

УДК 616.2:316-092.9:579.861.2

ЛАБОРАТОРНА МОДЕЛЬ ХРОНІЧНОГО СТАФІЛОКОКОВОГО ТОНЗИЛИТУ

Скляр Н.І.¹, Калініченко С.В.¹, Рижкова Т.А.¹,
Бабич Є.М.¹, Журавльов А.С.², Мані Ханс²,
Ждамарова Л.А.¹, Шкодовська Н.Ю.¹, Балак О.К.
1 – ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім.
І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України»
2 – Харківський національний медичний уні-
верситет

Хронічним тонзилітам (ХТ) належить одне з провідних місць в структурі загальної ЛОР-захворюваності. За даними літератури, від 2 до 15% усього населення хворіє на хронічний тонзиліт [1-5]. В Україні показник захворюваності на ХТ сягає 1260 на 10 тис. населення [1]. Згідно зі статистичними даними впродовж останніх 8-10 років кількість хворих на ХТ збільшується, оскільки приблизно 75% дітей, що страждали на ХТ, продовжують хворіти й у дорослому віці. Хронічний тонзиліт небезпечний метатонзиллярними ускладненнями з боку різних органів і систем, які в умовах зростаючої захворюваності призводять до ранньої інвалідації працездатного населення, таким чином зумовлюючи велику актуальність і соціальну значущість тонзиллярної проблеми, що привертає увагу не тільки отоларингологів, а й інфекціоністів, педіатрів, терапевтів, ревматологів, імунологів і мікробіологів. Труднощі в лікуванні ХТ обумовлені різноманітним етіопатогенетичним механізмом його розвитку, тому одним з актуальних питань практичної медицини є оптимізація лікування ХТ у стадії загострення, що потребує від науковців розробки адекватної та відтворюваної моделі даної патології для тестування різноманітних способів та засобів лікування ХТ в експериментальних умовах.

Домінуючим бактеріальним чинником хронічного тонзиліту найчастіше є золотистий стафілокок. У різних країнах світу для моделювання гнійно-запальних процесів, зокрема ендодальміту, остеомиєліту, ендокардиту тощо широко використовується референс-штам *Staphylococcus aureus* 209 P (ATCC 6538-P), оскільки він володіє сталими біологічними властивостями та є доступним для одержання [2-5].

Метою роботи стала розробка лабораторної моделі хронічного стафілококового тонзиліту.

Матеріали та методи

Для відтворення моделі хронічного стафілококового тонзиліту було використано референс-штам *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P), отриманий з Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН». Суспензію стафілококу готували відповідно до стандарту каламутності по шкалі McFarland за

допомогою приладу Densi-La-Meter (Lachema, Чехія) і доводили до оптичної щільності 1,0 та 3,0 одиниці по шкалі McFarland згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ.

Синхронізацію культур проводили за допомогою дії низької температури [6].

Об'єктом дослідження були кролі породи «Шиншила», вагою 2,5-3,0 кг. Тварини були розділені на чотири групи й забезпечені відповідним приміщенням, середовищем існування, мінімальною свободою пересування, їжею, водою та доглядом, що відповідають вимогам стану здоров'я та умовам утримання тварин. По закінченні досліду евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом. Утримання та всі маніпуляції (розрахунок анестезуючих засобів, введення загального наркозу, застосування роторозширюючого і фіксуєчого інструменту, евтаназія) з тваринами проводились компетентною особою згідно нормативних документів [7-10].

Кролів I групи (n=10) інфікували одноразово у парамигдаликову клітковину та область верхнього полюсу піднебінних мигдаликів 0,1 мл зависі добової культури штаму *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P) щільністю 1,0 од. за шкалою McFarland; II групу (n=10) кролів інфікували аналогічно I групі, однак, за добу до інфікування, сенсibiliзували одноразово підшкірно (область стегна) 0,1 мл зависі вбитих нагріванням (1 година при 80 °C) клітин штаму *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland; III групу тварин було сенсibiliзовано та інфіковано аналогічно II групі та через 10 діб проведено повторне інфікування 0,1 мл зависі добової культури штаму *S. aureus* 209 P (ATCC 6538-P) щільністю 3,0 од. за шкалою McFarland; IV група (n=5) – інтактні кролі.

Термін спостереження становив 28-30 діб. На 7, 14, 21 та 28 добу з поверхні мигдаликів дослідних тварин стерильними одноразовими тампонами відбирали матеріал для оцінки ступеню заселення мигдаликів золотистим стафілококом.

Концентрацію мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) у кількості посівного матеріалу з урахуванням розведення за формулою:

$$X = \frac{10NM}{m},$$

де X – число КУО,
10 – постійний коефіцієнт при посіві 0,1 мл суспензії,

N – кількість колоній,

M – розведення (в 10, 100, 1000 рази тощо),

m – кількість посівного матеріалу.

Отримані показники виражали в десяткових логарифмах (lg КУО/мл).

Патоморфологічні дослідження тканин мигдаликів проведені на базі Харківського національного медичного університету.

Результати та обговорення

Всі тварини попередньо були обстежені на носійство золотистого стафілококу. Доза для інфікування та кратність введення підбирались експериментальним шляхом таким чином, щоб забезпечити у кролів нульовий показник летальності та відсутність септичного стану при мінімальній кількості тварин, у яких хронічний тонзиліт не розвивався

внаслідок локалізації процесу та виникнення гострого гнійно-запального процесу.

У тварин I-III груп на наступну добу після введення культури стафілококу відмічалось погіршення загального стану (відсутність апетиту, зниження рухливості тощо) тоді як кролі IV групи були активними продовж всього дослідження.

Експериментально визначено, що у тварин I групи на 7-му добу спостерігались клінічні ознаки гострого тонзиліту (збільшення, почервоніння й набряк парамигдаликової клітковини та тканин мигдаликів), які підтверджувались мікробіологічними показниками: ступінь заселення поверхні мигдаликів дослідних тварин золотистим стафілококом був $(8,2 \pm 0,1)$ lg КУО/мл (табл. 1).

Таблиця 1. - Результати мікробіологічних досліджень на золотистий стафілокок поверхні мигдаликів дослідних тварин

Група тварин	Ступінь заселення поверхні мигдаликів дослідних тварин золотистим стафілококом (lg КУО/мл) у дні спостереження, (M±m)			
	7 діб	14 діб	21 доба	28 діб
I група	8,2±0,1	3,0±0,5	не виділялись	не виділялись
II група	6,1±0,7	5,0±0,4	3,0±0,2	не виділялись
III група	7,4±0,3	6,0±0,8	6,1±0,5	5,0±0,3
IV група	не виділялись	не виділялись	не виділялись	не виділялись

На 14-ту добу у I групи тварин клінічні ознаки гострого тонзиліту зникали, кількість золотистого стафілокока зменшувалась в 2,3-3,3 рази ($p < 0,001$) порівняно з відповідними показниками на 7-му добу спостереження. Елімінація *S. aureus 209 P* (ATCC 6538-P) відбувалась на 21-шу добу спостереження.

Відомо, що для отримання хронізації гнійно-запального процесу потрібно створити відповідні умови зниження місцевого та системного імунітету [11-13].

Зниження імунореактивності проводили шляхом попередньої сенсibilізації організму лабораторних тварин до інфекційного агенту. Дослідження довели, що у тварин II групи на 7-му добу спостереження також визначались клінічні ознаки гострого тонзиліту. Проте, ступінь заселення поверхні мигдаликів *S. aureus 209 P* (ATCC 6538-P) був нижчим, у порівнянні з відповідними показниками I групи, в 1,2-1,5 рази ($p < 0,01$). На 28-му добу спостереження золотистий стафілокок не виділявся з поверхні мигдаликів в жодній піддослідній тварині.

Для моделювання хронічного гнійно-запального процесу тваринам III групи, крім сенсibilізації до інфекційного агенту, було проведено повторне інфікування. Встановлено, що у кролів III групи на 7-му добу спостереження були клінічні ознаки гострого тонзиліту, які поступово згасали. При повторному інфікуванні більшою дозою

збудника спостерігалось загострення процесу з утворенням в мигдаликах казеозно-гнійних пробок, яке супроводжувалось появою рубцевих спайок між мигдаликами та піднебінними дужками. При цьому отримані мікробіологічні показники свідчили про етіологічну значущість золотистого стафілококу в розвитку запального процесу: ступінь заселення поверхні мигдаликів золотистим стафілококом склав на 14 і 21 доби спостереження відповідно $(6,0 \pm 0,8)$ та $(6,1 \pm 0,5)$ lg КУО/мл. Через 28 діб щільність заселення поверхні мигдаликів *S. aureus 209 P* (ATCC 6538-P) зменшувалась, але залишалась досить високою. Тобто розвивалась картина хронічного інфекційного процесу стафілокової етіології [13].

Результати патоморфологічних досліджень через 28 діб спостереження тварин I, II та IV груп не виявили ознак пошкодження та запалення тканин мигдаликів: лімфоїдна тканина піднебінних мигдаликів займала лише невелику частину тканини у ділянці відповідно локалізації, інша тканина – пухка сполучна. Виявлена лише одна крипта, вкрита багаточаровим епітелієм з частковим руйнуванням поверхневого шару. Лімфоїдні фолікули піднебінних мигдаликів багатоклітинні, великі. Тимус та селезінка без патологічних змін.

У кролів III групи виявлена проліферація лакуарного епітелію, інфільтрація його нейтрофілами, макрофагами, лімфоцитами з формуванням лаку-

нарної пробки. Місцями, у субепітеліальному просторі, визначалась інволюція лімфоїдних фолікулів та розростання сполучної тканини. У селезінці спостерігалась гістологічна картина активації білої пульпи, у тимусі – початкова стадія антигенної трансформації. Вищевказані ознаки мали місце у 100 % тварин III групи, що свідчить про відтворюваність розробленої моделі хронічного тонзиліту.

Таким чином, запропонована модель хронічного стафілококового тонзиліту надасть можливість для вивчення й розробки нових препаратів для профілактики та лікування отоларингічних захворювань [14].

Висновок

Розроблено відтворювану лабораторну модель хронічного стафілококового тонзиліту, що може бути використано для вирішення актуальних завдань практичної медицини (тестування різноманітних способів та засобів лікування та попередження ХТ).

References

1. Mitin, Yu. V. Chronic tonsillitis: modern state of problem and the ways of a solution to the problem [Text] / Yu. V. Mitin, Yu. V. Shevchuk // Clinical immunology. Allergology. Infectology. – 2007. – № 3 [Electronic resource] Access mode : <http://kiai.com.ua/article/98.html>
2. Kane, A. Penetration of Ocular Tissues and Fluids by Moxalactam in Rabbits with Staphylococcal Endophthalmitis [Electronic resource] / A. Kane, M. Barza, J. Baum. // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1981. – Vol. 20, №5. – P. 595-599. Access mode <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181758/pdf/aac00011-0039.pdf>
3. Fedunenکو, V. V. Experimental justification of combined application of biologically active polymorphous hydrogel and dynamotherapy in corneal ulcer treatment [Text] / V. V. Fedunenکو / Author's abstract of dissertation. candidate of medical science. 14.00.08 – eye diseases. – M., 2007. – 24 p.
4. O'Reilly, T. Rat model of bacterial osteomyelitis of the tibia [Text] / O'Reilly T., Mader J. T. // O. Zak, M. A. Sande (ed.) Handbook of animal models of infection, experimental model in antimicrobial chemotherapy. – Academic Press.: San Diego, Calif. Academic Press; 1st edition, 1999. – P. 560-575.
5. Andes, D. R. Pharmacodynamics of fluoroquinolones in experimental models of endocarditis [Electronic resource] / D. R. Andes, W. A. Craig // Clin Infect Dis. – 1998. – Vol.27, №1. – P. 47-50. Access mode <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675448>.
6. Basnakjan, I.A. Cultivation of microorganisms with specified properties [Text] / Basnakjan I.A.. – M.: Medicine, 1992. – P. 29-59.
7. SST 421-88. Laboratory animals. Process of keeping of main regulations of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes [Text] ; put in force. 1986-03-18. – K. : State consumer standard of Ukraine, 1986.
8. Directive of EU № 609 [Text] ; put in force 1986-11-24
9. The order of MOH of Ukraine № 281, 01.11.2001. [Electronic resource] Access mode : <http://www.moz.gov.ua/ua/portal/?title=%B9281+%E2%B3%E4+2001>
10. The order of MOH of Ukraine № 66, 13.02.2006 p. About affirmation of the procedure for drugs clinical trials and examination of clinical trials' data and of standard position about bioethics committee [Electronic resource] Access mode : <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/z0355-08>
11. Jakovenko, V. D. The new method for chronic tonsillitis modeling [Text] / V. D. Jakovenko, I. L. Dikij, E. M. Dikaja, Z. I. Kashevarova // The new method for ear, nose and throat diseases diagnostic and treatment : Collected theses of Kharkov medical institute. – Kharkov-KhMI, 1987. – P. 33-36.
12. Kiselev, R. I. The role of viral and bacterial association (mycoplasmal) in etiopathogenesis. Second report. To the question about experimental model of chronic tonsillitis creation / R. I Kiselev, N. I. Gladkij, E. F. Teslenko-Ponomarenko // Actual questions of rheumatism and hypertension treatment and prevention. Collected theses of Ukrainian institute of advanced medical studies. – Kharkov, 1971. – P. 60-63.
13. Pat. 2180973 RU, MPC G09B23/28 The method for chronic tonsillitis modeling [Text] / Golovnev A. V., Dergachev V. S., Golovnev V. A., Gorchakov V. N. ; applicant Research institute of clinical and experimental lymphology of RAMS ; assignee Research institute of clinical and experimental lymphology of RAMS. - № 2000118386/14 ; Appl. 10.07.2000 ; Publ. 27.03.2002.
14. Pat. 70957 UA, MPC G09B 23/28 (2006.01) The method for chronic tonsillitis model obtaining [Text] / Zhuravlev A. S., Mani Hans, Sklyar N. I., Kalinichenko S. V. ; appl. 03.01.2012 ; publ. 25.06.2012, Bul. № 12, 2012.

УДК 616.2:316-092.9:579.861.2

ЛАБОРАТОРНА МОДЕЛЬ ХРОНІЧНОГО СТАФІЛОКОКОВОГО ТОНЗИЛІТУ

Скляр Н.І., Калініченко С.В., Рижкова Т.А.,
Бабич Є.М., Журавльов А.С., Мані Ханс,
Ждмарова Л.А., Шкодовська Н.Ю., Балак О.К.

Вивчення й розробка нових препаратів для лікування та попередження хронічного тонзиліту (ХТ) потребує використання відповідної лабораторної моделі. Для розробки лабораторної моделі ХТ було відтворено хронічний гнійно-запальний процес на кролях породи «Шиншила» з використанням референс-штаму *Staphylococcus aureus* 209 P (ATCC

6538-Р). Попередня сенсibilізація тварин ін-активованим етіологічним чинником й повторне інфікування більшою дозою збудника дозволили розробити відтворювану лабораторну модель ХТ стафілококкового генезу. Адекватність процесу розвитку хронічного тонзиліту підтверджено результатами мікробіологічних та патоморфологічних досліджень. Запропонована лабораторна модель може бути використана для вирішення актуальних завдань як практичної так й експериментальної медицини та фармакології.

Ключові слова: лабораторна модель, стафілокок, хронічний тонзиліт.

УДК 616.2:316-092.9:579.861.2

ЛАБОРАТОРНАЯ МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО СТАФИЛОКОККОВОГО ТОНЗИЛЛИТА

Скляр Н.И., Калинин С.В., Рыжкова Т.А., Бабич Е.М., Журавлев А.С., Мани Ханс, Ждамарова Л.А., Шкодовская Н.Ю., Балак А.К.

Изучение и разработка новых препаратов для лечения и предупреждения хронического тонзиллита (ХТ) требует использования соответствующей лабораторной модели. Для разработки лабораторной модели ХТ был воспроизведен хронический гнойно-воспалительный процесс у кроликов породы «Шиншилла» с использованием референс-штамма *Staphylococcus aureus* 209 P (ATCC 6538-P). Предварительная сенсibilізація животных инактивированным возбудителем и повторное инфицирование используемым референс-штаммом позволили создать воспроизводимую лабораторную модель ХТ стафилококковой этиологии. Адекватность процесса

развития хронического тонзиллита подтверждена результатами микробиологических и патоморфологических исследований. Предложенная лабораторная модель может использоваться для решения актуальных задач как практической так и теоретической медицины и фармакологии.

Ключевые слова: лабораторная модель, стафилококк, хронический тонзиллит.

UDC 616.2:316-092.9:579.861.2

LABORATORY MODEL OF CHRONIC STAPHYLOCOCCAL TONSILLITIS

Sklyar N.I., Kalinichenko S.V., Ryzhkova T.A., Babych E.M., Zhyravlev A.S., Mani Hans, Zhdamarova L.A., Shkodovska N.Yu., Balak A.K.

Investigation and development of new preparations for chronic tonsillitis (CT) treatment and prevention requires application of appropriate laboratory model. For the development of CT laboratory model chronic pyoinflammatory process was reproduced in chinchilla rabbits using *Staphylococcus aureus* 209 P (ATCC 6538-P) reference-strain. Preliminary sensitizing of animals with inactivated causative agent and repeated infection with the reference-strain made it possible to work out reproducible model of chronic tonsillitis. Adequacy of chronic tonsillitis development was confirmed by the results of microbiological and pathomorphological researchers. The proposed laboratory model can be used for solving of theoretical and practical medicine and pharmacology topical problems.

Key words: laboratory model, staphylococcus, chronic tonsillitis.