

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 616.37–002–035–092.9

### НОВИЙ ПІДХІД ДО ЛІКУВАННЯ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ, СПРИЧИНЕНОГО L–АРГІНІНОМ, У ЩУРІВ

*В. В. Петрушенко, С. А. Суходоля, Т. М. Фалалєєва, Т. В. Берегова*

*Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова МОЗ України,  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка*

### NEW APPROACH FOR TREATMENT OF CHRONIC PANCREATITIS, CAUSED BY L–ARGININE, IN RATS

*V. V. Petrusenko, S. A. Sukhodolya, T. M. Falaleyeva, T. V. Bereгова*

#### РЕФЕРАТ

Вивчений вплив рофєкоксибу на прогресування фіброзних змін у підшлунковій залозі (ПЗ) у щурів при експериментальному хронічному панкреатиті (ХП), спричиненому L–аргініном.

У 60 щурів–самців моделювали ХП шляхом внутрішньоочеревинного введення L–аргініну (100 мг/100 г) протягом 21 доби. Щурам основної групи після закінчення введення L–аргініну впродовж 14 дб вводили рофєкоксиб (5 мг/кг). Через 35 дб експерименту аналізували стан тварин, активність амілази, панкреатичної амілази та ліпази у сироватці крові, а також морфологічні зміни ПЗ. Застосування рофєкоксибу сприяло уповільненню формування фіброзу ПЗ, поліпшенню морфофункціонального стану органа. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням можливості застосування нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) у комплексі лікування ХП в клінічних умовах.

**Ключові слова:** хронічний панкреатит; лікування; рофєкоксиб; експеримент.

#### SUMMARY

Impact of rofecoxib on progressing of pancreatic fibrous changes in the rats in experimental chronic pancreatitis, caused by L–arginine, was studied up. In 60 male rats chronic pancreatitis was simulated, using intraabdominal L–arginine introduction (100 mg/100 g) through 21 days. Rofecoxib (5 mg/kg) was injected during 14 days to rats of the main group after L–arginine injections were completed. In 35 days of experiment the animals state, the pancreatic amylase and lipase activity in the blood serum, as well as morphological changes in pancreatic gland, were analyzed. Application of rofecoxib have had promoted the postponed pancreatic fibrosis formation, the morphofunctional state of pancreatic gland improvement. The data obtained constitute the experimental substantiation of possibility to apply nonsteroid anti-inflammatory medicines in complex of clinical treatment of chronic pancreatitis.

**Key words:** chronic pancreatitis; treatment; rofecoxib; experiment.

Система охорони здоров'я всіх країн світу зіткнулася з проблемою збільшення частоти виникнення хронічних захворювань. Це є наслідком змін середньої тривалості життя людей завдяки таким чинникам, як довголіття, нездоровий спосіб життя, незахищеність від факторів ризику виникнення хронічних захворювань.

За останні 30 років у світі та, зокрема, на теренах нашої країни відзначають збільшення удвічі частоти ХП. Захворюваність на первинний ХП у Європі становить 10 – 50 на 100 тис. населення [1]. Небезпечним є тривале існування захворювання та, як наслідок, злоякісне переродження [2].

Поширення ХП в Росії та Україні за останні 10 років збільшилось утричі. Крім того, це захворювання істотно "помолодшало", вік хворих, у якому встановлюють діагноз, зменшився з 50 до 39 років, у підлітків частота його виявлення збільшилася у 4 рази [3].

ХП – це безперервне або рецидивуюче запальне захворювання ПЗ, що характеризується прогресуючими та необоротними морфологічними змінами, постійним больовим синдромом та порушенням функції ПЗ [4]. Також ХП характеризують як непухлинний запальний процес, що спричиняє виражений больовий синдром, формування цукрового діабету, стеаторею, схуднення, що в цілому погіршує якість життя хворих. Під час перебігу хвороби прогресує недостатність екзо– та ендокринної функцій ПЗ.

Алкогольний панкреатит в наші дні посідає перше місце, залишивши за собою панкреатит, зумовлений ураженням гепатобіліарної системи, і становить до 80% причин виникнення ХП [2, 5 – 7]. Крім того, у виникненні ХП важливу роль відіграє харчування. Вживання жирної, смаженої, копченої їжі може спричи-

нити виникнення ХП та його загострення. Іншими причинами є інфекції, травма, кісти ПЗ, стан після операції на органах черевної порожнини [1].

Нестерпний біль, який виникає внаслідок протокової гіпертензії, а також біліарна гіпертензія, непрохідність дванадцятипалої кишки, зовнішні або внутрішні нориці ПЗ, а також панкреатичний асцит є прямими показаннями до виконання оперативного втручання. Метою хірургічного втручання з приводу ХП є усунення больового синдрому, збереження екзо- та ендокринної функцій ПЗ [2, 8].

Результати в пізньому післяопераційному періоді часто незадовільні через прогресування недостатності екзо- та ендокринної функцій ПЗ як після резекційних (панкреатодуоденальна резекція), дуоденозберігальних (операція Beger), дренажних (операція Partington – Rochelle) операцій, так і комбінованих втручань (операція Frey) [4]. Все частіше ХП ускладнюється утворенням внутрішніх нориць ПЗ з подальшим асцитом та плевритом. Причиною таких наслідків є прогресування фіброзу ПЗ, а не недостатність оперативного лікування, яке здійснюють за різними методиками [9].

Залежно від клінічних проявів ХП метою консервативної терапії є усунення больового приступу, пригнічення екзокринної функції ПЗ (голодування, холінолітики), активності ферментів ПЗ, усунення гіпертензії в протоковій системі ПЗ (антигістамінні препарати), дезінтоксикаційна, інфузійна та антибактеріальна терапія. Широко застосовують аналог соматостатину сандостатин, що забезпечує пригнічення секреції ферментів ПЗ, зменшення секреції підшлункового соку, зниження активності ферментів і рівня бікарбонатів у ньому, пов'язане з пригніченням виділення холецистокініну і секретину.

Незважаючи на прогрес, досягнутий в останні роки в питаннях діагностики, лікування та прогнозу перебігу захворювання, ХП є складним завданням хірургічної панкреатології та загрозою для життя хворих. Значна частота ХП, який супроводжується втраченою працездатності та інвалідизацією хворих переважно працездатного віку, смертність від ХП обґрунтовують соціальну значущість проблеми лікування тяжких ускладнених форм ХП.

У зв'язку з недостатньою ефективністю методів консервативного лікування ХП, важливою проблемою сучасної панкреатології є пошук його нових методів. Одним з перспективних напрямків може бути застосування НПЗП, показання до застосування яких розширюються. В науковій літературі є лише кілька повідомлень про ефективність застосування НПЗП при ХП, проте, автори не оцінювали морфофункціональний стан ПЗ, а досліджували лише вплив НПЗП на запальні процеси в ПЗ [10, 11].

Мета роботи: вивчити вплив рофекоксибу на прогресування фіброзних змін у ПЗ у щурів при експериментальному ХП, спричиненому L-аргініном.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проведені на 60 щурах—самцях лінії Wistar масою тіла 180 – 230 г з дотриманням принципів Конвенції з біоетики Ради Європи (1997), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей, загальних етичних принципів здійснення експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень, 2001), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до Закону України від 21.02.06 № 3447–IV "Про захист тварин від жорстокого поводження". Тварин утримували в умовах акредитованого віварію Навчально—наукового центру "Інститут біології" відповідно до "Стандартних правил з упорядкування, устаткування та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)". Прилади, що використовували для наукових досліджень, підлягали метрологічному контролю.

Тварини розподілені на 3 групи. Щурам I групи (інтактний контроль) внутрішньоочеревинно вводили ізотонічний розчин натрію хлориду (плацебо) в об'ємі 0,4 мл. ХП у щурів II і III груп моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення L-аргініну (100 мг/100 г в об'ємі 0,4 мл) протягом 21 доби. Після закінчення введення L-аргініну упродовж 14 діб щурам II групи внутрішньоочеревинно вводили плацебо, щурам III групи – рофекоксиб (5 мг/кг). Через 35 діб щурів виводили з експерименту, забирали ПЗ для гістологічного дослідження.

Матеріал фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну, заливали в парафін, парафінові зрізи товщиною 5 – 7 мкм виготовляли на роторному мікромомі, фарбували гематоксиліном та еозином за Бюмером.

Гістологічні препарати аналізували під мікроскопом при збільшенні  $\times 100$ . Кольорові мікрофото виготовляли за допомогою цифрової фотокамери Olympus C–5050 Zoom та мікроскопа Olympus BX–41 (Olympus Europe GmbH, Японія).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Маса тіла щурів всіх груп до початку експерименту становила у середньому ( $193,4 \pm 2,7$ ) г. У контрольній групі впродовж 35 діб експерименту вона збільшилася на 14% ( $P < 0,05$ ), усі тварини живі.

У щурів II групи маса тіла зменшена у порівнянні з такою в контрольній групі на 21% ( $P < 0,05$ ). Померли 6 (30%) щурів внаслідок тяжкого перебігу ХП. Аналогічні показники смертності та втрати маси тіла щурів за експериментального ХП спостерігали й інші дослідники [12, 13].

У тварин III групи маса тіла була на 16% більша ( $P < 0,05$ ), ніж у тварин II групи. Померла 1 (5%) тварина.

У тварин всіх груп аналізували активність ферментів (амілази, панкреатичної амілази, ліпази) у си-

роватці крові, що характеризують стан ПЗ. В контрольній групі досліджувані показники були в межах норми. Активність ферментів у сироватці крові щурів при ХП була знижена у порівнянні з такою в контрольній групі, в тому числі амілази — на 61% ( $P < 0,001$ ), панкреатичної амілази — на 66,8% ( $P < 0,001$ ), ліпази — на 80,6% ( $P < 0,001$ ). Зниження активності ферментів у щурів II групи підтверджує формування недостатності екзокринної функції ПЗ. Активність ферментів у щурів при ХП під впливом рофекоксибу суттєво підвищувалася у порівнянні з такою у щурів II групи: амілази — на 193% ( $P < 0,05$ ), панкреатичної амілази — на 246%, ліпази — на 411% ( $P < 0,05$ ). Отримані результати свідчать про часткове відновлення екзокринної функції ПЗ при застосуванні НПЗП.

За даними гістологічного дослідження тканина ПЗ у щурів контрольної групи мала типову будову. Ацинози екзокринної частини ПЗ нормальної будови, ациноцити конічної форми, з вираженою полярністю на апікальну (зимогенну) та базальну (гомогенну) зони. У базальній частині ациноцитів розташовані ядра з чітко окресленими ядерцями (рис. 1).

У щурів II групи в ПЗ виявляли виражені зміни, поділені на три підгрупи — фіброзні, запальні (рис. 2 А, Б) та аденому (рис. 2, В). В усіх спостереженнях відзначали розростання фіброзної тканини, її помірну поліморфноклітинну інфільтрацію, місцями — вогнищевий ліпоматоз (рис. 2, Б). Виявляли аденоми як з дисплазією низького ступеня і переважанням фіброзної стромы, так і дисплазією високого ступеня.

Застосування рофекоксибу протягом 2 тиж у щурів з ХП сприяло поліпшенню стану ПЗ. У тварин III групи відзначали помірну поліморфноклітинну інфільтрацію міжчасточкової фіброзної тканини (помірно виражені запальні зміни) (рис. 3 А). Деякі міжчасточкові вивідні протоки без патологічних змін, деякі — з потовщеною стінкою, наявністю залоз (за типом формування аденоми) у фіброзно-змінній тканині потовщеної стінки (рис. 3, Б). Кількість аденом значно менша ( $P < 0,05$ ), ніж у II групі.

Таким чином, введення L-аргініну протягом 21 доби зумовлювало фіброз тканини ПЗ. Панкреатичні зірчасті клітини (ПЗК) відіграють важливу роль у формуванні фіброзних змін ПЗ при ХП. В нормі функція цих клітин полягає в підтримці нормальної будови ПЗ [14]. Численні чинники, зокрема, етанол та його метаболіти, церулеїн, L-аргінін, дибутилін дихлорид запускають каскад перетворень арахідонової кислоти, активується циклооксигеназний тип запалення (ЦОГ-1, ЦОГ-2), внаслідок чого виділяються запальні цитокіни, простагліцилін, простагландини (ПГ), тромбоксан А2, що зумовлює активацію ПЗК, синтез білків екстрацелюлярного матриксу, фіброзні зміни ПЗ, навіть після припинення дії панкреатит-провокуючих чинників. Підвищення рівня ЦОГ-2 виявлене в тканині ПЗ у щурів та мишей з ХП [10, 11]. Продуктом синтезу ЦОГ є ПГ, в основному ПГ Е2, який впливає аутокринним та паракринним способом.

Отримані результати свідчили, що використання рофекоксибу сприяло зменшенню летальності на 25%, запобіганню надмірної втрати маси тіла тварин, припиненню прогресування фіброзу тканини ПЗ та поліпшенню її функціонального стану. Механізм протизапальної дії НПЗП пов'язаний з пригніченням ак-

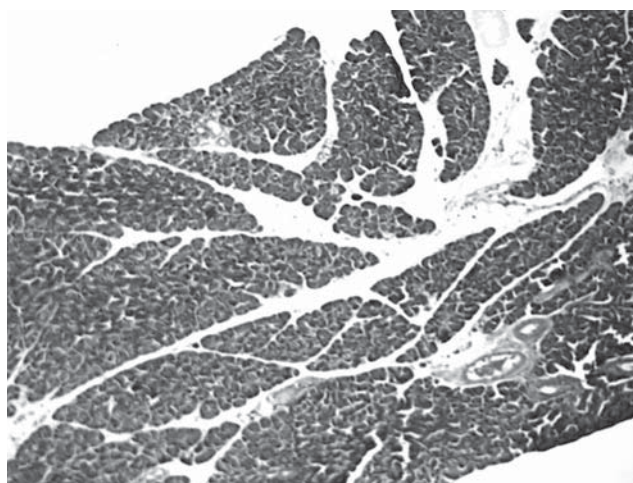


Рис. 1. Мікрофото. ПЗ тварин контрольної групи. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб.  $\times 100$ .

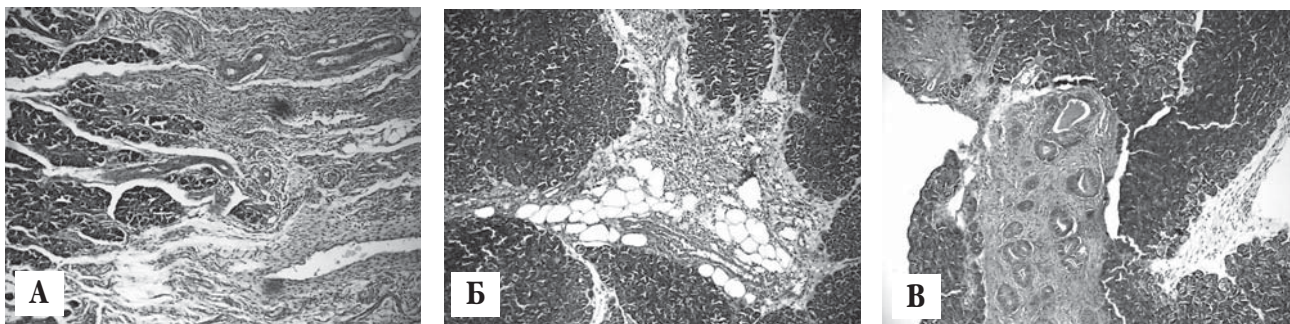


Рис. 2. Мікрофото. ПЗ щурів II групи.

А - фіброзні і запальні зміни; Б - розростання міжчасточкової фіброзної тканини, її помірна поліморфноклітинна інфільтрація; вогнищевий ліпоматоз. В - аденома протоки ПЗ з вираженою фіброзною стромою, повною обтурацією просвіту фіброзно-зміненою тканиною з залозами, дисплазією залоз низького ступеня.

Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Зб.  $\times 100$ .

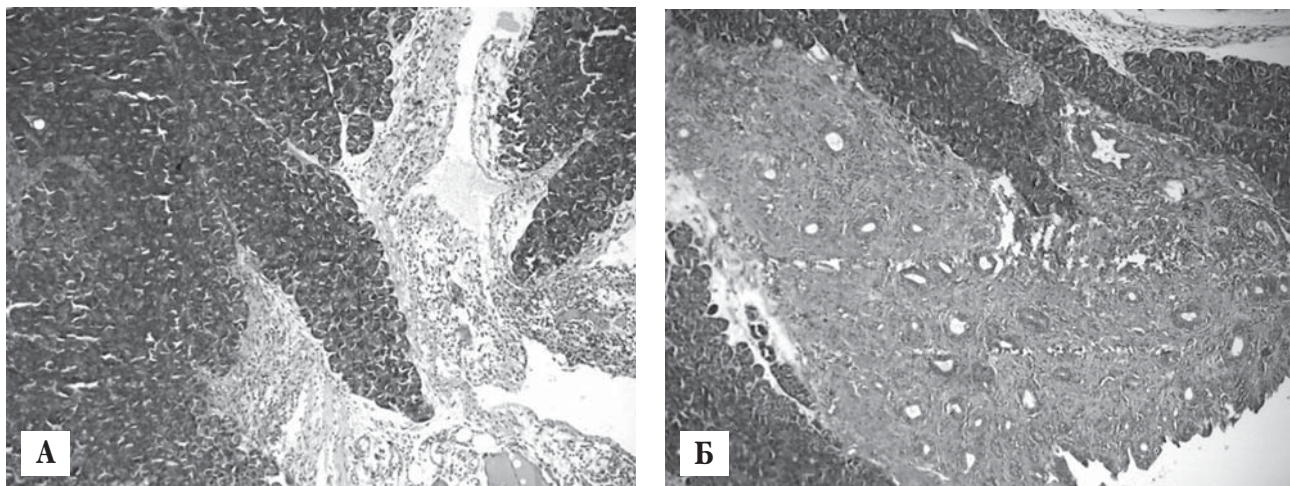


Рис. 3. Мікрофото. ПЗ щурів III групи.

А - Помірно виражена поліморфноклітинна інфільтрація міжчасточкової фіброзної тканини; Б - аденома протоки ПЗ з переважанням фіброзної стромы.

Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб.  $\times 100$ .

тивності ЦОГ — ключового ферменту метаболізму арахідонової кислоти і, як наслідок, зменшенням синтезу ПГ. На початку 90-х років минулого сторіччя Дж. Вейн встановив, що в організмі одночасно існують дві ізоформи ферменту ЦОГ — ЦОГ-1 (конститутивна) і ЦОГ-2 (індукована). Вони мають різні функції: ЦОГ-1 відповідає за синтез ПГ, що беруть участь у захисті слизової оболонки органів травного каналу, регуляції функції тромбоцитів і кровотоку у нирках; а ізофермент ЦОГ-2 — бере участь у синтезі ПГ під час запалення. Терапевтичний ефект НПЗП реалізується внаслідок гальмування активності ЦОГ-2, а основні побічні реакції виникають при інгібуванні ЦОГ-1. Протизапальна дія НПЗП також пов'язана з гальмуванням перекисного окиснення ліпідів, стабілізацією лізосомальних мембран, гальмуванням утворення макроергічних зв'язків у процесах окисного фосфорилювання, гальмуванням агрегації нейтрофільних гранулоцитів, пригніченням синтезу, взаємодією з рецепторами, інактивацією інших медіаторів запалення (брадикінін, лімфокіни, лейкотрієни, фактори комплексу тощо). Таким чином, застосування НПЗП у комплексі терапії ХП може покращити морфофункціональний стан ПЗ.

Отже, застосування рофекоксибу у щурів з модельованим ХП, спричиненим L-аргініном, уповільнює фіброзування тканини ПЗ.

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням можливості застосування НПЗП у комплексі лікування ХП у клінічних умовах.

## ЛІТЕРАТУРА

- DiMagno M. J. Chronic pancreatitis / M. J. DiMagno, E. P. DiMagno // *Curr. Opin. Gastroenterol.* — 2012. — Vol. 28, N 5. — P. 523 — 531.
- Сучасні концепції патогенезу, діагностики і лікування панкреатиту / О. О. Шалімов, В. В. Грубник, Дж. Горювіч [та ін.]. — К.: Здоров'я, 2000. — 256 с
- Хирургическое лечение хронического панкреатита с протоковой гипертензией и без протоковой гипертензии / А. В. Клименко, В. Н. Клименко, А. А. Стещенко [и др.] // *Укр. журн. хірургії.* — 2013. — № 1. — С. 22 — 27.
- Frey C. F. Why and when to drain the pancreatic ductal system / C. F. Frey // *Chronic pancreatitis*; eds. H. G. Beger, M. W. Buechler, H. Ditschuneit, P. Malfertheiner. — Berlin: Springer, 1990. — P. 415 — 425.
- Apte M. The fibrosis of chronic pancreatitis: new insights into the role of pancreatic stellate cells / M. Apte, R. Pirola, J. Wilson // *Antioxid. Redox. Sign.* — 2011. — Vol. 15, N 10. — P. 2711 — 2722.
- Alcohol consumption on pancreatic diseases / M. Herreros-Villanueva, E. Hijona, J. M. Banales [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2013. — Vol. 19, N 5. — P. 638 — 647.
- Angiotensin II signaling through the AT 1a and AT 1b receptors does not have a role in the development of cerulein-induced chronic pancreatitis in the mouse / B. Ulmasov, Z. Xu, V. Talkad [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2010. — Vol. 299. — P. 70 — 80.
- Применение ловастатина в модели хронического алкогольного панкреатита для профилактики фиброза поджелудочной железы после выполнения ее дистальной резекции / М. Е. Ничитайло, Д. А. Кравченко, Е. Б. Медведский [и др.] // *Хирургия Украины.* — 2013. — № 1. — С. 30 — 37.
- Neal C. P. Surgical therapy in chronic pancreatitis / C. P. Neal, A. R. Dennison, G. Garcea // *Minerva Gastroenterol. Dietol.* — 2012. — Vol. 58, N 4. — P. 377 — 400.
- A selective COX-2 inhibitor suppresses chronic pancreatitis in an animal model (WBN/Kob rats): significant reduction of macrophage infiltration and fibrosis / T. Reding, D. Bimmler, A. Perren [et al.] // *Gut.* — 2006. — Vol. 55, N 8. — P. 1165. — 1173.
- COX-2 is not required for the development of murine chronic pancreatitis / A. Silva, A. Weber, M. Bain [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* — 2011. — Vol. 300, N 6. — P. 968 — 975.
- Assessment of the protective effects of oral tocotrienols in arginine chronic-like pancreatitis / A. M. Gonzalez, T. Garcia, E. Samper [et al.] // *Ibid.* — Vol. 301. — P. 846 — 855.
- Pancreatic atrophy: a new model using serial intra-peritoneal injections of L-arginine / C. P. Delaney, K. F. McGeeney, P. Dervan, J. M. Fitzpatrick // *Scand. J. Gastroenterol.* — 1993. — Vol. 28, N 12. — P. 1086 — 1090.
- Roles of pancreatic stellate cells in pancreatic inflammation and fibrosis / A. Masamune, T. Watanabe, K. Kikuta [et al.] // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* — 2009. — Vol. 7, N 11. — P. 48 — 54.