



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47934** (13) **U**
(51) МПК
G09B 23/28 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ РЕАКТИВНОГО ХРОНІЧНОГО ЗАПАЛЕННЯ ЯЄЧНИКІВ

1

2

(21) u200910222

(22) 08.10.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) ГРИЩЕНКО МИКОЛА ГРИГОРОВИЧ, КЛИМЕНКО МИКОЛА ОЛЕКСІЙОВИЧ, ТАТАРКО СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ

(73) ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб моделювання запалення, що включає внутрішньочеревинне введення дрібним тваринам л-карагінену в розчині хлориду натрію, який **відрізняється** тим, що реактивне хронічне запалення яєчників відтворюють на мишах шляхом введення л-карагінену в проекції яєчників.

Корисна модель відноситься до експериментальної медицини і може бути використаною в оцінці ефективності допоміжних репродуктивних технологій, які використовують для відновлення репродуктивних функцій.

За даними різних авторів у 35-60% пацієнток з порушенням репродуктивної функції трубно-перитонеальна безплідність обумовлена порушенням прохідності чи функціональною неспроможністю маткових труб. Основною причиною цих змін є хронічні запальні захворювання органів малого таза (ХЗЗОМТ), частота яких дотепер не має тенденції до зниження і, за даними різних авторів, складає до 60-80% у структурі гінекологічної патології.

Відносно низька ефективність методів відновлення природної фертильності, а також швидкий розвиток репродуктивної біології привели до того, що допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) останнім часом одержали поширення і все частіше використовуються для відновлення репродуктивної функції [Основи репродуктивної медицины: Практическое руководство / Под ред. профессора В.К. Чайки. - Донець: ООО «Альматео», 2001. - 618с; Грищенко В.И. Научные основы регулирования рождаемости. - К.: Здоров'я, 1988. - 150с].

В умовах широкого застосування ДРТ у клініці лікування безплідності проблема ХЗЗОМТ залишається актуальною незважаючи на те, що екст-

ракорпоральне запліднення дозволяє досягти настання вагітності навіть при відсутності у пацієнтки маткових труб. При цьому ефективність лікування трубно-перитонеальної безплідності при використанні ДРТ досягає 40-45% за один лікувальний цикл. Але навіть при відносно високій ефективності ДТР необхідно продовжувати пошук причин невдач. Проблема збільшення ефективності ДРТ при відновленні репродуктивної функції в пацієнток із трубно-перитонеальною безплідністю обумовлює необхідність проведення експериментальних і клінічних досліджень, які дозволять уточнити особливості відновлення репродуктивної функції при використанні ДРТ для лікування трубно-перитонеальної безплідності, причиною якої є ХЗЗОМТ.

При різноманітті існуючих способів моделювання запалень пошук моделей, максимально наближених до клінічних, продовжується.

Відомий спосіб моделювання гострого запального процесу придатків матки [Самородинова Л.А. Методика создания экспериментального инфекционного сальпингита // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. - 1966. - №2. - с.123-124.]. Під місцевою інфільтраційною анестезією 20-30мл 0,5% розчину новокаїну чистопорідним статевозрілим кролицям проводять нижньосерединну лапаротомію в асептичних умовах. Одну з маткових труб виводять у рану і обкладають стерильними серветками. Під

(13) **U**

(11) **47934**

(19) **UA**

ампулярний кінець труби поблизу фімбрій підводять кетгуттову лігатуру і перев'язують трубу в зазначеному відділі, другий кінець цієї ж лігатури проводять на відстані 0,2см від місця перев'язки труби, але не перев'язують. Стінку труби проколюють тонкою ін'єкційною голкою, яку потім просувають на 2см проксимально і вводять зі шприца 0,2мл добової культури золотавого стафілокока (штам 209). Після витягу голки вище місця проколу виконують перев'язку труби, попередньо накладеною лігатурою. Друга труба служить контролем. Черевну порожнину ушивають наглухо.

Відомий також спосіб моделювання асептичного хронічного запалення придатків матки [Тихоновская О. А. Моделирование острого и хронического воспаления придатков матки // Молодежь и научно-технический прогресс. - Тез. докл. - Томск, 1986. - с.76.]. В якості експериментальних тварин були обрані безпородні білі щури-самки масою 200-220г. Під інгаляційним масочним наркозом парами ефіру виконують лапаротомію, рога матки виводять і обкладають стерильними серветками. Тонкою ін'єкційною голкою проколюють матковий ріг у безпосередній близькості від яйцепроводу і просувають голку дистальніше. За допомогою інсулінового шприца по обидва боки в ріг матки в безпосередній близькості від яйцепроводу й в область яєчникової сумки вводять по 0,1мл 0,5% розчину карагеніну, що складається з комплексу фракцій сульфатированої галактози, виділеної з морських водоростей.

Відомий спосіб моделювання запальних захворювань жіночих статевих органів [Пат. №2142163 С1, RU, МПК: G09B23/28, Старкова Е.В., Дергачева Т.Н., Асташов В.В. Способ моделирования воспалительных заболеваний женских половых органов. Опубл. 27.11.1999]. Для моделювання використовують білих безпородних щурів. Здійснюють введення *Staphylococcus aureus* у дозі 3106 мікробних тіл. Введення виконують у задньо-бокову стінку середньої третини піхви туберкуліновим шприцом під слизову оболонку. Спосіб дозволяє створити модель з найбільш повним наближенням до клінічного плину патологічного процесу у жінок.

Відомий спосіб моделювання хронічного запалення придатків матки шляхом проведення у білих безпородних статево-зрілих щурів-самок нижньосередньої лапаротомії [Пат. №2224297 С1, RU, МПК: G09B23/28, Тихоновская О.А., Невоструев С.А., Логвинов СВ. Способ моделирования хронического воспаления придатков матки. Опубл. 20.02.2004]. Лапаротомний розріз виконують довжиною 1,5-2см, вводять добову культуру золотавого стафілокока, штам 209 у дозі 0,1мл, що містить 50млн мікробних тіл, безпосередньо в яйцепроводи, одномоментно десерозують у 8-10 точках вісцеральну очеревину яйцепроводів і покривний епітелій яєчників медичним скарифікатором, після чого розпорошують над десерозированими ділянками медичний тальк у дозі 0,1мг/см², операційну рану поширено ушивають окремими кетгуттовими швами, тварин виводять з експерименту на 30-40-у добу шляхом декапітації під інгаляційним наркозом парами ефіру. Дана корисна модель спрямо-

ваний на наближення експериментальної моделі до клінічного і морфологічного плину хронічного запалення придатків матки у жінок.

Крім того, відомий спосіб моделювання запальних захворювань верхніх відділів жіночих статевих органів [Пат. №2279142 С1, RU, МПК: G09B23/28, Горяева Н.А., Беда Ю.В., Пермякова А.Н. и др. Способ моделирования воспалительных заболеваний верхних отделов женских половых органов. Опубл. 27.06.2006]. Білим безпородним щурам-самкам вводять у парацервікальну клітковину в області перешийки матки під наркозом флогенні агенти - *Staphylococcus aureus* і/чи *Escherichia coli* у дозі 3106 мікробних тіл.

Відомий також спосіб моделювання запалення шляхом внутрішньочеревинного введення щурам 5 мг λ-карагеніну ("Sigma", США) в 1мл 0,9% розчину хлориду натрію (Клименко Н.А. Роль лейкоцитів в реакції тучних кліток очага запалення // Бюллетень експериментальної біології і медицини. - 1993. - Т.116, №9. - с.249-253). Модель сприяє одержанню достовірної картини запального процесу.

Даний спосіб моделювання запалення є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутим, тому його обрано за прототип.

Недоліком способу-прототипу є те, що внутрішньочеревинне введення не дозволяє в повній мірі відтворити клінічний перебіг патологічного процесу статевих органів у жінок. Крім того, модель використовує в якості лабораторних тварин щурів, у той час як більш кращою моделлю для відтворення в наступному процесів, що супроводжують екстракорпоральне запліднення, є миші.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладено задачу підвищення ефективності моделювання реактивного хронічного запалення яєчників.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі моделювання запалення, що включає внутрішньочеревинне введення дрібним тваринам λ-карагеніну в розчині хлориду натрію, згідно з корисною моделлю, реактивне хронічне запалення яєчників відтворюють на мишах шляхом введення λ-карагеніну в проекції яєчників.

Технічний ефект корисної моделі, а саме підвищення ефективності моделювання реактивного хронічного запалення яєчників, обумовлений тим, що для моделі використовують мишей, які є загально визнаним інструментом тестування якості лабораторного устаткування і середовищ культивування, які застосовуються у лабораторіях ДРТ (Quinn P, Horstman FC. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo in vitro? // Hum Reprod. - 1998. - Vol.13 (4). - P.173-183.). Крім того, внутрішньочеревинне введення λ-карагеніну в проекції яєчників дозволяє створити модель з найбільш повним наближенням до клінічного плину хронічного запалення яєчників у жінок.

Ефективність моделі доведена експериментально.

Досліди поставлені на 42 мишах-самках лінії BALB/c масою 18-20г. Тваринам внутрішньочеревинно в проекції яєчників вводили 1мг λ -карагінену ("Sigma", США) у 0,5мл ізотонічного розчину хлориду натрію.

У виведених з експерименту тварин забирали яєчники з прилеглими пасмами сальника. Отриманий матеріал фіксували в 10% водяному розчині нейтрального формаліну. По закінченні спиртової проводки матеріал піддавали парафіновій проводці, після чого виготовляли серійні зрізи товщиною $4-5 \times 10^{-6}$ м. Оглядові препарати, пофарбовані гематоксиліном і еозином, використовували для загальної оцінки стану досліджуваних тканин і морфометричного дослідження. Фарбування препаратів фукселеном на еластичні волокна за Вейгертом з дофарбовуванням пікрофусином за методом Ван Гізон використовували для виявлення і диференціювання сполучнотканинних структур. Гістологічні методики виконували по прописах, викладених у посібниках з гістологічної техніки і гістохімії [Микроскопическая техника: руководство / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. - М.: Медицина, 1996. - 544с].

Вивчення мікропрепаратів проводили на мікроскопі "Olympus" BX-41 (Японія) з наступним мікроскопічним фотографуванням.

Кількісну морфометричну оцінку клітинного складу запального інфільтрату проводили за допомогою комп'ютерного цитоаналізатора "Olympus", окуляра-мікрометра AM9-2. При збільшенні $\times 400$ на поверхню зображення гістологічних препаратів накладали сітку, що має рівновіддалені точки (у нашому дослідженні використовувалася сітка Автанділова із 100 точок) і виконували диференційований підрахунок точок, що приходяться на ту чи іншу клітинну форму. Визначали кількість різних клітинних елементів запального інфільтрату: фібробластів (Фб), фіброцитів (Фц), макрофагів

(М), лімфоцитів (Л), еозинофілів (Е), нейтрофільних гранулоцитів (НГ), плазматичних клітин (П), епітеліоїдних клітин (Еп).

Перед забоем тварин із хвостової вени одержували периферичну кров і визначали загальну кількість лейкоцитів (ЗКЛ) у крові і лейкоцитарну формулу стандартними методами [Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. - М.: Медицина, 1987. - 368с].

Результати досліджень обробляли методом варіаційної статистики на персональному комп'ютері з використанням стандартних програм кореляційного аналізу, з обчисленням середніх арифметичних величин: M , m , σ за допомогою електронних таблиць "Excel-5".

Було встановлено, що в динаміці запалення, викликаного внутрішньочеревинним введенням карагінену, відбуваються помітні реактивні запальні зміни на поверхні яєчників, у товщі тканини яєчників і в навколишніх тканинах яєчника. У першу добу розвертається нейтрофільна фаза запалення, а, починаючи з 3-ї доби, вона змінюється нейтрофільно-макрофагальною фазою. Тривалість фази ексудації невелика, розлади мікроциркуляції і нейтрофільної інфільтрації нетривалі і помірковано виражені. З 7-ї доби і до 28-ї доби на тлі прогресуючого зменшення нейтрофільних гранулоцитів збільшується кількість макрофагів, лімфоцитів і плазмоцитів. Починаючи з 14 доби і до завершення експерименту, має місце формування хронічного продуктивного запалення, як у білочній оболонці, поверхневих відділах коркового шару яєчника, так і в прилеглому сальнику. На 28 добу визначається слабо виражений склероз білочної оболонки, що підтверджується збільшенням кількості фіброцитів у складі клітинних кооперацій (табл.1).

Таблиця 1

Клітинний склад вогнища хронічного запалення в яєчниках ($M \pm m$, $n=6$)

Строки дослідження	Фб	Фц	М	Л	Е	НГ	П	Еп
Контроль	7,2 \pm 0,63	43,05 \pm 0,39	14,15 \pm 0,41	14,45 \pm 0,29	4,75 \pm 0,64	12,7 \pm 0,53	2,3 \pm 0,36	1,25 \pm 0,21
1 доба	7 \pm 0,34	16,1 \pm 0,48***	26,9 \pm 0,64***	9,15 \pm 0,53***	2,9 \pm 0,43*	36,05 \pm 0,58***	1,05 \pm 0,36*	1,6 \pm 0,28
3 доба	1,2 \pm 0,36***	5,05 \pm 0,39***	23,05 \pm 0,44***	10 \pm 0,43***	3,1 \pm 0,33*	58,2 \pm 0,36***	0	0
7 доба	4,15 \pm 0,41**	10,95 \pm 0,42***	45,1 \pm 0,4***	11,9 \pm 0,4***	1,15 \pm 0,38***	25,95 \pm 0,44***	1,35 \pm 0,38	0
14 доба	3,95 \pm 0,42**	15,85 \pm 0,55***	32,8 \pm 0,42***	26,05 \pm 0,42***	3,05 \pm 0,42	11,85 \pm 0,4	3,65 \pm 0,4*	3,05 \pm 0,39**
21 доба	4,95 \pm 0,39*	10,85 \pm 0,41***	28,95 \pm 0,44***	34,65 \pm 0,31***	1,1 \pm 0,37***	14,8 \pm 0,33**	5 \pm 0,4***	0
28 доба	4,95 \pm 0,39*	14,85 \pm 0,35***	26,95 \pm 0,39***	34 \pm 0,37***	5,1 \pm 0,37	7,05 \pm 0,42***	7,1 \pm 0,37***	0

Примітка: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$ достовірна відмінність від контролю (інтактні миші).

У периферичній крові ЗКЛ трохи збільшується на 1-у добу запалення і вірогідно - на 7-у-28-у добу із двома максимумами - на 14-у і 28-у добу. При цьому вміст сегментоядерних нейтрофілів вірогідно збільшується на 1-у-14-у добу з максимумом на 14-у, а паличкоядерних - на 3-ю і 7-у добу. Зростає

також кількість еозинофілів (на 21-у добу). Кількість моноцитів підвищена з 1-ї по 28-у добу з піком на 28-у. Вміст лімфоцитів після деякого зниження на 1-у-3-ю добу потім відновлюється і фазово збільшується - на 14-у і 28-у добу (табл. 2).

Таблиця 2

Лейкоцити периферичної крові ($\times 10^9/\text{л}$) мишей в динаміці хронічного карагіненового запалення ($M \pm m$, $n=6$)

Строки дослідження	ЗКЛ	Е	Нейтрофіли		Л	Моноцити
			паличкоядерні	сегментоядерні		
Контроль	2,73 \pm 0,25	0,028 \pm 0,009	0,042 \pm 0,016	0,236 \pm 0,03	2,279 \pm 0,249	0,148 \pm 0,02
1 доба	3,325 \pm 0,41	0,04 \pm 0,013	0,056 \pm 0,019	0,58 \pm 0,10**	2,316 \pm 0,319	0,334 \pm 0,056**
3 доба	2,89 \pm 0,26	0,048 \pm 0,012	0,115 \pm 0,029*	0,673 \pm 0,092***	1,69 \pm 0,215	0,366 \pm 0,058**
7 доба	4,12 \pm 0,23**	0,043 \pm 0,012	0,134 \pm 0,029*	0,678 \pm 0,077***	2,932 \pm 0,216	0,411 \pm 0,027***
14 доба	5,12 \pm 0,64**	0,0515 \pm 0,018	0,096 \pm 0,025	0,863 \pm 0,196**	3,661 \pm 0,478*	0,429 \pm 0,061**
21 доба	3,94 \pm 0,32*	0,092 \pm 0,015**	0,077 \pm 0,026	0,327 \pm 0,049	2,696 \pm 0,274	0,765 \pm 0,077***
28 доба	5,10 \pm 0,48***	0,049 \pm 0,012	0,091 \pm 0,025	0,464 \pm 0,12	3,625 \pm 0,355**	1,039 \pm 0,148***

Примітка: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$ достовірна відмінність від контролю (інтактні миші).