УКРАЇНА

(19) UA (11) 140188 (13) U

(51) МПК
G09B 23/28 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2019 07465**

(22) Дата подання заявки: **04.07.2019**

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.02.2020**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.02.2020, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):
Кіреєв Ігор Володимирович (UA),
Кошовий Олег Миколайович (UA),
Верховодова Юлія Володимирівна (UA),
Мига Михайло Мирославович (UA),
Потапов Сергій Миколайович (UA),
Осолодченко Тетяна Павлівна (UA)

(73) Власник(и):
Верховодова Юлія Володимирівна,
пр-кт Тракторобудівників, 102, кв. 107, м. Харків, 61118 (UA)

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ КОЛІТУ З ДИСБІОТИЧНИМИ ПОРУШЕННЯМИ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями у щурів включає в себе імуносупресію. Імуносупресію викликають шляхом внутрішньом'язового введення циклофосфаміду у дозі 0,6 мг/кг упродовж 7 днів при мікробному навантаженні per os (Staphylococcus aureus, Candida albicans, Clostridium perfringens) упродовж 3 днів.

UA 140188 U

Корисна модель належить до медицини та патологічної фізіології, а саме до способів моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями тонкого і товстого кишечника у лабораторних тварин, і може бути використаний при дослідженнях патологій кишечника та вивченні ефективності лікування колітів при апробації нових лікарських препаратів.

Антибіотикотерапія докорінно змінила лікування бактеріальних інфекцій та врятувала значну кількість людських життів. Проте останні роки характеризуються зростанням питомої ваги небажаних ефектів антибіотикотерапії, а саме антибіотикоасоційованої діареї (ААД), дисбіозів та інші ураження кишечника. Основним потенційно загрозливим ефектом антибактеріальної терапії є ААД викликана бактеріальною інфекцією. Оскільки антибіотики порушують якісний та кількісний склад мікрофлори кишечника, що може призводити до розмноження у ньому Clostridium difficile та розвитку діареї. Наразі інфекція, що викликається токсигенними штамами Clostridium difficile, є визнаною причиною ААД у 10-30 % дітей на високому доказовому рівні в усьому світі [1]. Також, ААД етіологічно може бути пов'язана з впливом й інших мікроорганізмів: Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella oxytoca, Staphylococcus aureus, а також грибів роду Candida тощо. Дисбіотичні зміни травного каналу поглиблюють коліт, впливають на тяжкість і тривалість хвороби, негативно впливають на стан неспецифічної резистентності організму.

Тому, є нагальна потреба у розробці достовірної та легковідтворюваної моделі коліту з дисбіотичними порушеннями, яка дозволить вивчити характер змін, склад і властивості кишкової мікрофлори, а також обґрунтувати раціональні підходи до лікування та корекції.

Відомі способи моделювання дисбіозу кишечника [2] у лабораторних тварин шляхом впливу антибактеріальних препаратів на кишкову мікрофлору з подальшим визначенням кількості життєздатних мікроорганізмів на початку та наприкінці досліду. До недоліків способу можна віднести те, що модель не передбачає розвиток коліту; мікробне навантаження умовно патогенною та анаеробною мікрофлорою.

Відомий спосіб моделювання виразкового коліту [3] у лабораторних тварин шляхом ректального введення 0,1 мл 6 % розчину йодацетаміду в 1 % розчині метилцелюлози. Аутопсію проводили через дві та шість годин після введення. Недоліком способу є грубий хімічний вплив на слизову кишечника, що патогенетично не відтворює процес розвитку ендогенного запального процесу у відповідь на інфекцію в цілому. Крім того, модель не передбачає мікробне навантаження умовно патогенною та анаеробною мікрофлорою.

Відомий спосіб моделювання виразкового коліту [4], що передбачає двократне ректальне введення 1 мл 4,0 % розчину оцтової кислоти з інтервалом один тиждень. Формування виразкового коліту спостерігають вже на третю добу від початку експерименту. Недоліком способу є недостатній рівень інформативності та відтворюваності, що випливає перш за все з недостатнього рівня селективного ураження товстої кишки оцтовою кислотою. Крім того, модель не передбачає мікробне навантаження умовно патогенною та анаеробною мікрофлорою.

Завдання корисної моделі полягає у створенні нової моделі коліту з дисбіотичними порушеннями тонкого і товстого кишечника, який відтворює дисбіотичні порушення кишечника та запалення стінки кишечника з її ушкодженням на фоні пригнічення імунної відповіді та екзогенного (per os) мікробного навантаження умовно патогенною та анаеробною флорою.

Поставлене завдання вирішується таким чином, що у способі моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями у щурів, який включає в себе імуносупресію, корисною моделлю передбачено, що імуносупресію викликають шляхом внутрішньом'язового введення циклофосфаміду у дозі 0,6 мг/кг упродовж 7 днів при мікробному навантаженні per os Staphylococcus aureus, Candida albicans, Clostridium perfringens упродовж 3 днів.

Використання циклофосфаміду у заданій дозі дозволяє змоделювати зниження реактивності організму та створити умови схильності до розвитку інфекції.

Запропонований спосіб дозволяє контрольовано відтворювати клостридіальний коліт і його ознаки, а саме, зниження захисних сил організму та інфікування умовно патогенною та патогенною мікрофлорою з подальшим розвитком запалення кишечника та дисбіотичних порушень.

Причинно-наслідковий зв'язок між суттєвими ознаками корисної моделі і технічним результатом полягає у тому, що при запропонованому способі моделюванні коліту визначається наявність дисбіотичних порушень мікробіоти кишечника та виникає його запалення. Ці процеси можна моніторувати за допомогою посіву зразків кала на поживні середовища з подальшою мікроскопією. Також рекомендоване приготування і мікроскопія гістологічних зразків кишечників для моніторинга запального процесу.

Всі параметри заявленого способу визначені експериментальним шляхом, їх сукупність є новою, не відомою з джерел інформації.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1. Експеримент проводили у відповідності з принципами біоетики, норм та положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та наукових цілей" (Страсбург, 1986), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" ухвалених Першим національним конгресом біоетики (Київ, 2001).

Попередньо помічених нелінійних білих щурів обох статей ділили на дві групи по 7 тварин кожна: контрольну та досліджувану. Контрольна група представлена інтактними тваринами. Досліджувані тварини знаходилися у вільному доступі до води та їжі. З метою створення експериментального дисбіозу тваринам проводили імуносупресію шляхом внутрішньом'язового введення циклофосфаміду у добовій дозі 0,6 мг/кг 7 днів. Екзогенне мікробне навантаження здійснювали введенням у шлунок кожної тварини досліджуваної групи, з використанням спеціальної зігнутої металевої канюлі, 1 мл суспензії яка складалась з Staphylococcus aureus (S. aureus) (10^9 клітин/мл), Candida albicans (C. albicans) (10^{10} клітин/мл), Clostridium perfringens (C. perfringens) (10^8 клітин/мл) упродовж 3 днів.

Наступні 5 днів розраховані на експозицію мікроорганізмів in vivo або для проведення лікування гіпотетичною досліджуваною субстанцією.

На 15 день усіх щурів виводили з експерименту. Евтаназію тварин здійснювали у стані наркозу ефіром шляхом дислокації шийних хребців. Для вивчення порожнинної мікрофлори збирали кал та висіювали на поживні середовища.

Для мікробіологічного дослідження кал збирали на 11 та 15 добу.

Матеріалом для морфологічного дослідження послужили фрагменти тонкого і товстого кишечника, вирізані відразу ж після виведення тварин з експерименту.

Приклад 2. Для мікробіологічного дослідження зразки випорожнень збирали на 11 та 15 добу. Зразки змішували з 0,9 % розчином натрію хлориду та стерильною петлею висівали на тверді поживні середовища за методом Голда.

Чашки Петрі з посівами ставили в термостат. Через 24 години проводили оцінку для C albicans.

Для інших збудників (окрім C albicans та C. perfringens) оцінку чашок Петрі проводили після 72 години інкубації у термостаті. Оцінювали морфологічні та культуральні властивості колоній. Готували мазки та забарвлювали за методом Грама. У світловому мікроскопі оцінювали морфологічні властивості мікроорганізмів. Результати, отримані за допомогою цього методу, дозволяли охарактеризувати кількісний та якісний склад досліджуваного зразка.

Ідентифікацію C. perfringens проводили шляхом використання середовища Вільсон-Блер. Через 48 годин після знаходження зразків у термостаті при наявності колоній темного кольору результат вважали позитивним.

Результати дослідження наведені у таблицях 1-4.

Таблиця 1

Результати мікробіологічного дослідження зразків випорожнень на 11 добу у експериментальній групі з мікробним навантаженням

Зразок №		Загальна кількість кишкових паличок, КУО	S. aureus	Біфідо-бактерії, КУО	Лактобак-терії, КУО	Кандида, КУО	Клостридії
	Нормальні показники	10^4-10^7	10^3-10^5	10^6-10^9	10^6-10^8	0-10^3	-
1		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
2		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
3		2×10^8	1×10^7	1×10^5	$<1\times10^4$	10^4	+
4		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^5	+
5		2×10^8	1×10^7	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
6		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
7		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+

Таблиця 2

Результати мікробіологічного дослідження зразків випорожнень на 15 добу
у експериментальній групі з мікробним навантаженням

Зразок №		Загальна кількість кишкових паличок, КУО	S. aureus	Біфідо-бактерії, КУО	Лактобак-терії, КУО	Кандида, КУО	Клостридії
	Нормальні показники	10^4-10^7	10^3-10^5	10^6-10^9	10^6-10^8	0-10^3	-
1		2×10^8	1×10^5	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
2		2×10^8	1×10^7	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
3		2×10^8	1×10^8	1×10^4	$<1\times10^5$	10^4	+
4		2×10^8	1×10^7	1×10^5	$<1\times10^5$	10^5	+
5		2×10^8	1×10^7	1×10^3	$<1\times10^5$	10^4	+
6		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+
7		2×10^8	1×10^6	1×10^5	$<1\times10^5$	10^4	+

Таблиця 3

Результати мікробіологічного дослідження зразків випорожнень на 11 добу
у групі інтактних тварин

Зразок №		Загальна кількість кишкових паличок, КУО	S. aureus	Біфідо-бактерії, КУО	Лактобак-терії, КУО	Кандида, КУО	Клостридії
	Нормальні показники	10^4-10^7	10^3-10^5	10^6-10^9	10^6-10^8	0-10^3	-
1		1×10^6	1×10^4	1×10^7	1×10^7	1×10^2	-
2		1×10^7	1×10^3	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-
3		1×10^7	1×10^4	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-
4		1×10^5	1×10^4	1×10^8	1×10^7	1×10^3	-
5		1×10^7	1×10^5	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-
6		1×10^7	1×10^4	1×10^8	1×10^7	1×10^2	-
7		1×10^7	1×10^4	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-

Таблиця 4

Результати мікробіологічного дослідження зразків випорожнень на 15 добу
у групі інтактних тварин

Зразок №		Загальна кількість кишкових паличок, КУО	S. aureus	Біфідо-бактерії, КУО	Лактобак-терії, КУО	Кандида, КУО	Клостридії
	Нормальні показники	10^4-10^7	10^3-10^5	10^6-10^9	10^6-10^8	0-10^3	-
1		1×10^7	1×10^4	1×10^7	1×10^6	1×10^2	-
2		1×10^6	1×10^3	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-
3		1×10^7	1×10^4	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-
4		1×10^5	1×10^4	1×10^8	1×10^7	1×10^3	-
5		1×10^x	1×10^5	1×10^7	1×10^8	1×10^2	-
6		1×10^7	1×10^4	1×10^9	1×10^7	1×10^3	-
7		1×10^7	1×10^4	1×10^7	1×10^7	1×10^3	-

Аналіз таблиці 1 та таблиці 2 свідчить, що у досліджуваній групі з мікробним навантаженням на 11 та 15 добу експерименту спостерігалося зменшення числа лактобактерій до <1 × 10^5 КУО, біфідобактерій до 10^5 КУО; достовірне збільшення кількості умовно патогенної мікрофлори та поява патогенної мікрофлори - клостридій. Що свідчить про розвиток виражених дисбіотичних порушень. В групі інтактних тварин (таблиці 4 і 5) на 11 та на 15 добу експерименту зберігалися нормальні показники кишкової мікробіоти.

Приклад 3. Матеріалом для морфологічного дослідження послужили фрагменти тонкого і товстого кишечника, вирізані відразу ж після виведення тварин з експерименту. З фрагментів вирізали стандартні шматочки на всю товщину стінки органу, потім матеріал фіксували в 10 % водному розчині нейтрального формаліну та після спиртової проводки піддавали парафіновій проводці. Готували серійні зрізи товщиною 4-5 × 10^{-6}м. Оглядові препарати, забарвлені гематоксиліном і еозином, використовували для оцінки стану досліджуваних тканин і морфологічного дослідження. Вивчення мікропрепаратів проводили на мікроскопі Olympus BX-41 з подальшим мікроскопічним фотографуванням.

Результати дослідження свідчать, що для групи інтактних тварин не характерні будь-які морфологічні зміни дистрофічного, запального або циркуляторного характеру в тонкому і товстому відділах кишечника (фіг. 1, 2). В умовах моделі мікробного навантаження запальний процес охоплював тонкий і товстий кишечник, при цьому морфологічна картина змін була однотипною в обох відділах кишечника, характеризувалася розвитком катарально-десквамативного або ерозивно-виразкового ентероколіту. Зазначалося значне пошкодження слизової оболонки, десквамація епітелію, гіперплазія і гіпертрофія келихоподібних клітин з ознаками гіперпродукції слизу, а також утворення ерозій і виразок. Запальний процес торкався не тільки власної пластинки слизової оболонки, але також поширювався на підслизову оболонку і м'язову оболонку, що було показником тяжкого перебігу захворювання (фіг. 3-5).

Таким чином, заявлено новий спосіб моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями тонкого і товстого кишечника у щурів. Спосіб є простим, легковідтворюваним, достовірним, а також зручним для дослідження фармацевтичних препаратів та композицій направлених на лікування дисбіотичних та запальних порушень кишечника.

Джерела інформації:

1. Клінічні можливості застосування комплексного пробіотика "Пробіз" з метою профілактики та лікування антибіотикоасоційованої діареї та інших запальних уражень кишечника (огляд літератури) / Ю.В. Марушко, А.О. Леонов // Современная педиатрия. - 2016. - № 8 (80). - С. 123-128.

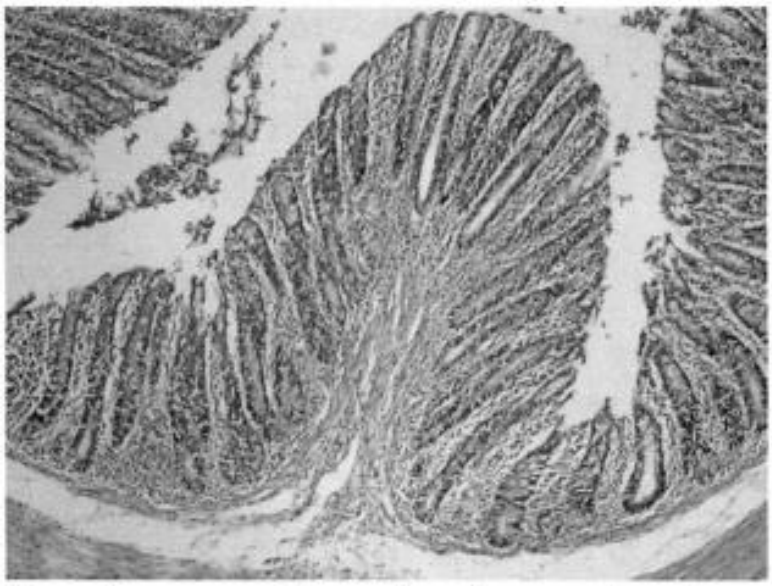
2 Патент 2477894 РФ, МКИ6 C01D 23/28. Способ моделированя дисбактериоза кишечника у лабораторных животных / Чичерин И.Ю., Ердякова А.С, Дармов И.В., Погорельский И.П., Лундовских И.А. - заявл. 05.12.2011; опубл. 20.03.2013, бюл. № 1.

3. Активність мієлопероксидази в слизовій оболонці товстої кишки щурів за умов тривалої антибіотикотерапії та при експериментальному виразковому коліті / Курочка А., Довбинчук Д. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. - 2013. - № 16. - С 46-48.

4. Морфофункціональний стан ободової кишки щурів за умов дії похідних піролу на тлі експериментального коліту / Єна М., Кузнецова Г., Рибальченко В. // Науковий вісник Східноєвропейського національного університету імені Лесі Українки. Розділ IV. Фізіологія людини і тварин. - 2015. - №2. - С. 151-155.

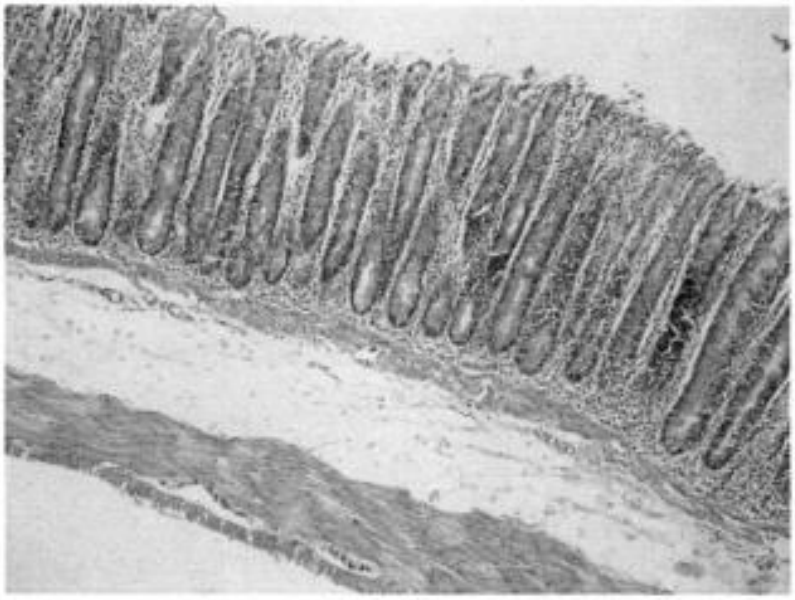
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання коліту з дисбіотичними порушеннями у щурів, що включає в себе імуносупресію, який **відрізняється** тим, що імуносупресію викликають шляхом внутрішньом'язового введення циклофосфаміду у дозі 0,6 мг/кг упродовж 7 днів при мікробному навантаженні per os (Staphylococcus aureus, Candida albicans, Clostridium perfringens) упродовж 3 днів.



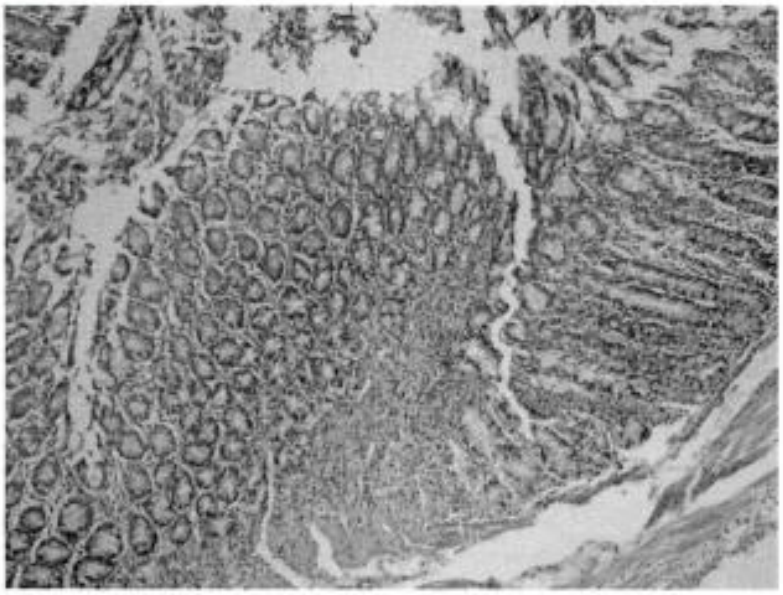
Тонкий кишечник. Гістологічна будова відповідає нормі. Епітеліальне вистилання збережене на всій ділянці. Інтактні тварини. Забарвлення гематоксиліном і еозином, х 100

Фіг. 1



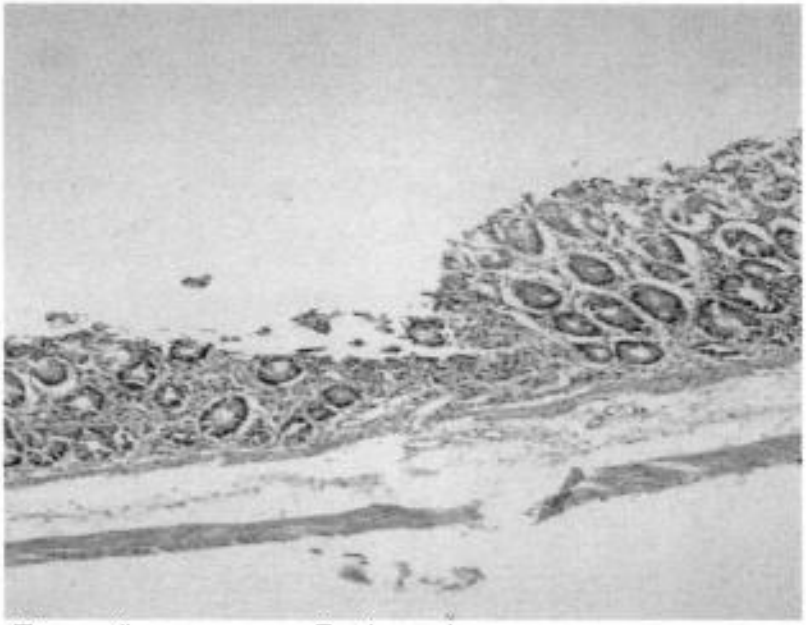
Товстий кишечник. Гістологічна будова відповідає нормі. Інтактні тварини. Забарвлення гематоксиліном і еозином, х 100

Фіг. 2



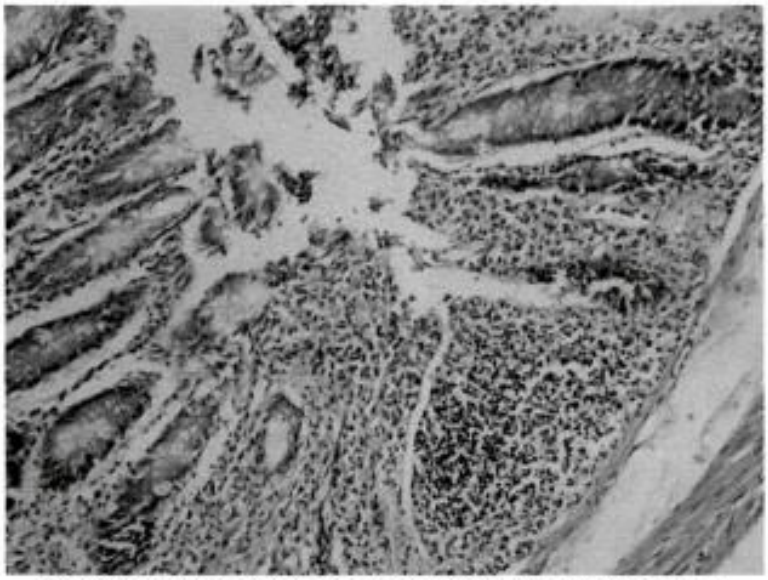
У просвіті тонкого кишечника слиз і десквамований епітелій. У власній пластинці слизової оболонки набряк з вираженою запальною інфільтрацією. Модель з мікробним навантаженням. Забарвлення гематоксиліном і еозином, х 100

Фіг. 3



Товстий кишечник. В ділянці виразкового ураження слизової оболонки виражена запальна інфільтрація. Модель з мікробним навантаженням. Забарвлення гематоксиліном і еозином, х 200

Фіг. 4



Тонкий кишечник. Формування крипт-абсцесів.
Модель з мікробним навантаженням.
Забарвлення гематоксиліном і еозином, х 200

Фіг. 5

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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