



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **61779** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G09B 23/28 (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01)
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ НЕДОСТАТНОСТІ КЛІТИН ПАНЕТА

1

2

(21) u201100999

(22) 31.01.2011

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл. № 14, 2011 р.

(72) ГОРОХОВСЬКИЙ ЄГОР ЮРІЙОВИЧ, ЄЩЕНКО ЮЛІЯ ВІТАЛІЙВНА

(73) ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ" МІНІСТЕРСТВА ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

(57) Спосіб моделювання недостатності клітин Панета, що включає введення тваринам цитотоксичної сполуки, утримування тварин в умовах віварію, проведення досліджень, який **відрізняється** тим, що як цитотоксичну сполуку використовують дитизон, який вводять тваринам одноразово парентеральним шляхом.

Спосіб відноситься до експериментальної медицини, зокрема до експериментальної патофізіології та гастроентерології, стосується моделювання недостатності клітин Панета, які розташовані у базальних відділах кишкових крипт тонкого кишечника шляхом їх селективного ушкодження за допомогою хімічної речовини (дитизону), що дозволяє досліджувати роль антимікробних пептидів – дефенсинів у виникненні, розвитку та протіканні захворювань тонкого кишечника.

Захворювання тонкого кишечника призводять до порушення перетравлення та всмоктування поживних речовин, діареї та ін. Ці симптоми можуть бути обумовлені як безпосереднім ушкодженням клітин кишкового епітелію, так і дисбалансом кишкової флори, що виникає внаслідок цього ушкодження. Майже при всіх хворобах тонкого кишечника та сліпої кишки відмічається зниження кількості клітин Панета [Lewin K. The Paneth cell in disease / K. Lewin // Gut. – 1969. – Vol. 10, № 10. – P. 804-811]. Секреторні гранули цих клітин містять значну кількість антимікробних пептидів – дефенсинів, які відіграють суттєву роль у захисті тонкого кишечника, особливо його дистальних відділів від патогенів (вірусів, бактерій, грибів тощо) [Bevins C.L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity / C.L. Bevins // Biochemical Society Transactions. – 2006. – Vol. 34, part 2. – P. 263-266].

Відомий спосіб моделювання цукрового діабету в щурів [пат. 2400822 Российской Федерации, МПК G09B23/28, Спосіб моделювання сахарного діабета 1 типа у крыс, патентообладат-

ель ФГУ НИИ трансплантологии и искусственных органов федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи, учреждение российской академии медицинских наук НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, авт. Закирьянов А.Р. и др. опуб. 22.05.2009], в якому недостатність інсулярного апарату в щурів викликали триразовим введенням тваринам цитотоксичної сполуки - стрептозотоцину, що призводило до селективного ушкодження В-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози.

Ознаками, спільними з аналогом, є:

- введення тваринам цитотоксичної сполуки;
- утримування тварин в умовах віварію;
- проведення досліджень.

Недоліком цього способу є те, що його використання як способу моделювання недостатності клітин Панета неможливо тому, що стрептозоточин не викликає ушкодження клітин Панета.

Відомий спосіб селективного ушкодження клітин Панета мавп *Macaca mulatta* [Mottet N.K. Primate Paneth cell degeneration following methylmercury hydroxide ingestion / N.K. Mottet, R.L. Body // American Journal of Pathology. – 1976. – Vol. 84. – P. 93-110], який відтворений у моделі виведення важких металів з організму, що включає багаторазове пероральне введення гідроксиду метилртуті: тваринам першої групи в добовій дозі 0,2-1,0 мг протягом 80-491 днів, тваринам другої групи – 2,0 мг протягом 17-18 діб. У тварин першої групи спостерігався некроз деякої частини клітин Панета, особливо при більш тривалому прийомі більших доз гідроксиду метилртуті. У тварин другої групи розвивалися виражені симптоми отруєння

(19) **UA** (11) **61779** (13) **U**

ртуттю, некротичні клітини Панета зустрічалися значно частіше, проте інші клітини кишкового епітелію залишалися інтактними, що свідчило про селективне ушкодження клітин Панета.

Ознаками, спільними з найближчим аналогом, є:

- введення тваринам цитотоксичної сполуки;
- утримування тварин в умовах віварію;
- проведення досліджень.

До недоліків найближчого аналога можна віднести те, що введення цитотоксичної речовини повинно здійснюватися багаторазово, а також те, що не відбувається повне виключення клітин Панета, оскільки деяка їх частина все ж зберігається, і це не дозволяє моделювати повну недостатність клітин Панета та досліджувати роль дефенсинів у виникненні та розвитку захворювань тонкого кишечника. Для реалізації методу потрібен значний час (не менше 17 діб). Також усі сполуки ртуті є надзвичайно токсичними речовинами, які викликають ураження багатьох органів тварин, а не тільки клітин Панета тонкого кишечника, та можуть становити загрозу для здоров'я дослідників, що потребує спеціальних умов для проведення дослідів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб моделювання недостатності клітин Панета, який шляхом введення цитотоксичної сполуки викликає тотальне ушкодження клітин Панета, що дозволяє моделювати недостатність цих клітин та досліджувати роль дефенсинів в умовах *in vivo* при виникненні та протіканні захворювань тонкого кишечника, вдосконалювати існуючі та розробляти нові методи і препарати для їх лікування.

Суттєвими ознаками способу є:

- парентеральне введення тваринам розчину дитизону, що селективно ушкоджує клітини Панета;
- утримування тварин в умовах віварію протягом щонайменше 4 годин;
- проведення досліджень при стані недостатності клітин Панета.

Відмінними від найближчого аналога ознаками способу є:

- одноразове парентеральне введення тваринам розчину дитизону, що селективно ушкоджує клітини Панета;
- утримування тварин в умовах віварію протягом щонайменше 4 годин;
- проведення досліджень при стані недостатності клітин Панета.

Спосіб здійснюють таким чином: тваринам внутрішньочеревинно вводять розчин дитизону в

дозі 95-100 мг/кг ваги тіла, який при парентеральному введенні призводить до тотального некрозу вищевказаних клітин. Ознаки тотального некрозу клітин Панета спостерігають уже через 1 годину після введення речовини. Повну відсутність клітин Панета спостерігають через 4 години протягом 2 діб, після чого починається процес поступового відновлення клітин Панета. Інші клітини кишкового епітелію при введенні дитизону залишаються неушкодженими.

За допомогою запропонованого методу можна проводити дослідження ролі дефенсинів, які містяться в секреторних гранулах клітин Панета, у виникненні, протіканні захворювань тонкого кишечника; розробку нових або вдосконалення вже існуючих методів та препаратів для лікування цих захворювань.

Приклад конкретного виконання: у дослідженні було використано 56 щурів, віком 10-12 місяців, вагою 207 ± 21 г. Дослідним тваринам (28 особин) внутрішньочеревинно вводили водно-аміаковий розчин дитизону в дозі 100 мг/кг. Дослідних тварин, у кількості 4-х особин, яким вводили дитизон, а також контрольних тварин у тій же самій кількості, виводили з дослідів шляхом декапітації через 1, 2, 4, 24, 48 годин; 5 та 14 діб відповідно. У тварин брали шматочки клубової кишки, які фіксували в нейтральному формаліні, та за загальноприйнятою гістологічною методикою заливали в парафін. З парафінових блоків робили мікромомні зрізи 6 мкм завтовшки. Зрізи забарвлювали гематоксилін-флоксином. Наявність клітин Панета визначали як за характерною флоксиновою реакцією на дефенсинмісткий секреторний матеріал в цитоплазматичних гранулах цих клітин, так і за морфологічним критерієм (клітини пірамідальної форми, які розташовані в базальних відділах крипт). Інтенсивність цитохімічної реакції флоксину оцінювали напівкількісним методом за трибальною шкалою. Слабко виражену реакцію оцінювали в 1 бал, 2 бали - реакцію середньої інтенсивності, 3 - інтенсивно виражену реакцію. На основі оцінки інтенсивності реакції флоксину в 100 клітинах розраховували середнє значення інтенсивності реакції.

Статистична обробка полягала в розрахунку середнього арифметичного та його похибки. Для порівняння даних дослідних та контрольних вибірок використовували непараметричний критерій Мана-Уїтні. Усі розрахунки проводили за допомогою статистичного пакету Statistica 6.0. Результати досліджень наведені в таблиці.

Таблиця

Показники реакції флоксину в щурів після введення дитизону

| Термін виведення тварин з дослідів | Інтенсивність реакції флоксину (ум. од.) | | Середня кількість клітин Панета (клітин на крипту) | |
|------------------------------------|--|--------------------|--|--------------------|
| | Дослідні тварини | Контрольні тварини | Дослідні тварини | Контрольні тварини |
| 1 год. | $0,7 \pm 0,02^*$ | $2,3 \pm 0,09$ | 4,3 | 4,6 |

Продовження таблиці

| | | | | |
|---------|-----------|----------|------|-----|
| 2 год. | - | 2,2±0,11 | 1,1* | 4,6 |
| 4 год. | - | 2,3±0,06 | - | 4,5 |
| 24 год. | - | 2,2±0,09 | - | 4,6 |
| 48 год. | 1,3±0,12* | 2,3±0,06 | 0,8* | 4,6 |
| 5 діб | 1,7±0,09* | 2,3±0,08 | 1,6* | 4,4 |
| 14 діб | 2,4±0,14 | 2,2±0,10 | 4,3 | 4,5 |
| *P<0,05 | | | | |

У контрольних тварин цитохімічна реакція флоксину на дефенсинмісткий матеріал секреторних гранул клітин Панета складала в середньому 2,3 ум. од., кількість клітин Панета в перерахунку на одну крипту дорівнювала 4,5 клітин. У тварин, яким вводили дитизон, через 1 годину цитохімічна реакція флоксину складала лише 30 % від норми, а також спостерігали дегрануляцію цитоплазми та некротичні зміни ядра. Через 2 години цитохімічна реакція флоксину була негативною, а в порожнині крипт спостерігали залишки клітин Панета. Через 4 години цитохімічна реакція флоксину на дефенсинмісткий матеріал залишалася негативною, вільні місця у криптах, які утворилися внаслідок відшаровування клітин Панета заповнювалися шляхом змикання розташованих поряд інтактних епітеліальних клітин. Через 24 години реакція флоксину залишалася негативною, за морфологічними критеріями клітини Панета також не були виявлені. Через 48 годин був визначений початок часткового відновлення клітин Панета в базальних відділах кишкових крипт: реакція флоксину була позитивною, але зниженою на 44% порівняно з нормою, кількість клітин Панета в перерахунку на одну крипту дорівнювала 0,8 клітин. Через 5 діб інтенсивність реакції залишалася зменшеною на 26 % порівняно з нормою, кількість клітин Панета в перерахунку на одну крипту

дорівнювала 1,6 клітин, що дозволило констатувати лише часткову компенсацію функції цих клітин. Через 14 діб інтенсивність реакції була більшою ніж у контролі на 9 %, кількість клітин Панета в перерахунку на одну крипту дорівнювала 4,3 клітин, що свідчило про повну компенсацію функції цих клітин.

Таким чином, показано, що введення цитотоксичної сполуки – розчину дитизону викликає тотальне селективне ушкодження клітин Панета базальних відділів кишкових крипт і спрощує моделювання недостатності клітин Панета, дозволяє досліджувати роль дефенсинів в умовах *in vivo* у виникненні та протіканні захворювань тонкого кишечника, вдосконалювати існуючі та розробляти нові методи лікування. Також показано, що недостатність клітин Панета є зворотною, і тому швидкість відновлення популяції цих клітин може слугувати важливим діагностичним критерієм при розробці нових або вдосконаленні вже існуючих схем лікування захворювань тонкого кишечника.

Запропонований спосіб моделювання недостатності клітин Панета є простим для застосування: не потребує складного обладнання, препаратів з високою вартістю і токсичністю, а також характеризується доброю відтворюваністю та відсутністю летальності дослідних тварин.