



УКРАЇНА

(19) UA (11) 62515 (13) A

(51) 7 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ЛОКАЛІЗОВАНОЇ ГНІЙНО-НЕКРОТИЧНОЇ ПРОТЕЙНОЇ ІНФЕКЦІЇ

1

2

(21) 2003042999

(22) 07 04 2003

(24) 15 12 2003

(46) 15 12 2003, Бюл. № 12, 2003 р.

(72) Циганенко Анатолій Якович, Мішина Марина
Митрофанівна, Овечин Петро Васильович(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ(57) Спосіб моделювання локалізованої гнійно-
некротичної протейної інфекції, що включає підбір

інфікуючої дози, введення її внутрішньошкірно та виведення тварин з експерименту, який **відрізняється** тим, що підібрану інфікуючу дозу - 450 мільйонів мікробних клітин в об'ємі 0,1 мл фізіологічного розчину вводять частинами на першу добу 300 мільйонів мікробних клітин в 0,1 мл, а на другу добу - в інфільтрат, що утворився - останні 150 мільйонів мікробних клітин в 0,1 мл фізіологічного розчину

Винахід відноситься до експериментальної медицини, а саме до мікробіології і може бути використаним в розробці моделі зараження тварин для відтворення локалізованої гнійної протейної інфекції.

У теперішній час шпитальні інфекції все частіше обумовлені грамнегативною мікрофлорою, яка є головною причиною гнійно-запальних ускладнень. У останні роки значно зросла роль роду *Proteus* в етіології гнійно-септичних процесів при травмах, захворюваннях сечових шляхів, опіках, променевих ураженнях. Протейна інфекція є однією із розповсюджених видів ускладнень гнійно-септичної патології після хірургічного втручання. У змішаній інфекції протей викликає ускладнення захворювань, викликаних стафілококами, кишковою паличкою, збудниками газової раневої гангрені.

Кількість інфекційних ускладнень у клініках різного профілю зросло по мірі втілення нового обладнання, особливо із пластмасовими деталями, що пов'язано з відсутністю надійних засобів стерилізації. Здібність протей до виживання у зовнішньому середовищі, стійкість до антисептиків та дезінфектантів, а також різноманітність шляхів інфікованості забезпечує постійну підтримку епідемічного процесу у лікарнях.

Розробка нових методів лікування гнійно-запальної протейної інфекції як ускладнення після хірургічного втручання - одна з ключових проблем у хірургічній клініці. Залишаються не вирішеними складні питання швидкої діагностики, причини

збільшення частоти важких ускладнень і летальних наслідків протейної інфекції. Для розробки ефективних методів лікування та швидкої діагностики протейної інфекції виникає необхідність моделювання цього складного патологічного процесу.

Незважаючи на достатній арсенал відомих експериментальних моделей, оптимальної експериментальної локалізованої гнійно-некротичної моделі протейної інфекції, яка б найбільш точно відтворювала перебіг цього процесу не існує.

Так, наприклад, є модель з внутрішньошкірним зараженням тварин, яка була запропонована Першиним Г.Н. Модель виконують наступним чином: добу культуру протей у вигляді суміші у фізіологічному розчині вводять мишам внутрішньошкірно в області черева (попередню поверхню черева необхідно депілювати). Заражаюча доза становить 100-300 мільйонів мікробних тіл та вводиться в об'ємі 0,1 мл. Через 24-48 годин після зараження мишей на місці введення культури розвивається гнійно-некротичний процес. Характер та інтенсивність уражень умовно позначають по ступеням: перша ступень ураження (+) - крапкові та малі некрози, діаметром біля 2 мм або інфільтрати, які не супроводжуються некротичним процесом; друга ступень - (++) - некроз діаметром від 3 до 5 мм, третя ступень - (+++) - некроз діаметром від 6 і більш. Відсутність уражень позначають - «-». У залежності від розміру та інтенсивності ураження гнійно-некротичні вогнища підлягають зворотньому розвитку через 9 - 14

(13) A
(11) 62515
(19) UA

дiб після зараження (Перший Г Н «Методы экспериментальной химиотерапии» / Практическое руководство - М Медицина, 1971 - 539с)

Другою моделлю, яку використовують для відтворення експериментальної протейної інфекції у білих мишей при внутрішньошкірному засобі їх зараження була запропонована А Я Циганенко. Моделювання виконують слідуючим чином білим мишам 16-18 грамів в області черева внутрішньошкірно у об'ємі 0,2мл вводять, в одному випадку (контрольним тваринам) 200 мільйонів мікробних клітин добової культури вірулентного 64 штаму протей, у другому випадку (дослідним тваринам) - інфікуючу дозу разом з антибіотиком

Спостереження за розвитком гнійно - некротичного процесу у контрольній групі тварин - 10 дiб Відсоток загиблх мишей становить 21-38% (А Я Циганенко «Экспериментальное изучение комбинированного действия антибиотиков на *Bact. Proteus*» /Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, Харьков - 1958 г)

Третьою моделлю для експериментальної внутрішньошкірної протейної інфекції є модель Оветчина П В Моделювання відтворюють слідуючим чином під ефірним наркозом вискубають смух на череві мишей Зараження проводять різними дозами добової агарової культури найбільш вірулентного та антибіотикостійкого штаму *Proteus vulgaris* 2073 Підбір заражаючої дози виконують з такого розрахунку, щоб доза, яку вводять викликала великий некроз шкіри, а розвиток інфекції не приводив до швидкої загибелі мишей - оптимальна заражуюча доза - 600 мільйонів мікробних клітин Заражаючу дозу вводять внутрішньошкірно у об'ємі 0,1мл фізіологічного розчину На протязі 14 дiб спостерігають за динамікою розвитку некротичного вогнища та його загоюванням Тварини, що загинули складали при цьому 45% від усіх взятих в експеримент (П В Оветчин «Лечение протейной инфекции гентамином и вакциной *per se* и в сочетании» /Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, ХГМИ - 1984 г)

Вище згадана модель є найбільш близькою по технічній суті та результату, який може бути досягнутий до тiєї, що заявляється, тому вона обрана в якості прототипу

Основним недоліком відомих способів експериментального моделювання протейної інфекції на білих мишах при внутрішньошкірному методі їх зараження, в тому числі і прототипу є те, що вони мають високу летальність експериментальних тварин Серед загиблх тварин є відсоток таких, які гинули через протейний сепсис, тобто процес генералізувався, що впливало на чистоту експерименту

У зв'язку з вищевикладеним, в основу винаходу покладено задачу підвищення ефективності моделювання локалізованої гнійно - некротичної протейної інфекції шляхом підвищення точності відтворення гнійно -некротичного процесу, його пролонгованості та зниження летальності тварин

Задача, яку покладено в основу винаходу, вирішується тим, що у відомому способі моделювання, що включає підбір заражаючої дози, введення

її внутрішньошкірно та виведення тварин з експерименту, згідно з винаходом, підібрану інфікуючу дозу - 450 мільйонів мікробних клітин в заданому об'ємі фізіологічного розчину вводять частинами на першу добу 300 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл, а на другу добу - в інфільтрат, що утворився останні 150 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл фізіологічного розчину

Патологічний процес розгортається з більш тривалим періодом виявлення клінічних симптомів запалення без генералізації протейної інфекції Пролонгованість локалізованого гнійно - некротичного процесу досягають за рахунок поступового введення підібраної заражаючої дози Летальність знижується за рахунок уникнення швидкої генералізації процесу

Спосіб виконують слідуючим чином

Моделювання локалізованої гнійно - некротичної протейної інфекції проводять на білих мишах, масою 18-20г, що знаходяться в умовах стандартного лабораторного утримання і раціону харчування Експеримент проводять на протязі 16 дiб Вірулентність тест-культур відповідає стандартним умовам Усі процедури виконують відповідно до Хельсінської декларації про гуманне відношення до тварин

Під ефірним наркозом за добу до зараження вискубають смух на череві білих мишей На депельованій поверхні черева роблять внутрішньошкірну ін'єкцію інфікуючих доз музейних штамів *Proteus mirabilis* ПСК 160208 SS F 403 і клінічного штаму № 358, який був вилучений від хворого з тяжким перебігом протейної інфекції, одержаних з інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім Л В Громашевського АМН України з розрахунку 300 мільйонів мікробних клітин в об'ємі 0,1 мл фізіологічного розчину На другу добу в місті введення культури протей утворюється інфільтрат, під який вводять 150 мільйонів мікробних клітин в 0,1 мл фізіологічного розчину Спостерігають за динамікою розвитку некротичного вогнища Генералізацію процесу контролюють виведенням тварин з досліду на 5-ту, 10-ту та 17 добу та дослідженням на септицемію

Заражаючу дозу 450 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл фізіологічного розчину, яку вводять частинами на першу добу 300 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл, а на другу добу - в інфільтрат, що утворився останні 150 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл фізіологічного розчину, підібрали експериментальне дослідну групу подіпили на 10 підгруп, у кожній по 20 мишей білим мишам одночасно внутрішньошкірно вводили інфікуючі дози з інтервалом у 100 мільйонів мікробних тіл в 0,1мл, починаючи з 100 мільйонів мікробних тіл в 0,1мл і закінчуючи 1 мільярдом мікробних тіл в 0,1мл

1 підгрупа - 100млн мікробних тіл в 0,1мл

2 підгрупа - 200млн мікробних тіл в 0,1мл

3 підгрупа - 300млн мікробних тіл в 0,1мл

4 підгрупа - 400млн мікробних тіл в 0,1мл

5 підгрупа - 500млн мікробних тіл в 0,1мл

6 підгрупа - 600млн мікробних тіл в 0,1мл

7 підгрупа - 700млн мікробних тіл в 0,1мл

8 підгрупа - 800млн мікробних тіл в 0,1мл

9 підгрупа - 900млн мікробних тіл в 0,1мл

10 підгрупа - 1млрд мікробних тіл в 0,1мл

Спостерігали за тваринами щоденно у 1 та 2 підгрупі тварин місцеве на 2-3 добу йде розвиток запальної реакції у вигляді підпухлості шкіри з пощільненням. Починаючи з 4 - і доби йде зменшення запальної реакції та на 7-у добу процес запалення загасає. Усі тварини живі, вогнище некрозу не утворилось. У 3 підгрупі тварин на другу добу утворюється запальна реакція у вигляді підпухлості шкіри з інфільтратом у діаметрі 3мм. Починаючи з 7 - і доби йде зменшення запальної реакції, вогнище некрозу не утворилось, на 12 добу процес запалення загасає. Усі тварини живі. У 4 підгрупі тварин на другу добу утворюється запальна реакція у вигляді підпухлості шкіри з інфільтратом у діаметрі 4 мм. Починаючи з 8-ї доби йде зменшення запальної реакції, вогнище некрозу не утворилось, на 12-ту добу процес запалення загасає. 8 тварини загинули від септицемії (40%). У 5 та 6 підгрупі тварин на 2-гу добу утворюється запальна реакція з інфільтратом у діаметрі 5мм, на 4-ту добу йде утворення гнійного вогнища, діаметром 3 мм. На 6-ту добу діаметр некрозу становить 3-4мм. Загинуло 19 тварин від сепсису на 4-6-ту добу (47,5%). У 7 та 8 підгрупі мишей на 2-гу добу у місці введення утворювався абсцес, який розтинався на 5-ту добу та утворювалося вогнище некрозу діаметром 6 мм при цьому дуже висока летальність серед мишей - більш половини - 26 мишей загинуло від сепсису (65%). У 9 підгрупі мишей на 2-гу добу загинуло 3 миші. У 6 мишей розвився нижній парапарез по центральному типу задніми лапами миші не рухали, пересувалися за допомогою передніх лап, і задні лапи їх були вивернуті назовні, що свідчить про підвищення м'язового тонусу по спастичному типу. Дана клінічна картина характерна для запалення спинного мозку. Даний протейний мієліт є вторинним тому, що він обумовлений наявністю гнійного вогнища на череві. У патогенезі вторинного інфікованого мієліту грають роль алергійний фактор та гематогенне занесення інфекції у спинний мозок. Ці миші загинули на 6-ту добу. Летальність у 9 підгрупі - 80%. Миші 10-ї підгрупі загинули на 2-3 добу (100%). У тварин, починаючи з 4-ї підгрупи, йде зростання відсотку летальності від сепсису, що перешкоджає проведенню експерименту.

Приклад № 1 При відтворенні моделі, яка є прототипом даного дослідження були одержані наступні результати експериментальної групи мишей (n=20) внутрішньошкірно ввели заражаючу дозу 600 мільйонів мікробних клітин добової агарової культури вищезгаданих музейних штамів у об'ємі 0,1мл фізіологічного розчину. За тваринами встановили постійний нагляд. На другу добу у місці введення утворюється запальна реакція у вигляді підпухлості шкіри з інфільтратом у діаметрі 5мм. На 4-ту добу йде розвиток некротичної реакції. 4 тварини загинули від септицемії. На 6-ту добу некроз становить 3-4мм, ще 2 тварини загинули. Починаючи з 8 - і доби йде зменшення запальної реакції, але загинуло ще 3 миші від септицемії. Відсоток загинувших мишей у групі від генералізації процесу становить 45%.

Приклад № 2 Мишам групи для утворення вогнища запалення за способом, що заявляється на депельованій поверхні черева робили внутрішньошкірну ін'єкцію підбіраною оптимальною інфікуючою дозою, при якій жодна тварина не загинула, а на другу добу у всіх мишей утворився інфільтрат. Цією дозою є 300 мільйонів мікробних тіл в 0,1мл. На другу добу йде розвиток запальної реакції у вигляді підпухлості шкіри з інфільтратом у діаметрі 3 мм. В інфільтрат, що утворився, вводили половину інфікуючої дози штамів протей - 150 мільйонів мікробних клітин в 0,1мл фізіологічного розчину. На 4-ту добу розвивається некроз шкіри, діаметром 3мм. На 8-у добу діаметр некрозу становить 6 мм, а на 12-у - 8мм. Жодна тварина не загинула. Гнійно-некротичні вогнища підлягають зворотному розвитку через 16-18 діб після зараження.

Таким чином, позитивний ефект даної моделі полягає в тому, що вона відтворює розвиток локалізованої гнійно-некротичної протейної інфекції, яка спостерігається у клінічних умовах, дає достовірну клінічну картину захворюваності. При такому відтворенні протейної інфекції спостерігається розвиток пропонуваного локалізованого гнійно-некротичного процесу без генералізації процесу. Дану модель доцільно використовувати для оцінки дії антибактеріальних, імунних, та хіміотерапевтичних препаратів при протейній інфекції, яка є частим ускладненням після хірургічного втручання.