



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 46586

(13) A

(51) 6 G09B23/28

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВІДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ БАКТЕРОЇДНОГО АБСЦЕСУ

1

2

(21) 2001086018

(22) 30 08 2001

(24) 15 05 2002

(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р.

(72) Бебко Юрій Михайлович, Тишко Олександр
Григорович, Гоц Юрій Денисович(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ О О БОГОМОЛЬЦЯ

(57) Спосіб моделювання бактероїдного абсцесу шляхом підшкірного введення мишам капсульного варіанта культури бактероїдів групи фрагіліс в живильному напіврідкому агаровому середовищі, який відрізняється тим, що заздалегідь на 2-6 годин накладають джгут на голілку задньої лапки дослідної тварини, а інфект вводять в подушечку задньої лапки не раніш, ніж за 30 хвилин до зняття джгута в дозі 200-500 млн. мікробів

Винахід відноситься до експериментальної медицини, зокрема до розділу моделювання локалізованих анаеробних неклостридіальних патологічних процесів м'яких тканин, що може бути використане для вивчення імунологічної реактивності макроорганізму та особливостей патогенезу процесів, які спричинені анаеробними аспорогенними бактеріями

Відтворення локалізованої бактероїдної інфекції в інтактних тварин має значні труднощі. Наявні способи моделювання бактероїда-абсцесів мають низьку здатність до відтворення типового інфекційного процесу

Відомий спосіб моделювання абсцесу [1] шляхом введення суміші 4-х музейних штамів бактероїдів групи меланіногенікус на рідкому поживному середовищі в об'ємі 1,0 мл морським свинкам під лопатку підшкірно. Поряд з позитивними моментами цього способу /простота і відсутність генералізації інфекції/, слід відмітити, що інфекційний процес відтворюється примірно в 70% випадків /за даними авторів/. Крім того, через великий об'єм інокуляту, який вводять, часто виникають розривання шкіри, що приводить до контамінації абсцесу іншою мікрофлорою, що порушує чистоту моделі моноінфекції

Другий спосіб [2], обраний як прототип, здійснюється шляхом введення патогенетичного штаму бактероїдів групи фрагіліс /капсульний варіант/ мишам підшкірно внутріпахвинно вводять 0,5 мл напіврідкого поживного середовища, в якому є $2 \cdot 10^8$ добової культури бактероїдів. На 4-у добу після введення формується підшкірний абсцес діаметром 5 мм, який до 10-ї доби досягає 15 -

20 мм. Абсцеси виникають /за даними авторів/ у 80% випадків, в 10% випадків при маніпуляціях інфікування мишей, процес поширюється на черевну порожнину, що веде до генералізації інфекції і швидкої загибелі тварин. У 30% тварин, в яких сформувалися абсцеси на 4 - 5 добу абсцеси прориваються через шкіру у вогнище запалення і тоді проникають мікроорганізми з оточуючих ділянок шкіри. Отже запальний процес у вигляді бактероїдної моноінфекції має перебіг лише у 50% тварин

Задачею винаходу є підвищення відтворення абсцесу індукованого бактероїдами

Поставлена задача досягається тим, що при даному способі моделювання абсцесу заздалегідь на 2 - 6 годин накладають джгут на голілку задньої лапки дослідної тварини, а інфект вводять в подушечку задньої лапки не раніш ніж за 30 хвилин до зняття джгута в дозі 200 - 500 млн. мікробів

Компресійна ішемія кінцівки і введення бактероїдів в подушечку створює сприятливі умови для розвитку анаеробних бактерій в наслідок гіпоксії тканин, порушення мікроциркуляції крові і зниження окисно-відновного потенціалу тканин лапки, це забезпечує високе відтворення патологічного процесу

Створення компресійної ішемії лапки та введення в її подушечку при моделюванні бактероїдної локалізованої інфекції використано вперше. Порівняння способу, який заявляється зі способом-прототипом, де вводили бактероїди в інтактну пахвину, дозволяє зробити висновок про наявність критерію "новизна"

Відмінною ознакою способу, який заявляється, є також попереднє накладання жгута на голілку

(13) A

(11) 46586

(19) UA

задньої лапки тварини і введення бактероїдів є подушечку цієї лапки. Використання джгута з метою створення ішемії тканин для вивчення різних аспектів, як ішемії так і стану який її супроводжує.

Вивчення гістологічних препаратів показало, що в дослідній груп мишей не 5 добу виявляються ознаки запалення в м'яких тканинах кінцівок, де торгувалися абсцеси.

У сполучнотканинній основі шкіри відмічалось значне скупчення лейкоцитів (фиг 1/), не рідко виявлялись масивні інфільтрати, що вказувало на наявність активного запального процесу.

Ознакою розвитку інфекційного пронесу були і зміни в показниках стану неспецифічної резистентності. Виявлялись фазні зміни стану моноцитарно-фагоцитарної системи і системи комплементу після короточасного /2 - 4-а доба після інфікування/ знижувалась поглинальна і киснево залежна бактеріцидна активність фагоцитів периферійної крові, а на 5-у добу /виражена місцева реакція/ спостерігалось підвищення відсотку НСТ і середнього цитохімічного коефіцієнту. Паралельно збільшувалась гемолітична активність комплементу сироватки крові в основному за рахунок C_3 і C_6 компонентів. Починаючи з 12-ї доби /зворотний розвиток місцевої реакції/ наведені показники повертались до вихідного рівня.

В період максимального розвитку запалення наростали показники бласттрансформації.

Спосіб моделювання, який пропонується, здійснюється наступним чином: мишам на голілку задньої лапи накладають джгут з марлевою підкладкою. Через 2,5 години в подушечку цієї лапки вводять 0,05мл напіврідкого агаризованого живильного середовища, де є $0,2 - 0,5 \cdot 10^9$ мікробних клітин чотирьох добової капсульної культури бактероїдів виду фрагліс. Через півгодини після введення бактероїдів джгут знімається.

Запальний процес перебігає так: на кінець 1 - 2-х діб після введення бактерій розвивається виражена запальна реакція, що проявляється набряком і гіперемією, порушенням функції лапки. Під кінець 3 - 4-діб формується абсцес, набряк поширюється до коліна. Починаючи з 12 - 14 діб набряк і гіперемія поступово зменшуються і до 24-ї доби абсцес організується /інкапсулюється/, запальні явища проходять і функції кінцівки відновлюються.

З абсцесу виділяли бактероїда фрагліс до 14 годин. При бактеріологічному дослідженні внутрішніх органів /нирки, печінка, селезінка/ і крові ніяких бактерій не виявлено.

У досліджених тварин від 6 до 15 діб виявлялось достовірне збільшення підколієчних лімфовузлів на лапці де був сформований абсцес $/6,3 \pm 0,5$, $p0,05/$, а в інтактній лапці $/3,4 \pm 0,8/$. Починаючи з 12 - 14 доби в сироватці крові дослідних мишей виявлялись специфічні до використаних для інфікування бактерій антитіла які виявляли в реакції непрямой імуофлюоресценції. Також наростала кількість циркулюючих імунних комплексів /ЦІК/.

Аналогічні прояви імунологічних реакцій спостерігали і у хворих людей з локалізованими запальними процесами м'яких тканин, які спричинялись неклостридіальними анаеробними бактеріями. У цих людей такі зміни проявляються і в системах фагоцитозу і клітинної ланки імунітету, а збільшен-

ня ЦІК в сироватці відповідало важкості інфекційного процесу.

Отже, наведені результати морфологічного /гістологічного/, мікробіологічного і імунологічного досліджень вказують на розвиток запального процесу, що спричиняється бактероїдами.

Експозиція ішемізації лапки повинна бути від 2 до 6 годин. При зменшенні експозиції до 2 годин не виявляють достовірні ознаки змін запалення у лапці, а збільшення її більше 6 годин приводить до необоротних змін, з самоампутацією лапки наступної доби. Трьох годинна ішемізація лапки без введення бактероїдів спричиняє набряк зниження температури шкіри та її блідість. Ці явища проходять через 4 - 6 годин після зняття джгута.

У мишей, яким вводили бактероїди в подушечку лапки без попередньої її ішемізації, на 5-у добу ознаки запалення були ледве помітні. Відмічалось деяке збільшення кількості сполучнотканинних клітин на межі дерми і підшкірно-жирової клітковини /фиг 2/. Не виявлялась різниця і за масою регіонарних лімфовузлів інтактних і інфікованих лапок у цих тварин.

В групах тварин яким бактероїди вводили в інтактні тканини підшкірно в пахвину чи в подушечку лапки показники стану моноцитарно-фагоцитарної системи, системи комплементу, реакція бласт-трансформації лімфоцитів селезінки і кількість циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові достовірно не відрізнялись від показників контрольних тварин на протязі всього періоду спостереження /3 тижні/, за винятком короткотривалого підвищення поглинальної активності фагоцитів периферійної крові в перші дні після введення бактероїдів.

Мікробіологічні дослідження лапки в які вводили мишам бактероїди не виявили особливості активності інфекційного процесу /Приклад 1/.

Кількість інокуляту, який вводили, визначається максимальним об'ємом, який можна ввести в подушечку лапки миші.

Оптимальною дозою інфекту для відтворення абсцесу є $0,2 - 0,5 \cdot 10^9$ мікробів. При дозі більше $0,5 \cdot 10^9$ мікробів розвивається генералізована інфекція, що приводить до загибелі тварин /приклад 2/, а при введенні менше $0,2 \cdot 10^9$ бактероїдів хоча й виникають ознаки запалення, але абсцеси формуються лише в окремих випадках /приклад 3/.

ПРИКЛАД 1 Мишам лінії СВА вагою 18,5г /після обробки етанолом/ в подушечку правої задньої лапки /без попередньої ішемізації/ вводять 0,05мл напіврідкого агаризованого середовища, в якому було $0,6 \cdot 10^9$ мікробний клітин 4-добової капсульної культури бактероїдів фрагліс. Через 24 години у тварин з'являвся набряк і гіперемія лапки, миші залишались активними, поведінка їх не змінювалась. До третьої доби гіперемія шкіри лапки зберігалась, а набряк збільшувався. У окремих тварин було видно деякі порушення функції цих лапок. На наступні 4 - 6 діб прояви запалення зникли і функція лапок повільно відновлялась. На 7-у добу тварин забивали, маса підколієчних лімфовузлів як дослідних так і контрольних лапок була приблизно однакова $/2,5 - 3,5\text{мг}/$.

ПРИКЛАД 2 Миші лінії СВА масою 19,0г на голілку правої задньої лапки /на 4-х шарову мар-

леву підкладку/ накладали джгут. Через 2,5 години в подушечку цієї лапки вводили 0,05мл напіврідкого агарового поживного середовища, що містить $0,6 \cdot 10^9$ мікробів 4-х добової капсульної культури бактероїдів фрагліс. Через 0,5 годин після введення бактерій джгут знімали. Під кінець другої доби, проявляються ознаки запального процесу: пперемія, інфільтрація і набряк, які поширюються до колінного суглоба. Порушується функція лапки. Під кінець 4-ї доби формується абсцес у місці введення, який поширюється наступної доби на всю лапку, абсцес проривається через шкіру, миша тягнута уражена лапкою. На 5 - 6 добу розвивається гнійно-некротичне розпадання м'яких тканин лапки, мишки гинуть. При бактеріологічному дослідженні внутрішніх органів (нирки, печінка) виділяються бактероїди фрагліс.

ПРИКЛАД 3. Мишам лінії СВА масою 18,5 - 19,0г на праву задню лапку /на 4-шарову марлеву підкладку/ накладують джгут. Через 2,5 години в подушечку цієї лапки вводять 0,05мл напіврідкого агарового поживного середовища, що містить $0,15 \cdot 10^9$ мікробів 4-х добової капсульної культури бактероїдів фрагліс. Через 30 хвилин після введення бактероїдів джгут знімають. На другу добу спостерігається пперемія і набряк в нижній частині лапки. На третю добу пперемія зберігається, набряк збільшується, тварини активні, але проявляється порушення функції лапки. На протязі 5 - 7 діб всі утворені порушення зменшуються і на восьму добу все зникає, лапка має нормальний вигляд і функція її повністю відновлюється. Мишей вбивають, з подушки лапки мікроорганізми не виділяються, маса підколінних лімфатичних вузлів 3,0 - 3,2мг в обох лапках.

ПРИКЛАД 4. Миш лінії СВА масою 18,5 - 19,0г на праву задню лапку /на 4-х шарову марлеву підкладку/ накладують джгут. Через 2,5 години в подушечку цієї ж лапки вводять 0,05мл напіврідкого агарового поживного середовища, що вістить $0,3 \cdot 10^9$ клітин мікробів 4-х добової капсульної культури бактероїдів фрагліс. Через 30 хвилин джгут знімають. На кінець доби на інфікованій лапці з'являються ознаки пперемії і набряку, які продовжують збільшуватися, на 2 - 3 добу вони поширюються до колінного суглобу, функція лапки порушується, тварини кволять. На п'яту добу в нижній частині лапки під шкірою утворюється абсцес. На 14 - 15 добу запальний абсцес спадає, але лапка, залишається збільшеною, абсцес зберігається, з нього виділяються бактероїди. На 21 - 22 добу тварин вбивали, у них ще зберігається організований абсцес на нижній ділянці лапки. Контрольні бактеріологічні посіви куски тканин внутрішніх органів (нирки, печінка, селезінка) та крові дали негативні наслідки. Маса підколінних лімфовузлів правого /досліді/ - 6,8мг, лівого /контроль/ - 4,2мг.

Такий спосіб ми використовували на протязі 2-х років в експериментальних дослідженнях. Переверено цей спосіб на 140 мишах, а для контролю ми паралельно використовували модель без ішемізації при введенні бактероїдів в пахвину /спосіб-прототип/.

Наслідки власних досліджень наведені в таблиці, де група №1 це миші, яким після ішемізації вводили в подушечку лапки $0,15 \cdot 10^9$ клітин капсульних бактероїдів фрагліс в 0,05мл напіврідкого агарового середовища. II група - це доза бактероїдів була

Таблиця

Формування підшкірного абсцесу, спричинений введенням бактероїдів фрагліс

№ груп	Кількість тварин у групі	Кількість тварин, у яких сформувався абсцес		Кількість тварин, які загинули від генералізації		Кількість тварин з прориванням абсцесу		Кількість тварин, у яких абсцес зберігався до 10 діб	
		шт	%	шт	%	шт	%	шт	%
1	35	18	51,4	-	-	-	-	15	42,9
2	35	35	100,0	19	54,3	6	17,1	10	28,6
3	35	34	97,2	1	2,9	1	2,9	32	91,4
4	35	19	54,3	-	-	-	-	13	37,1
5	35	26	74,3	4	11,4	10	28,6	16	45,7
6	20	-	-	-	-	-	-	-	-

$0,6 \cdot 10^9$ мікробів, а III група - $0,3 \cdot 10^9$ мікробів, IV групі мишам вводили $0,6 \cdot 10^9$ бактероїдів в 0,05мл напіврідкого агарового середовища в подушечку задньої лапки але без попередньої ішемізації. V група - це спосіб-прототип, де $2 \cdot 10^9$ капсульної культури бактероїдів групи фрагліс вводили в 0,5мл напіврідкого поживного середовища підшкірно в пахвину. VI група контрольна, де мишам без попередньої ішемізації вводили в подушечку зад-

ньої лапки $0,6 \cdot 10^9$ бактероїдів убитих нагріванням в 0,05мл напіврідкого агара.

Наведені дані одержані в цих дослідках показують переваги способу, який заявляється, де відтворення становить 90% в порівнянні з 50% в способі-прототипі. Крім того, слід навести ще ряд переваг способу, який заявляється.

Локалізація запалення в подушечці лапки дозволяв візуально контролювати розвиток цього процесу в динаміці та оцінювати реакцію регіонар-

них вузлів

Спосіб, що заявляється забезпечує розвиток патологічного процесу, ближче наближається до перебігу патологічного процесу який спричиняється бактеріодами у людей. Зміни, які виникають в ішемізованих тканинах /порушення мікроциркуляції, зниження рівня кисню в тканинах, плексія, ацидоз і зниження окисно-відновного потенціалу/ приводить до зниження місцевої резистентності і створює умови для розвитку анаеробної неклостридіальної інфекції м'яких тканин. Це частіше спостерігається у хворих з порушеннями мікроциркуляції крові в кінцівках, травмах з розвитком плексії, оперативних втручаннях при використанні синтетичних протезів і ін.

Розвиток запального процесу у тварин перебігає важче ніж при використанні способу-прототипу, організація абсцесу настає на кінець 21 доби від

дня інфікування, а динаміка розвитку імунологічних реакцій корелює з аналогічними показниками хворих з локалізованими анаеробними неклостридіальними процесами м'яких тканин.

Відсутність проривів абсцесів через шкіру назовні та відсутність генералізованої інфекції і загибелі тварин під час маніпуляції з тваринами. Спосіб, який заявляється є більш економічним і забезпечує чистоту моделі моноінфекції в порівнянні з прототипом.

Використані джерела інформації

- 1 MacDonald J. B, Socransky S. S, Gibbone K. J. Pathogenesis of mixed anaerobic infections. J dent Res, Suppl 1 V 42, 1965, p 538 - 544
- 2 Walker C. B, Willcins T. D. Use of semisolid agar for intistion of pure *Bacteroides fragilis* infection in mice. Infection and Immunity, 1976, v 14, No 3, p 721 - 725



ФІГ. 1



ФІГ. 2

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 – 20 – 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 – 32 – 71