

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СПОСОБА МОДЕЛИРОВАНИЯ АНТИБИОТИКО-АССОЦИИРОВАННОГО КОЛИТА У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE METHOD OF MODELING ANTIBIOTIC-ASSOCIATED COLITIS IN LABORATORY ANIMALS

**M. Polidanov
S. Kapralov
V. Masliakov
K. Volkov
R. Petrunkin
A. Kashikhin**

Summary. The aim of the study is to develop a reliable and reproducible method of modeling antibiotic-associated colitis in laboratory animals to study the mechanisms of development of this disease, evaluate the effectiveness of potential therapeutic interventions, and search for new approaches to treatment and prevention. *Materials and Methods.* The study was carried out on 24 female laboratory rats of «Standard» breed weighing 200 ± 50 g. The animals were given general anesthesia 30 minutes before the experiment. For modeling of antibiotic-associated colitis a solution of a broad-spectrum antibiotic (Amoxiclav, dose 2 ml/g, due to many complications of this group of antibiotics on the gastrointestinal tract system) was used, which was injected into the rectum through the anus. *Results.* It was found that the development of antibiotic-associated colitis obtained using the developed method in all experimental animals was identical in damage to the mucous membrane of the rectum. The claimed method is simple enough, reproducible in carrying out, does not require carrying out in the conditions of specially equipped premises. *Conclusions.* Thus, the obtained experimental data confirm that the developed method allows by introducing a solution of a broad-spectrum antibiotic (Amoxiclav 2 ml/g) into the wall of the rectum and its lumen through the anus to provoke the development of antibiotic-associated colitis, which is very relevant at present and determines the prospects of its wide use for research purposes.

Keywords: antibiotic-associated colitis, *Clostridium difficile* culture, experimental modelling, female rats.

Полиданов Максим Андреевич

специалист научно-исследовательского отдела,
Университет «Реавиз», г. Санкт-Петербург
maksim.polidanoff@yandex.ru

Капралов Сергей Владимирович

доктор медицинских наук, доцент,
Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского
sergejkapralov@yandex.ru

Масляков Владимир Владимирович

доктор медицинских наук, профессор,
Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского;
доктор медицинских наук, профессор,
Университет «Реавиз»
maslyakov@inbox.ru

Волков Кирилл Андреевич

ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский
университет им. В.И. Разумовского»

Петрунькин Родион Павлович

Университет «Реавиз», г. Санкт-Петербург

Кашихин Андрей Андреевич

Университет «Реавиз», г. Санкт-Петербург

Аннотация. Целью исследования является разработка надежного и воспроизводимого способа моделирования антибиотико-ассоциированного колита у лабораторных животных для изучения механизмов развития этого заболевания, оценки эффективности потенциальных терапевтических вмешательств и поиска новых подходов к лечению и профилактике. *Материалы и методы.* Исследование проводилось на 24 лабораторных крысах-самках породы «Стандарт» массой 200 ± 50 г. За 30 минут до эксперимента животным проводили общую анестезию. Для моделирования антибиотико-ассоциированного колита использовали раствор антибиотика широкого спектра действия (Амоксиклав, доза 2 мл/г, ввиду большого количества осложнений данной группы антибиотиков на систему желудочно-кишечного тракта), который вводили в прямую кишку через анальное отверстие. *Результаты.* Было установлено, что развитие антибиотико-ассоциированного колита полученного с использованием разработанного способа, у всех подопытных животных было идентично по характеру повреждений слизистой оболочки прямой кишки. Заявляемый способ достаточно прост, воспроизводим в проведении, не требует проведения в условиях специально оборудованных помещениях. *Выводы.* Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают, что разработанный способ позволяет путем введения раствора антибиотика широкого спектра действия (Амоксиклав 2 мл/г) в стенку прямой кишки и ее просвета через анальное отверстие спровоцировать развитие антибиотико-ассоциированного колита, что весьма актуально в настоящее время и определяет перспективы его широкого использования в исследовательских целях.

Ключевые слова: антибиотико-ассоциированный колит, культура *Clostridium difficile*, экспериментальное моделирование, самки-крысы.

Введение

Антибиотико-ассоциированный колит — это воспалительное заболевание кишечника, которое возникает в результате нарушения баланса микрофлоры после приёма антибиотиков и может привести к серьёзным осложнениям. Получение модели язвенного колита представляет интерес не только для экспериментальной медицины, но и для практического здравоохранения, поскольку в настоящее время отмечается рост воспалительных заболеваний кишечника [1].

Известен способ моделирования язвенного колита крысам-самцам линии «Wistar» [2]. Для выполнения метода осуществляют ишемизацию стенки толстой кишки: выделяют, перевязывают и пересекают прямые ветви левой артерии толстой кишки и краниальную прямокишечную артерию на участке 3 см от основания мочевого пузыря. Затем в течение недели животным предоставляют свободный доступ к пище и 1 %-ному раствору декстрана сульфата натрия. Этот способ создает модель язвенного колита с клинической схожестью и воспроизводимостью 90 %.

Однако при осуществлении данного способа характерно отсутствие образования язвенных дефектов и васкулитов в кишечной стенке вследствие одномоментного протекания ишемического некроза.

Известен способ моделирования тотального ишемического некроза толстой кишки у экспериментальных животных путем перевязки краниальных или каудальных брыжеечных артерий, вен и их ответвлений [3]. После проведения нижнесрединной лапаротомии под общим наркозом выводились петли тонкого кишечника, слепая кишка и аппендикс. Мочевой пузырь и половые железы отводились вниз и покрывались стерильной тканью, смоченной 0,9 % раствором NaCl. Затем выделялись аорта, каудальная брыжеечная артерия, её ветви: левая артерия толстой кишки и краниальная прямокишечная артерия. Прямые ветви этих артерий с венами выделялись на протяжении 3 см от основания мочевого пузыря до начала прямой кишки. Все эти сосуды лигируются и пересекаются нитями (пролен 6,0). Левая артерия толстой кишки и краниальная прямокишечная артерия перевязывались и пересекались соответственно проксимальнее и дистальнее зоны ишемии. После завершения процедуры внутренние органы возвращались обратно в брюшную полость, и проводилось послойное ушивание раны. Животные содержались в клетках по шесть особей, имея свободный доступ к пище и 1 %-ному раствору декстрана сульфата натрия в течение 7 дней после операции. На седьмой день у животных были обнаружены язвы и острые эрозии слизистой оболочки толстой кишки, сопровождаемые воспалительными процессами. Также наблюдался васкулит с плазменным пропитывани-

ем стенок сосудов и утолщением интимы, в том числе и в микроциркуляторном русле.

К недостаткам данного способа следует отнести отсутствие образования язвенных дефектов и васкулитов в кишечной стенке вследствие одномоментного протекания ишемического некроза, к тому же получаемая модель не позволяет изучать изменения в стенке толстой кишки в динамике исследования, т.к. смоделированная патология заканчивается либо смертью экспериментального животного из-за большого участка некроза кишки, либо выздоровлением без признаков хронического воспаления в зоне ишемии, что подтверждает сложность стандартизации модели по полу, возрасту и весу используемых лабораторных животных — собак, в том числе из-за особенностей кровоснабжения кишечника у данных животных.

Известен способ моделирования язвенного колита [4], заключающийся в том, что экспериментальному животному в слепую кишку внутриспросветно одновременно вводят 45–50 %-ный спиртовой раствор пикрилсульфоновой кислоты в дозе 0,8–1,0 мл/кг, 1–1,5 %-ный водный раствор метиленового синего в дозе 1,5–2,0 мл/кг и индерал в дозе 0,5–1,0 мг/кг.

Однако при осуществлении данного способа отсутствуют язвенные поражения слизистой и подслизистой толстой кишки, а также отсутствует наличие аутоиммунного компонента в виде васкулита, характерного для пациентов, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника, в связи с чем, по известному способу невозможно получить прогрессированного язвенного дефекта с пенетрацией в брыжейку с участками эпителизации по краям язвенного дефекта, характерного для данного заболевания.

Моделирование антибиотико-ассоциированного колита в эксперименте на лабораторных животных, является необходимым условием для разработки новых, а также усовершенствования существующих способов лечения.

В связи с вышесказанным, целью исследования является разработка надежного и воспроизводимого способа моделирования антибиотико-ассоциированного колита у лабораторных животных для изучения механизмов развития этого заболевания, оценки эффективности потенциальных терапевтических вмешательств и поиска новых подходов к лечению и профилактике.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на 24 лабораторных крысах-самках породы «Стандарт» массой 200±50 г. Все манипуляции и содержание животных было регламен-

Таблица 1.

Результаты копрологического исследования каловых масс на выявление единичных количеств лейкоцитов

№ лабораторного животного	Оценка общего состояния лабораторных животных по шкале Фадеева С.Б.	Количество дефекаций к третьему дню исследования	Лейкоциты в кале (при одном опорожнении)
1	3	≈20	2 тыс./мкл
2	2	≈25	3 тыс./мкл
3	3	≈21	4 тыс./мкл
4	3	≈19	3 тыс./мкл
5	3	≈20	5 тыс./мкл
6	2	≈23	2 тыс./мкл
7	2	≈25	5 тыс./мкл
8	3	≈22	3 тыс./мкл
9	2	≈20	5 тыс./мкл
10	4	≈12	1 тыс./мкл
11	3	≈19	2 тыс./мкл
12	3	≈20	4 тыс./мкл
13	3	≈21	3 тыс./мкл
14	2	≈19	4 тыс./мкл
15	3	≈20	5 тыс./мкл
16	2	≈23	2 тыс./мкл
17	2	≈25	5 тыс./мкл
18	3	≈22	3 тыс./мкл
19	2	≈20	5 тыс./мкл
20	4	≈16	2 тыс./мкл
21	3	≈20	4 тыс./мкл
22	3	≈21	3 тыс./мкл
23	2	≈19	4 тыс./мкл
24	3	≈20	5 тыс./мкл

тировано локальным этическим комитетом Медицинского университета «Реавиз» (протокол № 7, 10.07.2024). Условия содержания в виварии лабораторных животных регламентированы РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений», приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабора-



Рис. 1. Посев чистой культуры Clostridium difficile

торной практики», ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (актуализированным от 01.01.2021).

Результаты и их обсуждение

Способ осуществляется следующим образом. По стандартной методике проводят общую анестезию лабораторных животных за 30 минут до начала реализации заявляемого способа. Антибиотико-ассоциированный колит моделируют с помощью введения в стенку прямой кишки и ее просвет через анальное отверстие раствора антибиотика широкого спектра действия (препарата Амоксиклав в дозе 2 мл/г), ввиду большого количества осложнений данной группы антибиотиков на систему желудочно-кишечного тракта [5].

В течение трех дней до проведения диагностической лапаротомии проводят оценку общего состояния экспериментальных животных по пятибалльной шкале Фадеева С.Б. [6] и осуществляют забор каловых масс на копрологическое исследование 6–8 раз в день с целью подтверждения воспалительного процесса в толстом кишечнике (таблица 1). По результатам копрологического исследования в каловых массах были выявлены единичные количества лейкоцитов, что подтверждает наличие острого воспалительного процесса в толстом кишечнике.

На третьи сутки после введения раствора антибиотика проводят рассечение мягких тканей, с иссечением участка прямой кишки для осмотра. Фрагмент стенки прямой кишки размером 2х3 см, на котором отмечается деформация рельефа слизистой оболочки: слизистая оболочка диффузно гиперемирована, отечна, частично

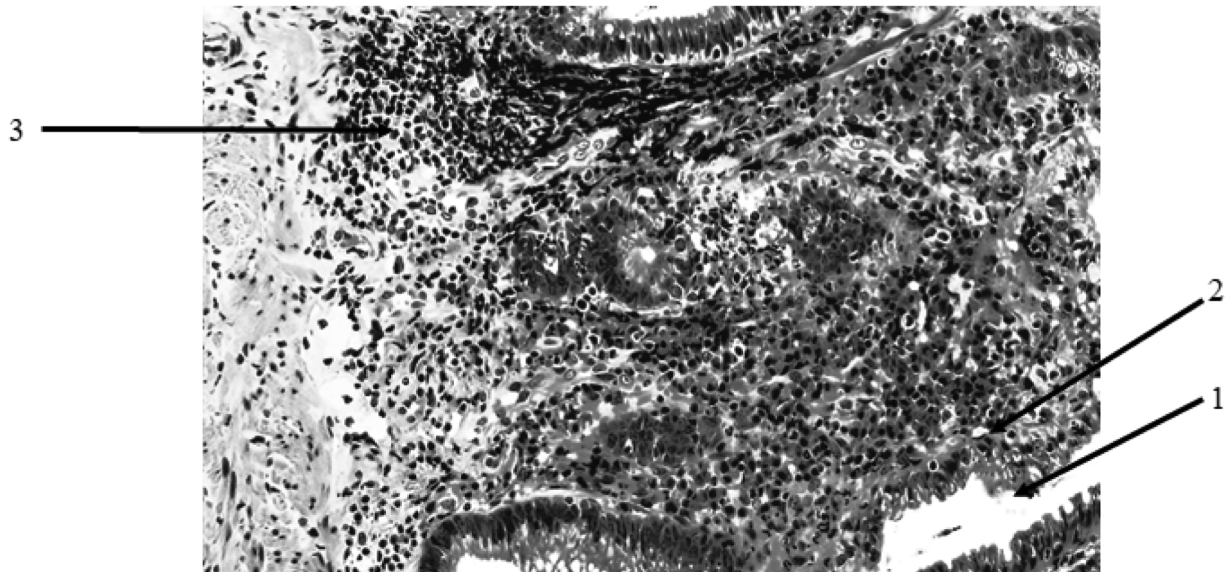


Рис. 2. Результаты микроскопического исследования антибиотико-ассоциированного колита

Примечание: Позициями на рисунке обозначены:

- 1 — деструкция крипт; 2 — атрофия ворсинок и увеличение числа бокаловидных клеток;
3 — увеличение количества лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов, с преобладанием нейтрофилов, в подслизистом слое и собственной пластинке слизистой оболочки

покрыта желтовато-зеленым экссудатом, с поверхностными повреждениями и мелкими кровоизлияниями.

При бактериологическом посеве (рис. 1) была выявлена чистая культура *Clostridium difficile*, что подтверждает развитие антибиотико-ассоциированного колита и согласуется с клиническими рекомендациями по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи [7].

Микроскопическое описание (рис. 2): в препарате определяется поверхностный некроз слизистой оболочки, деструкция крипт. Отмечается атрофия ворсинок, а также увеличение числа бокаловидных клеток. В подслизистом слое и собственной пластинке слизистой оболочки наблюдается увеличение количества лимфоцитов, плазматических клеток, эозинофилов, с преобладанием нейтрофилов. В некоторых участках наблюдаются скопления грамположительных палочковидных бактерий.

Было установлено, что развитие антибиотико-ассоциированного колита полученного с использованием разработанного способа, у всех подопытных животных было идентично по характеру повреждений слизистой оболочки прямой кишки. Заявляемый способ достаточно прост, воспроизводим в проведении, не требует проведения в условиях специально оборудованных помещениях.

Заключение

Таким образом, полученные экспериментальные данные подтверждают, что разработанный способ позволяет путем введения раствора антибиотика широкого спектра действия (Амоксиклав 2 мл/г) в стенку прямой кишки и ее просвета через анальное отверстие спровоцировать развитие антибиотико-ассоциированного колита, что весьма актуально в настоящее время и определяет перспективы его широкого использования в исследовательских целях [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Ooi C.J. et al. The Asia-Pacific consensus on ulcerative colitis. J. Gastroenterol Hepatol. 2010; 25 (3): 453–468.
2. Патент РФ на изобретение № 2604044 С1, МПК G09B 23/28, опубл. 10.12.2016. Ким А.Д., Григорьев Е.Г., Гольдберг О.А., Лепехова С.А., Чашкова Е.Ю., Коваль Е.В., Фадеева Т.В., Зарицкая Л.В. Способ моделирования язвенного колита.
3. Шалимов С.А., Радзиховский А.П., Кейсевич Л.В. Руководство по экспериментальной хирургии. М.: 1989; 207 с.
4. Патент РФ на изобретение № 2316055, МПК G09B 23/28, опубл. 27.01.2008. Лычкова А.Э. Способ моделирования неспецифического язвенного колита.
5. Луфт В.М., Лапицкий А.В. Ассоциированная с антибиотиками диарея: диагностика, лечение и профилактика. Учебно-методическое пособие. СПб.: Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе. 2012; 48 с.
6. Фадеев С.Б. Оценка тяжести подопытных животных в хирургическом эксперименте. Мат. юбилейной науч. практич. конф., посв. 25 лет. городской клинической больницы скорой медицинской помощи №1. Оренбург, 2002; 52 с.
7. Шелыгин Ю.А., Алёшкин В.А., Сухина М.А. и др. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике Clostridium difficile-ассоциированной диареи. Клинические рекомендации. М.: 2017; 51 с.
8. Заявка на получение патента изобретение № 2024138639 от 20.12.2024. Полиданов М.А., Капралов С.В., Кашихин А.А., Волков К.А., Юанов А.А., Петрунькин Р.П., Масляков В.В., Дягель А.П., Кравченя Д.С., Кравченя А.Р., Греков В.В., Сафронов Д.В., Амиров Э.В. Способ моделирования антибиотико-ассоциированного колита у лабораторных животных.

© Полиданов Максим Андреевич (maksim.polidanoff@yandex.ru); Капралов Сергей Владимирович (sergejkapralov@yandex.ru); Масляков Владимир Владимирович (maslyakov@inbox.ru); Волков Кирилл Андреевич; Петрунькин Родион Павлович; Кашихин Андрей Андреевич
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»