсэн байсан. Мөн вестерн-блот (Western blot)-ын шинжилгээгээр элэгний эдэд α -SMA (alpha-smooth muscle actin) уургийн хэмжээ эрс ихэссэнээс гадна PCR-ийн шинжилгээгээр TGF- β 1 болон procollagen I transcript уургийн хэмжээ ихэссэн үзүүлэлттэй байсан²⁴.

1.5. Химийн бодисоор өдөөгдсөн элэгний фиброзын эмгэг загвар:

Туршилтын амьтдад хэд хэдэн төрлийн химийн бодисоор элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэдэг. Жишээ нь: Thioacetamide, Diethylnitrosamine (DMN), Acetaminophen (APAP), 4 хлорт нүүрстөрөгч (CCl_4) гэх мэт. Thioacetamide (CH_3CSNH_2) нь цагаан талст хэлбэрээр оршдог ба туршилтын амьтдад элэгний цочмог дутагдал болон элэгний фиброз үүсгэхэд өргөнөөр ашиглагддаг. Тухайн бодисоор эмгэг загвар үүсгэх нь элэгний фиброз, элэгний хатуурлын үед элгэнд үүсэх холбогч эдийг судлахад нэн тохиромжтой²⁵. Thioacetamide нь өөрөө элэг хордуулах чанаргүй бөгөөд биед орсны дараа идэвхтэй метаболитууд нь ковалент холбоогоор уураг болон липидтэй холбогдон хэт исэлдэлтийн хордлогыг элгэнд үүсгэдэг. Ялангуяа элэгний төвийн дэлбээ (Central lobule)-ний үхжил үүсгэдэг. CCl_4 -тэй харьцуулахад энэхүү бодис нь элэгний эдийн захын үрэвслийн нэвчилтийг нэмэгдүүлэн сувгийн гиперплази илүү тод үүсгэдэг. Туршилтын хулганад тиаоцитаминыг 150

мг/кг тунгаар 7 хоногт 3 удаа, нийт 11 долоо хоног хэвлийн хөндийд тарихад элэгний архаг үрэвсэл, элэгний фиброз үүсдэг²⁶. Энэ үед фибриногены шалтгаант цитокинуудын хэт идэвхжил явагдаж эд болон цусны ийлдсэнд transforming growth factor-b (TGF-b), platelet derived growth factor (PDGF) and connective tissue growth factor (CTGF)-уудын хэмжээ эрс ихэсдэг²⁷. Thioacetamide -р үүсгэсэн эмгэг загвар нь эмийн эмчилгээний шинжилгээнд бодит үнэлэмжийг олгодоогоороо бусад химийн бодисоор элэгний фиброз үүсгэх аргачлалуудаас давуу талтай. Гэвч thioacetamide-р үүсгэсэн элэгний фиброз нь ихэвчлэн циррозын шат руу маш хурдтай шилждэг. Энэ нь фиброзын механизыг тайлбарлахад хүндрэлтэй байдаг. Diethylnitrosamine-ны нитрозаминуудын хоруу чанар маш сайн судлагдсан бөгөөд нитрозаминуудыг туршилтын амьтны хэвлийн хөндийд тарих буюу уулгах үед хүнд хэлбэрийн элэгний гэмтэл үүсгэдэг. Энэхүү бодис нь элэгний эдэд нейтрофил эсүүдийн нэвчрэл үүсгэж аажмаар элэгний төвийн дэлбэнгийн цус алдалт, цөсний сувгийн гиперплази, фиброз, үхжил үүсгэдэг²⁸. Мөн элэгний эдэд коллагены фибральдегидийн агууламжийг эрс нэмэгдүүлдэг.

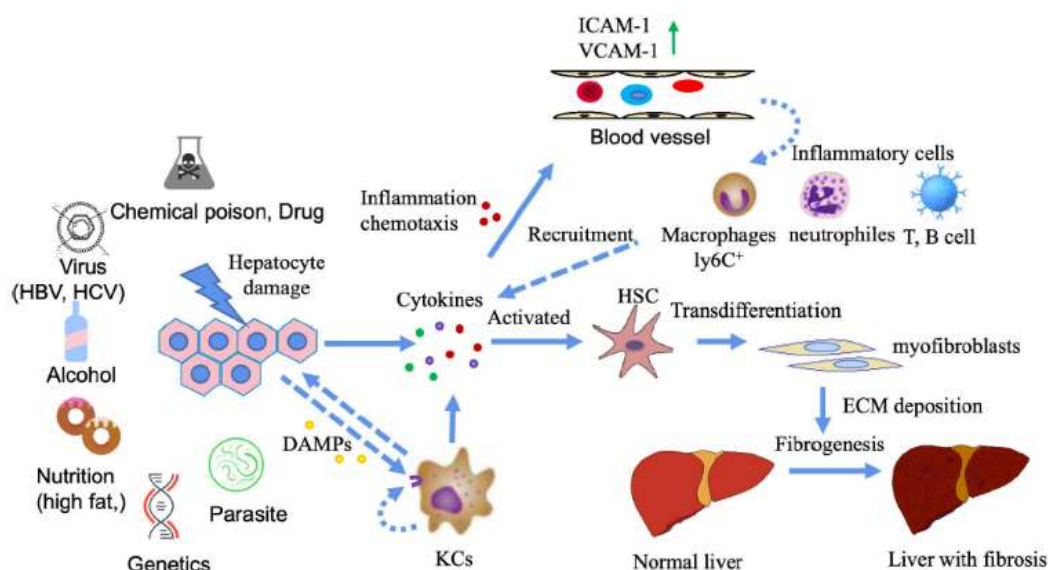


Figure 1. The mechanism of liver fibrosis. Liver damage can be caused by a variety of factors (e.g., chemical poisons, viruses, alcohol, nutrition, genetics, parasites, etc.)

CCl_4 -р үүсгэсэн элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх аргачлалтай харьцуулахад диэтилнитрозамин нь ийлдсэн дэх элэгний ферментүүдийн түвшин бага байдгаараа учир дутагдалтай²⁹. Acetaminophen (APAP) эмийг хэтрүүлэн хэрэглэх нь митохондрийн хэт исэлдэлтийн шалтгаант элэгний цочмог дутагдал үүсэх үндсэн шалтгаан болдог³⁰. APAP бодисын үндсэн метаболит болох N-acetylphenylquinone imine (NAPQI) нь гепатотоксик бөгөөд элэгний одлог эс (LX2 cell)-ийн мРНХ-ийн αSMA , collagen type I (COL1A1), collagen type I (COL3A1) ба TGF- β -г эрс нэмэгдүүлдэг. Энэ нь элэгэнд фиброз үүсэх үндсэн шалтгаан болно³¹.

Химийн бодисоор элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх аргачлалуудыг тоймлон судалсны дараа бид 4 хлорт нүүрсстөрөгчөөр элэгний фиброз үүсгэх аргачлалыг сонгон дараах хэсэгт дэлгэрүүлэн тайлбарлалаа. CCl_4 -р өдөөгдсөн элэгний фиброзын эмгэг загвар нь зардал бага, эмгэг загвар үүсгэхэд харьцангуй хялбар, элэгний фиброзын механизмыг тайлбарлах, судалгааны үр дүнг үнэлэхэд тохиромжтой, энгийн аргачлал юм. Цаашилбал

энэ нь элэгний фиброз үүсгэх сонгодог арга бөгөөд хамгийн өргөн хэрэглэгддэг арга юм. Мөн энэхүү аргачлалыг ашиглах нь туршилтын харханд үүсгэсэн элэгний фиброзын үед дархлаа тогтолцоо болон үрэвслийн үеийн эмнэл зүйг хянах, түүнийг тайлбарлахад чухал ач холбогдолтой юм³².

2. 4 хлорт нүүрсстөрөгч (Carbon tetrachloride/ CCl_4)-өөр элэгний фиброз үүсгэх

CCl_4 нь элэгний эндотелийн эсүүд ба элэгний хаалган венийн бүс дэх элэгний паренхимийн эсүүдэд, лизосом болон митохондрийн мембран хооронд нэвчиж элэгний эсийг шууд гэмтээдэг³³. Мөн тус бодис нь өндөр идэвхтэй чөлөөт радикалын метаболит болох CYP2E1 үүсгэснээр элэгний төвийн дэлбэнд хүнд хэлбэрийн үхжил үүсдэг³⁴. CCl_4 -ийн гэмтлийн үндсэн механизм нь липидийн хэт исэлдэлтийн улмаас үүссэн исэлдэлтийн гэмтэл юм. Цитохром P450 фермент, ялангуяа CYP2E1 нь CCl_4 -ийг трихлорметилийн радикал, трихлорметилийн хэт исэл болгож хувиргадаг. Энэхүү эмгэг загварыг элэгний фиброз болон

элэгний хатууралын эмгэг жамыг судлахад өргөн хэрэглэдэг³⁵. CCl_4 -р элэгний фиброз үүсгэх загвар тус төрлийн судалгаанууд дундаа давтагдах тоогоор олон бөгөөд CCl_4 тостой холих харьцаа, тун, олгох замууд өөр өөр байдаг. CCl_4 -ийг (CCl_4 +Olive Oil/50:50) ихэвчлэн 7 хоногт 2-3 удаа 4-6 долоо хоногийн турш хэвлийн хөндийд тарихад элэгний фиброз үүсдэг³⁶. CCl_4 -ийг 8 долоо хоног болон түүнээс дээш хугацаагаар тарихад элэгний томрол, хэлтэрийн гипертензийн эмнэл зүйн шинж тэмдэг илэрдэг. 4 хлорт нүүрстөрөгч нь элэгний паренхимийг гэмтээснээр цусны ийлдсэн дэх AST (aspartate aminotransferase), ALT-ийн түвшинг нэмэгдүүлж элэгний эдэд хэт исэлдэлтийн хортой нэгдэл болох нитратыг үүсгэж элэгний эдэд үрэвслийн цитокинуудыг идэвхжүүлдэг³⁷. Туршилтын хулганад хийсэн судалгаануудаас үзэхэд CCl_4 -р өдөөгдсөн элэгний өвөрмөц бус үрэвсэл нь CD4^+ T, CD8^+ T, B эсийн пролиферацийг идэвхжүүлж, үрэвслийн цитокинуудын ялгарлыг нэмэгдүүлж, аутоиммун хариу урвал, гепатит үүсгэдэг нь тогтоогдсон байна³². Энэхүү аргачлалыг элэгний фиброзын эмгэг жам, элэгний эдийн нөхөн сэргэх механизмыг тайлбарлахад ихэвчлэн ашигладаг. Гэвч энэ загвар нь инсулины эсэргүүцэл (IR) үүсэх боломжгүй, туршилтын амьтад таргалах зэрэг сул талтай байдаг. CCl_4 -ийг тарьсны дараа элэгний эдэд холбогч эд мэдэгдэхүйц нэмэгдсэнээр цитоглобин (Cytoglobin) -ны тоо ихэсдэг бөгөөд элэгний фиброзын эхэн үеийг цитоглобины маркераар илэрхийлж болно³⁸. CCl_4 -ийг 15 долоо хоногийн турш туршилтын хулганад тарьсны дараа элгэнд олон тооны хорт хавдарын эс (Hepatocellular carcinoma) илэрсэн байдаг. CCl_4 тарьсаны дараа элэгний одлог эсүүд (Hepatic stellate cells, HSCs)-ийн гол маркер болох десмин (desmin) буюу глиал фибрилляр уураг (glial fibrillary acidic protein)-

ийн түвшин мэдэгдэхүйц ихсэж CD133 цитокин нь хэт мэдрэг болсон байдаг³⁹.

2.1. Туршилтын тохиромжтой горим:

Хэвлэлийн тойм судалгаанаас харахад CCl_4 -ийг 50:50 харьцаатай оливийн тосонд найруулан туршилтын хархны хэвлийн хөндийд 7 хоногт 2 удаа нийт 4-6 долоо хоногийн турш 1 мл/кг-2 мл/кг тунгаар тарих аргачлал нь хамгийн тохиромжтой хэмээн үзэж байна.

2.2. Туршилтын амьтан: $25 \pm 2^\circ\text{C}$

температуртай, 50-60%-ийн чийгшил бүхий тусгай хоол тэжээлийн горимтой IVC (Individually ventilated cage) төхөөрөмжинд (12 h night/12 h day) өсгөж үржүүлсэн 220 ± 5 гр жинтэй Wistar шугамын бус хархыг ашиглана.

2.3. Туршилтын явц: Судалгааны бүлгүүдэд

тус бүр 6 амьтан байхаар тооцож, судалгааны бүлгүүдийг эрүүл болон эмгэг бүлэг, эмчилгээний бүлэг, харьцуулах бүлэг гэж ангилна. Туршилтын хархнуудад CCl_4 -ийг 1-2 мл/кг тунгаар 7 хоногт 2 удаа нийт 4-6 долоо хоног тарьж элэгний фиброзын эмгэг загвар үүсгэх ба 4-6 долоо хоногийн дараа туршилтын хархнуудаас цусны дээж авч 2500 эрг/мин-р 10 минут хурилдуулан ийлдсийг ялгаж биохимийн шинжилгээнд бэлтгэнэ. Дараа нь туршилтын хархнуудыг 10 мг/кг зайлазин (xylazine)+100 мг/кг кетамин (ketamine) тунгаар унтуулан эвтинацийг гүйцэтгэж элэгний эдийг тусгаарлан гистологийн шинжилгээнд бэлтгэнэ.

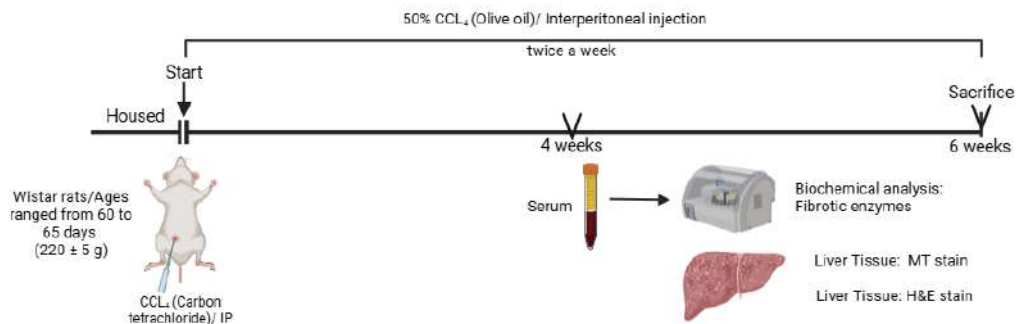


Figure 2. Experimental design of flowchart

Table 2. Induction method, modeling time, dosage and liver fibrosis in rat models of liver fibrosis.

Specs	Dosage	Dilution	Administration	Duration	Reference
Current condition at Pharmacology Lab					
Rat	5ml/kg	40% olive oil	2 in a week, IP injection	8 weeks (high mortality)	36
Paper reviewed conditions					
Rat	2 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, orally	4-week hepatic fibrosis 8-week cirrhosis	40
Rat	1 ml/kg	50:50 olive oil	2 times per week, orally	8 weeks (liver fibrosis)	41
Rat	1 mg/kg body	olive oil (1:3 ratio)	2 times per week, orally		42
Rat	0.2ml/100g	50:50 olive oil	1 in week, IP injection	4-week hepatic fibrosis 8-week cirrhosis 12-week advanced micronodular cirrhosis	43
Rat	2 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, IP injection	8 week (severe fibrosis (cirrhosis))	44
Rat	1 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, IP injection	8 week (severe fibrosis (cirrhosis))	45
Rat	1 ml/100 g	50:50 olive oil	twice per week, IP injection	9 weeks (5 of 18 animals died)	42
Rat	1 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, Subcutaneous injection	4 weeks (hepatic fibrosis)	46
Rat	2 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, Subcutaneous injection	8 week (severe fibrosis (cirrhosis))	47
Optimal conditions					
Rat	1 ml/kg and 2 ml/kg	50:50 olive oil	2 times weekly, IP injection	4 and 6 weeks	33,34,35,36

2.4.Шинжилгээний үзүүлэлтүүд (Assessment or evaluation) Биохимийн шинжилгээ: Элэгний фиброзд нөлөөлөх

үйлдлийг үнэлэхийн тулд биохимийн шинжилгээгээр AST, ALT, ALP, TP, albumin ба нийт билирубины хэмжээг

үйлдвэрлэгчийн оношлуур, урвалжийн аргачлалын дагуу тодорхойлно. Мөн түүнчлэн ялгаварлан оношлох чиглэлээр ийлдсэнд GGT, LDH ферментүүдийг тодорхойлж болно. AST болон ALT ферментүүд нь элэгний фиброзын үед элэгний эсүүдийн гэмтэл, элэгний эдийн үйл ажиллагааны хямралыг илтгэдэг. Энэхүү 2 ферментийн харьцаа (AST/ALT) нь >1 бол элэгний фиброз, элэгний хатуурлын таамаглал байдаг. AST/ALT нь ≤1 бол архаг гепатит гэж оношлодог бол >2 бол архины хамааралт элэгний өвчлөл хэмээн үздэг. ALP нь цайрын

металлопротеиназын фермент бөгөөд шүлтлэг рН үедээ фосфатын эфирийн гидролизыг хурдасгаснаар элэгний өвчлөлийн үед гепатоцитууд нь элэгний эсийн сувгийн мембранаас ALP-ийн нийлэгжилтийг өдөөдөг⁴⁰. Элэгний эдийн паранхимийн 50%-с дээш хувь гэмтсэн үед цусны ийлдсэнд албумин ихэсдэг. Бөөрний өвчний үед албумин багасдаг тул бөөрний өвчлөлөөс ялгаварлан оношлоход элэгний фиброзын үед альбуминыг тодорхойлдог⁴¹. Мөн биохимийн шинжилгээний багцаар нь элэгний фиброзыг үнэлдэг.

Table 3. Area under receiver's operating curve for indirect marker panel in various etiology of liver fibrosis⁴²

Marker	Liver disease evaluated by biochemical marker				AUROC for
	CHC	CHB	NAFLD	ALD	
AST/ALT ratio	0.54–0.71	NA	0.74–0.83	NA	0.54–0.83
APRI	0.65–0.87	0.67–0.72	0.56–0.86	–	0.56–0.87
FibroTest	0.72–0.87	0.76–0.85	0.82–0.89	0.83–0.91	0.72–0.87
Fibro index	0.8–0.83	NA	–	–	0.82
Frons index	0.78–0.86	NA	–	–	0.78–0.86

ALD: Alcoholic liver disease; ALT: Alanine aminotransferase; APRI: AST to platelet ratio index; AST: Aspartate aminotransferase; AUROC: Area under receiver's operating curve; CHB: Chronic hepatitis B; CHC: Chronic hepatitis C; NA: AUROC is not available; NAFLD: Nonalcoholic fatty liver disease.

Хэт исэлдэлтийн маркер: Элэгний эсийн гэмтлийн үед элгэнд хэт исэлдэлтийн үлдэгдэл бодисууд хуримтлагдана. Тиймээс элэгний эдэд superoxide dismutase, элэгний катализийн идэвх (CAT), glutathione peroxidase (Gpx), malondialdehyde (MDA) маркеруудыг тодорхойлно.

Үрэвслийн маркер: Элэгний фиброзын үед элгэнд үрэвслийн голомт үүсдэг тул үрэвслийн маркерууд болох TNF-α, IL-6, IL-4, IL-10 цитокинуудыг тодорхойлно. Мөн элэгний эсийн апоптозын маркерууд болох hepatic caspase 9, caspase 3-ийг тодорхойлно.

Гистопатологийн шинжилгээ: HE stain (Hematoxyline and Eosin) болон MT stain

(Manson's trichrome)-ны будалтыг гүйцэтгэнэ. Гистологийн шинжилгээгээр элэгний эд дэх холбогч эдийн ургалт, хучуур эдийн гэмтэл, элэгний төвийн венийн эргэн тойронд буй үрэвслийн эсийн нэвчрэлт тодорхойлогдоно.

ДҮГНЭЛТ

In vivo нөхцөлд элэгний гэмтэл, ялангуяа элэгний фиброзын өвчний үед элэгний эдийн нөхөн төлжилтийн механизмыг оновчтой тайлбарлах болон туршилтын зардал багатай, судалгааны үр дүн сайтай байдгаараа CCl₄-өөр үүсгэсэн элэгний фиброзын эмгэг загвар нь бусад аргачлалуудаас давуу талтай. Элэгний фиброзын эмгэг загварыг үүсгэхдээ CCL₄

(50:50, Olive oil)-ыг 1-2 мл/кг тунгаар 7 хоногт 2 удаагийн давтамжтайгаар нийт 4-6 долоо хоног тарих нь илүү тохиромжтой. 6 долоо хоногоос дээш тарьсан тохиолдолд элэгний хатуурал үүсгэх эрсдэлтэй. Туршилтын үр дүнг үнэлэхдээ үрэвсэл (TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10)-ийн болон апоптозын маркерууд (Cas 3, Cas 9), хэт исэлдэлтийн маркерууд (CAT, Gpx, MDA) тодорхойлох, эдэд HE stain, MT stain гүйцэтгэх зайлшгүй шаардлагатай байдаг.

НОМ ЗҮЙ

1. Bataller R., Brenner DA et al. Liver fibrosis. The Journal of clinical investigation 115(2), 2005.p.209-218.
2. Mao, Y. et al. Ghrelin attenuates liver fibrosis through regulation of TGF-beta1 expression and autophagy. Int. J. Mol. Sci. 16, 2015.p.21911–21930.
3. Mannaerts, I. et al. Gene expression profiling of early hepatic stellate cell activation reveals a role for Igfbp3 in cell migration. PloS, 2013.e84071.
4. Thomsen AW et al. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol (4). 2004. 583–594.
5. Элэгний цирроз, түүний хүндрэлийн оношлогоо, эмчилгээний эмнэл зүйн заавар, Эрүүл мэндийн яам. 2021.х.2
6. Yu-long Bao., Li Wang et al. Animal and organoid models of liver fibrosis. Frontiers in physiology. Vol 12. 2021.p.1-13.
7. Soares, P. A. G., Nascimento, C. O., et al. Purification of a lectin from Canavalia ensiformis using PEG-citrate aqueous two-phase system. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 879, 2011.p.457–460.
8. Heymann, F., Hamesch, K., et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. Lab. Anim. 49, 2015.p.12–20.
9. Wang, H.-X., Liu, M., et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. World J. Gastroenterol. 18, 2012.p.119–125.
10. Ye, T., Wang, T., Yang, X., et al. Comparison of Concanavalin a-Induced Murine Autoimmune Hepatitis Models. Cell Physiology. Biochem. 46, 2018.p.1241–1251.
11. Wang, L., Tu, L., Zhang, J., et al. Stellate Cell Activation and Imbalanced Expression of TGF-1/TGF-3 in Acute Autoimmune Liver Lesions Induced by ConA in Mice. Biomed. Res. Int. 2017.p.2540540.
12. Guo F, Zheng K, Benedi-Ubieto R., et al. The Lieber-DeCarli Diet-A Flagship Model for Experimental Alcoholic Liver Disease. Alcohol Clin Exp Res (42), 2018.p.1828–1840.
13. Tsukumoto H., Lu S.C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. FASEB J. 15.2001.p.1335-1349.
14. Seitz H K., Bataller R et al. Alcoholic liver disease. Nat.Rev.Dis.Primers 4:16. 2018.p.16.
15. Mathews S., Xu M., Wang, H., et al. Animals models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of alcohol-induced liver disease: pathophysiology, translational relevance, and challenges. Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. 306, 2014.G819–G823.
16. Lamas-Paz A., Hao F., Nelson L. J., Vázquez M. T., et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. World J. Gastroenterol. 24, 2018.p.5063–5075.
17. Cobbin, E., and Akhlaghi, F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)- pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. Drug Metab. Rev. 49, 2017.p.197–211.
18. Stel P. Liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease – diagnostic challenge with prognostic significance. World J. Gastroenterol. 21, 2015.p.11077–11087.
19. Honda, T., Ishigami, M., Luo, F., et al. Branched-chain amino acids alleviate hepatic steatosis and liver injury in choline-deficient high-fat diet induced NASH mice. Metabolism 69, 2017.p.177–187.
20. Matsumoto M., Hada N., Sakamaki, Y., et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. Int. J. Exp. Pathol. 94:2013.p.12008.
21. Angeles Zulet., Ana Barber., Henri Garcin et al. Alterations in carbohydrate and lipid metabolism induced by diet rich coconut oil and cholesterol in rat model. Journal of the american college of nutrition. Vol 18,

- 2013.p.36-42.
22. Li, T., and Apte, U. Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer. *Adv. Pharmacol.* 74, 2015.p.263–302.
23. Rodriguez-Garay, E. A., Agüero, R. M., et al. Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Res. Exp. Med.* 196, 1996.p.105–116.
24. Tzung-Yan Lee., Hen-Hong Chang., Jenn-Han Chen et al. Herb medicine Yin-Chen-Hao-Tang ameliorates hepatic fibrosis in bile duct ligation rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol 109, Issue 2.2017.p.318-324.
25. Müller, A., Machnik, F., Zimmermann, T., and Schubert, H. Thioacetamide-induced cirrhosis-like liver lesions in rats—usefulness and reliability of this animal model. *Exp. Pathol.* 34, 1988.p.229–236.
26. Wallace, M. C., Hamesch, K., et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Lab. Anim.* 49(1 Suppl.), 2015.p.21–29.
27. Park, H.-J., Kim, H.-G., et al. Comparison of TGF- β , PDGF, and CTGF in hepatic fibrosis models using DMN, CCl₄, and TAA. *Drug Chem. Toxicol.* 39, 2016.p.111–118.
28. Tolba R., Kraus T., Liedtke C., Schwarz M., and Weiskirchen R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Lab. Anim.* 49(1 Suppl.), 2015.p.59–69.
29. Wang, K., Liu, L., Dai, W., et al. Establishment of a hepatic fibrosis model induced by diethylnitrosamine in zebrafish. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 34, 2014.p.777–782.
30. Yoon, E., Babar, A., Choudhary, M., Kutner, M., and Prysopoulos, N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 4, 2016.p.131–142.
31. Bai, Q., Yan, H., et al. Long-term acetaminophen treatment induced liver fibrosis in mice and the involvement of Egr-1. *Toxicology* 382, 2017.p.47–58.
32. Chi G., Pei JH., Ma QY., Ru YX., Feng ZH. Chemical induced inflammation of the liver breaks tolerance and results in autoimmune hepatitis in Balb/c mice. *Immunol Lett.* 218:2020.p.44–50.
33. Weber, L. W. D., Boll, M., and Stampfl, A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Rev. Toxicol.* 33, 2003.p.105–136.
34. Zangar, R. C., Benson, J. M., et al. Cytochrome P450 2E1 is the primary enzyme responsible for low-dose carbon tetrachloride metabolism in human liver microsomes. *Chem. Biol. Interact.* 125, 2000.p.233–243.
35. Unsal, V., Cicek, M., and Sabancilar, I. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants. *Rev. Environ. Health* 2020.p.48.
36. Bubnov RV., Drahulian MV., et al. High regenerative capacity of the liver and irreversible injury of male reproductive system in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis rat model. *EPMA J.* 9:2018.p.59–75.
37. Kurdi A., Hassan K., Venkataraman B., Rajesh M. Nootkatone confers hepatoprotective and anti-fibrotic actions in a murine model of liver fibrosis by suppressing oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol.* 32:2018.e22017.
38. Man K.-N. M., Philipsen S., and Tan-Un K. C. Localization and expression pattern of cytoglobin in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. *Toxicol. Lett.* 183, 2008.p.36–44.
39. Fontana L., Moreira, E., Torres, M. I., Fernández, M. I., Rhos, A., Sánchez de Medina, F., et al. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology* 106, 1996, p.197–206.
40. Shanshan W., Fei Ye et al. The anti-liver fibrosis effect of Tibetan medicine (Qiwei Tiexie capsule) is related to the inhibition of NLRP3 inflammasome activation *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 319, Part 2, 2024.p.
41. Rong Wan., Jing Wan et al. Tanshinol ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in rats through the regulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B/I κ B α signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, Vol12, 2018. p.1281-1292.

42. Peiying Wei., Qiuhui Hu.,Chengbin He et al. Gadolinium deposition in the liver and brain in a rat model with liver fibrosis after intravenous administration of gadoxetate disodium. Volume 10, Issue 6, 2024. e27419.
43. Christothea Constandinou., Neil Henderson et al. Modeling Liver Fibrosis in Rodents. Fibrosis Research, 2005. p 237–250.
44. Hong Sun., Qing-Ming Che et al. Antifibrotic effects of chronic baicalein administration in a CCl4 liver fibrosis model in rats. European Journal of Pharmacology, Volume 631, Issues 1–3, 2010.p.53-60.
45. Elisabet Sanchez.,Ruben Frances et al. Modulation of Inflammatory Response in a Cirrhotic Rat Model with Induced Bacterial Peritonitis. PLoS ONE 8(3): 2013. e59692.
46. Gaila A Yacout.,Nihal M Elguindy.,Eman F El Azab. Hepatoprotective effect of basil (Ocimum basilicum L.) on CCl4-induced liver fibrosis in rats. Journal / African Journal of Biotechnology / Vol. 11 No. 90, 2012.p.15702-15711.
47. Jian-ping Li., Yan Gao., Shi-feng Chu et al. Nrf2 pathway activation contributes to anti-fibrosis effects of ginsenoside Rg1 in a rat model of alcohol- and CCl4-induced hepatic fibrosis. Acta Pharmacologica Sinica, Vol 35, 2014. p.1031–1044.
48. Giannini E, Risso D, Botta F et al. Validity and clinical utility of the aspartate aminotransferase- alanine aminotransferase ratio in assessing disease severity and prognosis in patients with hepatitis C related chronic liver disease. Arch. Intern. Med. 163,2003.p.218–224.117283.
49. Paul YK, Stanley MC, Joseph KL. ACG Practice Guideline: evaluation of abnormal liver chemistries. Am. J. Gastroenterol. 112(1), 2016.p.18–35.
50. Hind IF. Noninvasive biomarkers of liver fibrosis: an overview. Adv. Hepatol. 2014, p.357287.