



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **78097**

(13) **U**

(51) МПК

G09B 23/28 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2012 09763**

(22) Дата подання заявки: **13.08.2012**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.03.2013**

(46) Публікація відомостей **11.03.2013, Бюл.№ 5**
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Романенко Олена Григорівна (UA),
Мамчур Віталій Йосипович (UA),
Руденко Анатолій Іванович (UA),
Мосийчук Лідія Миколаївна (UA),
Опихайло Максим Сергійович (UA),
Лєвих Антон Едуардович (UA),
Челкан Віра Володимирівна (UA)**

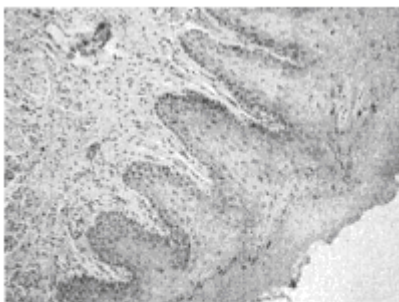
(73) Власник(и):

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

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО ГАСТРОДУОДЕНІТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання хронічного гастродуоденіту в експерименті, що включає введення лабораторним тваринам жовчі як діючої речовини інтрагастрально на тлі обмеження добового раціону, причому спочатку використовують 50 % жовч протягом 30 діб без обмеження добового раціону, а потім 10 діб з обмеженням добового раціону на 1/3.



Фіг. 1

UA 78097 U

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

Актуальність проблеми хронічних гастродуоденітів та виразкової хвороби обумовлена значною поширеністю у дітей захворювань органів травлення, серед яких провідне місце займає гастродуоденальна патологія.

Хронічні захворювання шлунка і дванадцятипалої кишки часто починаються в дошкільному та шкільному віці; рецидивуючий перебіг хвороби призводить до виражених анатомічних змін органа і в подальшому до втрати працездатності та інвалідизації дорослого населення. Спостереження в дитячій гастроентерологічній клініці свідчать, що в останні 10 років у дітей реєструється збільшення частоти важких форм гастритів і гастродуоденітів, що призводять до розвитку виразкової хвороби, множинних ерозій і субатрофії, атрофії гастродуоденальної слизової оболонки [1, 2, 3]. Хронічний гастродуоденіт характеризується неспецифічною запальною структурною перебудовою слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки, а також секреторними і моторно-евакуаторними порушеннями. У дітей, на відміну від дорослих, ізольоване ураження шлунка або дванадцятипалої кишки спостерігають порівняно рідко, в 10-15 % випадків [1]. Значно частіше спостерігають поєднане ураження цих відділів. Дванадцятипала кишка виливає на секреторну та евакуаторну діяльність шлунка, підшлункової залози і жовчовивідних шляхів. Відомо, що до ендогенних факторів агресії, що викликають ураження слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки, відносяться жовчні кислоти. Жовчні кислоти сприяють солюбілізації ліпідів мембран поверхневого епітелію. Такий ефект залежить від концентрації, рівня кон'югації і гідроксилування жовчних кислот і, що дуже важливо, від рН шлункового вмісту. При низьких значеннях останнього, слизову оболонку ушкоджують тільки тауринові кон'югати. Таким чином, жовчний рефлюкс не самостійне захворювання, а синдром, який супроводжує ряд захворювань верхніх відділів травного каналу: хронічні гастрити, гастроезофагеальну рефлюксну хворобу, пептичні виразки шлунка і дванадцятипалої кишки.

Включення в ульцерогенний розчин медичної жовчі продиктовано необхідністю створити умови розвитку патоморфогенеза, близьких до таких у людини. Дуоденогастральний рефлюкс з попаданням жовчі в шлунок відіграє важливу роль в патогенезі гастродуоденіта. Жовч руйнує захисний слизовий шар і знижує резистентність слизової оболонки гастродуоденальної зони до впливу агресивних факторів. В умовах організму людини в шлунок потрапляє не концентрована жовч, а жовч, змішана з бікарбонатами соку підшлункової залози і вмістом дванадцятипалої кишки. У зв'язку з цим для відтворення моделі хвороби використовується 50 % жовч.

Велика варіабельність патогенетичних механізмів захворювань гастродуоденальної зони обумовлює безліч способів їх відтворення (аплікацією на стінку шлунка некротизуючих речовин; порушення кровообігу стінки шлунка шляхом накладання лігатур на судини; вплив на центральну нервову систему та ін.) [2, 5, 7]. Деякі методи, такі як аплікації на стінку шлунка некротизуючих речовин, вплив на різні відділи центральної нервової системи (ЦНС), складні в технічному виконанні, вимагають операційного втручання або спеціальних інструментів, апаратів. Найбільш зручним у виконанні вважається метод інтрагастрального введення речовин із сильною подразнюючою або некротизуючою дією, наприклад ацетилсаліцилової кислоти, соляної кислоти, етилового спирту. Для відтворення стійкої моделі гастродуоденальної патології подразнюючу речовину необхідно вводити протягом 12-15 днів [6]. Перераховані методи не відтворюють адекватну фізіологічну модель гастродуоденіта у дітей.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача розробити ефективну модель гастродуоденіту, яка максимально характеризує зміни у слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки та дає змогу дослідити всю динаміку патологічного процесу - від норми через передпатологічний стан до гастродуоденіту.

Один з найбільш поширених способів отримання ураження шлунка з відтворення пептичної виразки (деклараційний патент України 35336А, А 61 В 5/00. 15.03.2001). / Л.М. Тарасенко, І.М. Скрипник, К.С. Непорада) [5, 7], який враховує три провідні механізми: 1) хронічне емоційне напруження (хронічний стрес відтворювали за О. Desiderate et al. (1974) протягом 12 днів експозицією в 1 годину); 2) цитолітичну та детергентну дію 10 % розчину жовчі, введенного перорально що реалізує дуодено-гастральний рефлюкс (1 мл розчину жовчі вводили у шлунок через зонд перед моделюванням хронічного стресу); 3) харчовий дисбаланс (зменшення на одну третину добового раціону). Досліди ставляться на щурах. Як найближчий за технічною суттю та ефекту, що досягається, цей спосіб обрано за прототип.

Загальними ознаками прототипу та способу що заявляється є те, що для відтворення моделі гастродуоденіту, щурам діюча речовина (жовч) вводиться інтрагастрально на тлі обмеження добового раціону.

Відмінними ознаками є те, що для відтворення моделі гастродуоденіту використовується 5 50 % жовч.

Модель має два етапи: перший - введення жовчі протягом 30 діб, без обмеження добового раціону; другий - введення жовчі протягом 10 діб, з обмеженням добового раціону на 1/3. Перший етап моделює поступові розлади моторної функції і початкові морфологічні зміни у верхніх відділах травної системи Фіг. 1 (Десна. Збільшення 200х. Г-Е), другий - загострення 10 хронічного гастриту і дуоденіту Фіг. 2 (Слизова оболонка шлунка з запаленням. Збільшення 400х. Г-Е) та Фіг. 3(Слизова оболонка дванадцятипалої кишки з запаленням. Збільшення 400х. Г-Е).

Прототип відтворює деструктивні зміни в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки, пропонується модель - поверхневі ерозії на тлі хронічного запалення Фіг. 4 (Слизова дванадцятипалої кишки. Збільшення 100х. Г-Е), Фіг. 5 (Слизова дванадцятипалої кишки. Збільшення 400х. Г-Е).

Прототип відтворює модель на статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар масою 140-220 г, а запропонована модель - на щурах обох статей пубертатного віку лінії Вістар масою 70-90 г, що дозволяє екстраполювати результати досліджень морфологічних змін, динаміки біохімічних порушень на пацієнтів дитячого віку.

Модель гастродуоденіту відтворювалася на щурах обох статей лінії Вістар масою 70-90 г (28 тварин). Контрольну групу склали 10 інтактних тварин. Лабораторним щурам протягом 30 днів вводили 50 % медичну жовч в кількості 1 мл на 100 г ваги тварини один раз на добу. Щури перебували на повністю збалансованому харчовому раціоні. Доступ до води та їжі не обмежувався. Цей період забезпечив попередню адаптацію до наступного етапу моделі. Другий етап моделі тривав 10 днів і полягав в обмеженні харчового раціону щурів на 1/3, введення 25 50 % розчину медичної жовчі. Годування тварин проводили два рази на день, 2/3 урізаного раціону давали через 1 годину після введення жовчі і тоді ж давали воду без обмежень. Другий раз тваринам давали 1/3 урізаного раціону вранці, за 6-7 годин до введення жовчі і давали воду 30 без обмежень. Поїлки прибирали за 1 годину до введення жовчі. Вільний доступ до води тварини отримували через 1 годину після інтрагастрального введення жовчі. В контрольній групі щурам інтрагастрально вводили стерильний фізіологічний розчин.

Тривале введення жовчі супроводжувалось погіршенням апетиту, а також відмічалось незначне схуднення на 5,0-9,0 грам маси тіла кожної тварини (протягом другого етапу експерименту).

Зміна загального стану тварин супроводжувалась морфологічними змінами в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки. Так, у більшості щурів на 40 день експерименту визначались морфологічні і біохімічні зміни у гастродуоденальній зоні.

Евтаназію тварин проводили в два етапи: після 30 днів експерименту (6 тварин) і на наступний день після закінчення розвитку моделі (32 тварини). Морфологічний стан слизовій оболонки шлунка у тварин з моделлю гастродуоденіту оцінювали після першого і другого етапу моделі.

Після першого етапу моделі при макроскопічному дослідженні шлунка на слизовій оболонці шлунка виявляються поодинокі ерозії Фіг. 6 (Слизова шлунка. Поверхневі ерозії. Збільшення 200х. Г-Е).

Слизова оболонка шлунка візуально не змінена. При мікроскопічному дослідженні в слизовій шлунка відзначаються неглибокий дефект епітелію, у власній пластинці - поодинокі лімфоцити Фіг. 7 (Слизова шлунка. Збільшення 400х. Г-Е).

В слизовій оболонці дванадцятипалої кишки макро- і мікроскопічні зміни відсутні.

Після другого етапу моделі - при макроскопічному дослідженні шлунка на тлі гіперемії слизової шлунка розташовані множинні дефекти епітеліального шару за типом ерозій. При мікроскопічному дослідженні в слизовій шлунка відзначаються неглибокі дефекти епітелію, просвіти залоз розширені, залізісті клітини збільшені, у власній пластинці - лімфолейкоцитарна інфільтрація. В клітинах поверхневого шару епітелію шлунка - значно виражений пара кератоз 55 (Фіг. 8, 9, 10, 11, 12).

Фіг. 8 (Слизова шлунка. Збільшення 200х. Г-Е);

Фіг. 9 (Слизова шлунка. Збільшення 400х. Г-Е);

Фіг. 10 (Слизова шлунка. Збільшення 400х. Г-Е);

Фіг. 11 (Слизова шлунка. Епідермальний відділ. Порушення стратифікації багат шарового 60 плоского епітелію. Збільшення 400х. Г-Е);

Фіг. 12 (Слизова шлунка. Епідермальний відділ. Порушення стратифікації багатошарового плоского епітелію. Збільшення 400х. Г-Е).

При гастродуоденіті запропонованої моделі зміни з боку судин у вигляді розширень і спазмів свідчать про порушення мікроциркуляторної ланки судинної системи (Фіг. 13).

У дванадцятипалій кишки - виявляються залізисті клітини в стані апоптозу. У проксимальних відділах слизової - десквамація залозистого епітелію, легкі поверхневі ерозії проксимальних відділів ворсин, покритих великою кількістю слизу. У підслизовому шарі - різко повнокровні сосуди. В слизовій оболонці - стази в капілярах.

Морфологічні зміни в гастродуоденальній зоні супроводжувались біохімічними змінами в гомогенатах слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки щурів, які оцінювались після другого етапу моделі.

Аналіз стану перикисного окислення ліпідів (ПОЛ) показав, що концентрація малонового діальдегіду (МДА) в гомогенатах слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки щурів з експериментальним гастритом і дуоденітом збільшується в 1,5 рази ($p < 0,01$), порівняно з групою інтактних тварин (

Таблиця 1

Показники оксидантної і антиоксидантної активності
у гомогенатах слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки щурів ($M \pm m$).

Групи тварин	СОД (у.о./мг білка)	Каталаза (мкат/мг білка)	МДА (нмоль/мг білка)	АФГ (у.о./мг білка)	КФГ (у.о./мг білка)
Контрольна (n=10)	3,3±0,1	14,1±0,7	1,8±0,1	0,2±0,0	0,3±0,0
Експериментальна (n=22)	2,3±0,1 $p < 0,001$	55,6±2,1 $p < 0,001$	2,7±0,1 $p < 0,01$	0,3±0,0 $p < 0,07$	0,3±0,0 $p = 0,6$

Але активація вільнорадикального окиснення в гомогенатах слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки не викликає посилення окисної модифікації білків (ОМБ). Це проявлялось практичною відсутністю достовірних змін основних маркерів ОМБ: альдегідфенілгідрозонів (АФГ), що являються показниками фрагментації, і кетонфенілгідрозонів (КФГ), що являються показниками агрегації білкової молекули.

У той же час наше дослідження показало активацію антиоксидантної системи у відповідь на інтенсифікацію процесів ПОЛ. Активність каталази гомогенатів слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки щурів з експериментальним гастродуоденітом значно підвищувалася ($p < 0,001$). Рівень активності супероксиддисмутази (СОД) достовірно знижувався в експериментальній групі тварин. Подібні зміни характерні для стану гіпоксії.

Вважають, що на ранніх етапах розвитку запалення в слизових оболонках відбувається підвищення продукції NO, що є компенсаторним механізмом для забезпечення кровопостачання і підтримки високого рівня метаболізму в тканинах за рахунок прямої вазодилатації. При прогресуванні захворювання відбувається виснаження джерел синтезу NO (L-аргінін) і зниження його утворення, що призводить до підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів, зниження фібринолітичної активності крові, порушення регуляції судинного тону та розвитку мікротромбозів судинної системи. Негативна дія NO починає проявлятися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, приводячи до функціонального і структурного пошкодження органу [4].

Таблиця 2

Характеристика змін білкового обміну у гомогенатах
слизової оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки щурів.

Групи тварин	Білок (г/л)	Метаболіти NO (мкмоль/л)
Контрольна (n=10)	6,6±0,3	134,9±3,4
Експериментальна (n=22)	4,8±0,1 $p < 0,001$	49,3±3,2 $p < 0,001$

Виявлено, що рівень стабільних метаболітів NO в гомогенатах тканин шурів з гастродуоденітом зменшувався практично в три рази ($p < 0,001$) в порівнянні з показником в групі інтактних тварин, що говорить про виснаження депо оксиду азоту при захворюванні (Таблиця 2).

Виявлені зміни, що відбуваються в тканинах слизовій оболонки шлунка та дванадцятипалої кишки у експериментальних тварин, є дистрофічно-запальними і пов'язані з розпадом білкових структур.

Відзначається достовірне зменшення вмісту білка в тканинах у тварин експериментальної групи ($p < 0,05$). Порушення мікроциркуляторної ланки судинної системи, пов'язане з дефіцитом NO, викликає гіпоксію і надмірну активацію вільнорадикальних процесів.

Додаткова кількість кисню утворюється при розкладанні пероксиду каталазою. При гіпоксії утворення оксиду азоту відбувається за допомогою нітритредуктазної ферментативної системи з нітратів і нітритів, що і пояснює зменшення кількості NO_3 та NO_2 в гомогенатах тканин шурів.

Таким чином, моделювання гастродуоденіту після введення 50 % розчину жовчі у тварин призводило до патологічних змін визначених біохімічних показників білкового обміну та ПОЛ. Підвищення активності ферменту антиоксидантного захисту - каталази у шурів може бути розцінено, як позитивна прогностична ознака, необхідна для захисту біологічних мембран ушкоджених клітин від дії перекисів.

Максимальна вираженість патологічних змін спостерігалась на 40 добу після введення 50 % розчину жовчі.

У порівнянні з прототипом, запропонована модель гастродуоденіту є найбільш близькою відповідному захворюванню дитини в патогенетичному відношенні, відсутнє нефізіологічне (гостре емоційно-больове) стресове подразнення.

Таким чином, нами розроблено нову модель хронічного гастродуоденіту (у шлунку-множинні дефекти епітеліального шару за типом ерозій, просвіти залоз розширені, залізисті клітини збільшені, у власній пластинці - лімфолейкоцитарна інфільтрація, в клітинах поверхневого шару епітелію шлунка - значно виражений паракератоз; у дванадцятипалій кишці - порушена рядність залозистого епітелію, виявляються залізисті клітини в стані апоптозу, у проксимальних відділах слизової - десквамація залозистого епітелію, легкі поверхневі ерозії проксимальних відділів ворсин, стази в капілярах слизової оболонки).

Отримані результати підтверджують необхідність розробки такої моделі хронічної гастродуоденальної патології для вивчення як патогенетичних механізмів, так і можливостей терапевтичного впливу.

Джерела інформації:

1. Белоусов Ю.В. Педиатрическая гастроэнтерология: [учеб. пособ.] / Ю.В. Белоусов. - Харьков: Факт, 2007. - 373 с.

2. Горячева І.П. Оптимізація лікування хронічного гастродуоденіту у дітей (клініко-експериментальне дослідження) Авгореф. дис. ...канд. мед. наук: спец. 14.01.10 "Педіатрія" / І.П. Горячева - Київ, 2000. - 12 с.

3. Косарева П.В. Моделирование и терапия НПВП-гастрита / П.В. Косарева, М.В. Черанева, В.В. Неклюдова, Е.И. Самоделкин // Современные наукоемкие технологии. - 2010. - № 12 - С. 40-41

4. Лазебник Л.Б. Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения / Л.Б. Лазебник, В.Н. Дроздов, Е.Н. Барышников. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2005. - № 2. - С. 4-11.

5. Патент 35336 А Україна, А 61В 5/00. Спосіб моделювання пептичної виразки шлунка / Л.М. Тарасенко, І.М. Скрипник, К.С. Непорада. - № 99095270; Заявл. 24.09.99; Опубл. 15.03.01. - Бюл. № 2.-2 с.

6. Тутченко Н.И. Способ моделирования язвенного процесса в желудке / Н.И. Тутченко, Я.В. Гоер, Л.С. Белянский, А.В. Соломко и др. // Пат. физиол. и эксперим. тер.-1990. - № 5. - С. 54-55.

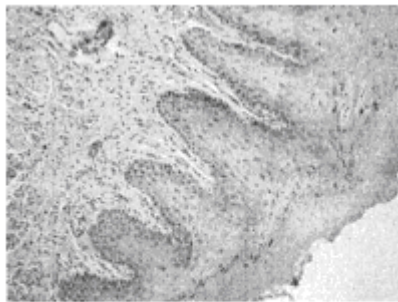
7. Тарасенко Л.М. Экспериментальная модель пептической язвы желудка / Л.М. Тарасенко. И.Н. Скрипник, К.С. Непорада, А.И. Воложин // Патол. физиол. и эксперим. тер.-2001. - № 4. - С. 27-28.

8. Robert A. On the mechanism of cytoprotection by prostaglandins / A. Robert // Annals of Clinical Research. - 1984. - № 16. - P. 335-338.

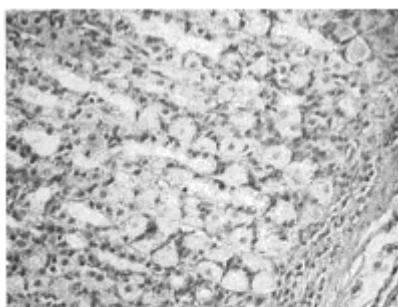
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання хронічного гастродуоденіту в експерименті, що включає введення лабораторним тваринам жовчі як діючої речовини інтрагастрально на тлі обмеження добового

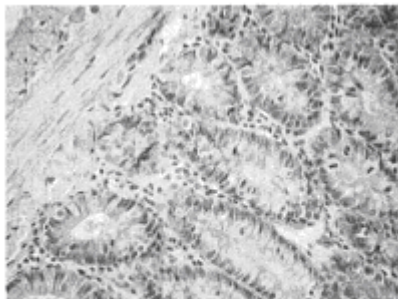
раціону, який **відрізняється** тим, що спочатку використовують 50 % жовч протягом 30 діб без обмеження добового раціону, а потім 10 діб з обмеженням добового раціону на 1/3.



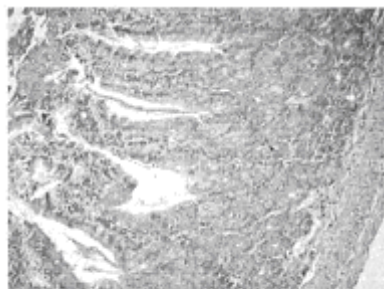
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

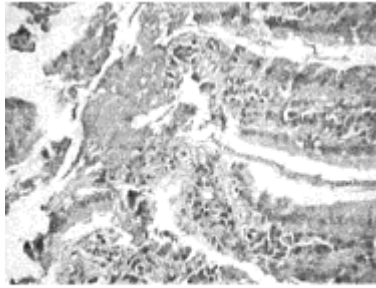


Fig. 5

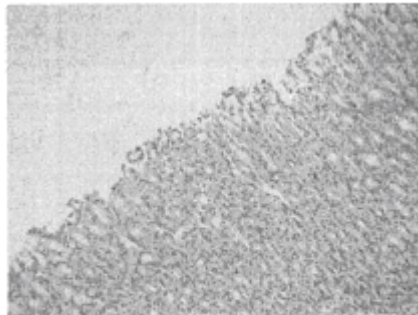


Fig. 6

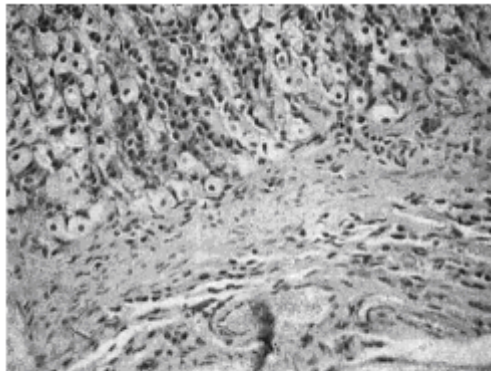


Fig. 7



Fig. 8

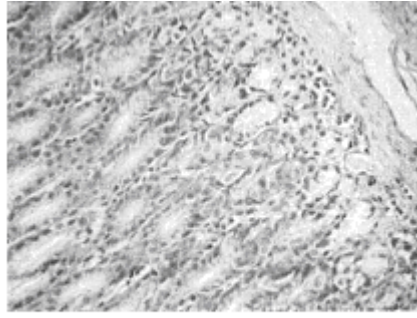


Fig. 9

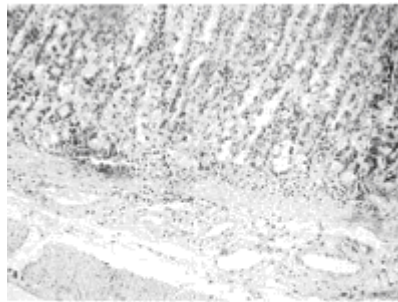


Fig. 10

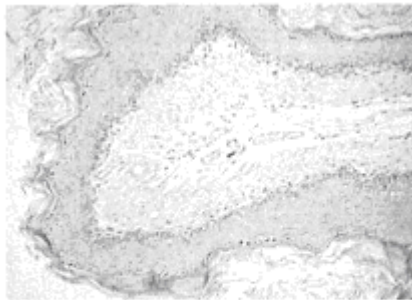


Fig. 11

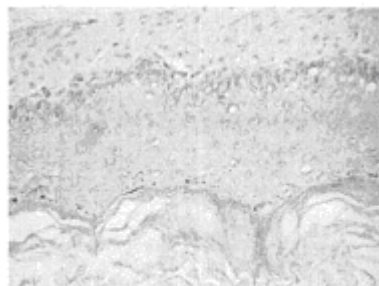
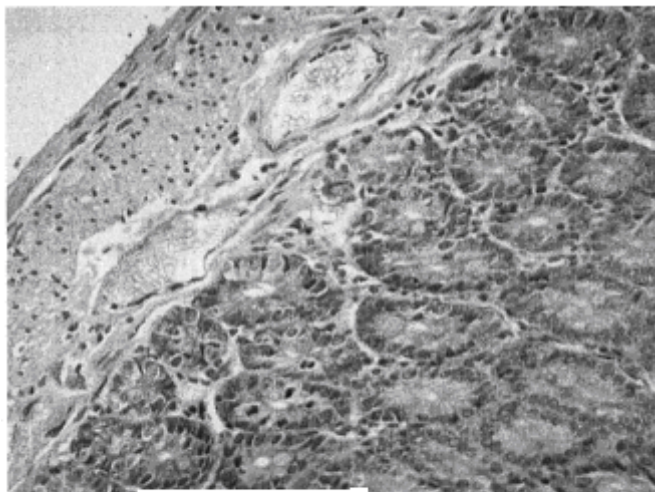


Fig. 12



Фіг. 13

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