

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ ЛУЖНОГО ОПІКУ І ТА ІІ-ГО СТУПЕНЮ СТРАВХОДУ У СТАТЕВОНЕЗРІЛИХ ЩУРІВ

Я. Б. РАЄЦЬКА, Т. В. ІЩУК, О. І. ДЖУС, О. М. САВЧУК, Л. І. ОСТАПЧЕНКО

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка,  
Кафедра біохімії, 03127 Київ, Україна, пр-т Глушкова 2/12  
e-mail: raetska@ya.ru

*Екзогенні отруєння лугами займають провідне місце в структурі гострих отруєнь, що прямо зв'язано з наявністю великої кількості порівняно доступних технічних і побутових агресивних рідин, синтезованих у результаті науково-технічного прогресу людства. Випадковий або навмисний прийом їдких речовин є важливою соціальною і медичною проблемою через довготривалі ускладнення, включаючи кровотечу, перфорацію, системні ускладнення (ниркова недостатність, порушення функції печінки), звуження стравоходу, свищі, рубці, обструкцію та рак шлунка. Серед постраждалих переважно діти віком від 1 до 8 років. На сьогодні існує ряд експериментальних моделей хімічних опіків стравоходу, але вони є недостатньо коректними для проведення досліджень, оскільки при їх створенні застосовуються хімічні речовини, які, самі по собі, впливають на ряд біохімічних показників, зумовлюючи похибку в результатах. В експерименті на щурах нами відтворено модель лужного опіку стравоходу І та ІІ-го ступеню, яка супроводжувалась відповідними морфологічними ураженнями слизової оболонки стравоходу. Дослідженні показники: рівень загального білка, альбуміну, сечовини, іонів калію, креатиніну, АСТ, АЛТ, які є основними біохімічними показниками сироватки крові, за якими можна охарактеризувати функціональний стан організму та оцінити ступінь метаболічних порушень за умов досліджуваної патології. За умов моделювання ЛОС І-го ступеню – рівень досліджуваних біохімічних показників (загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну) найбільше змінювався на 7-му добу досліджень, після моделювання ЛОС ІІ-го – на 1-шу добу. Активність АСТ та АЛТ за умов моделювання ЛОС І-го ступеню найбільше зростала на 7-му добу експерименту, щодо моделі ЛОС ІІ-го ступеню активність вище згаданих ферментів була найвищою на 1-шу добу. Отримані результати ще раз підтверджують, що змодельований стан є адекватною моделлю лужного опіку стравоходу І, ІІ-го ступеню у дітей віком від 1-го до 8-ми років. Даний підхід може бути використаний у дослідженні біохімічних та імунологічних механізмів патогенезу хімічного опіку стравоходу І, ІІ-го ступеню на тваринах.*

*Ключові слова: лужний опік стравоходу, біохімічні показники.*

**Вступ.** Екзогенні отруєння лугами займають провідне місце в структурі гострих отруєнь (Доржиев и др., 2012; Разумовский и др., 2011). Серед постраждалих переважно діти - 75%, віком від 1 до 8 років (Доржиев и др., 2012; Ивашкин, Трухманов, 2000). Глибина опіку стравоходу залежить від концентрації хімічної речовини, її природи, кількості та часу контакту зі слизовою оболонкою. Існує ряд патологій та ускладнень в патогенезі опіків стравоходу: гіпоксія тканин (Сапожникова, 1978; Mattos, 2006), набряк гортані, токсичний шок, кровотеча, некроз стінки стравоходу або шлунка, медіастеніт і формування рубцевого стенозу (Сапожникова, 1978; Dakshesh N. Parikh. et al., 2009; Mattos et al., 2006), гастроэзофагеальний рефлюкс (Салахов, 2007; Mutaf et al., 1996), порушення моторики (Волков и др., 2005), кандидоз (Черноусов и др., 1998), малігнізація у віддаленому періоді (Ziegler et al., 2003) та інші. Отже, опікова хвороба є важливою проблемою, яка потребує негайного вирішення.

На сьогодні існує ряд експериментальних моделей хімічних опіків стравоходу (Bustamantel

et al., 2013; Ekingen et al., 2005; Guven et al., 2008; Осакс et al., 2006), але вони є недостатньо коректними для проведення досліджень, оскільки при їх створенні застосовуються хімічні речовини, які, самі по собі, впливають на ряд біохімічних показників, зумовлюючи похибку в результатах. Крім того для наших досліджень принциповим було розробити модель опіку, яка б відповідала тій, що є характерною для дітей від 1 до 8 років. Традиційно при створенні моделі опіку стравоходу використовують статевозрілих щурів, що за віком, як правило, відповідають дорослій людині (Гелашвили, 2008).

Для відтворення лужного опіку стравоходу (ЛОС) нами було обрано розчин NaOH, оскільки більшість отруйних речовин, які викликають хімічні ушкодження стравоходу у дітей, є луговмісні (елементи живлення, миючі засоби, речовини для очистки).

Метою нашої роботи було створення адекватної експериментальної моделі ЛОС І та ІІ-го ступеню, які можна застосовувати для широкого спектру досліджень особливостей

опікового патогенезу в першу чергу у дітей віком від 1-го до 8-ми років.

**Матеріали і методи.** У досліджах використовували білих нелінійних статевонезрілих щурів (1-місячних) масою 90-110 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам експериментально моделювали опік стравоходу розчином 10% та 20% NaOH: у стравохід вводили зонд з запаяним торцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4,0 см від верхніх різців щура. Після цього через зонд повільно вводили 0,1 та 0,2 мл розчину 10% NaOH та 20% NaOH. Контрольним щурам одноразово перорально вводили 0,1 та 0,2 мл води для ін'єкцій (Раєцька та ін., 2013).

Дослідження стану слизової оболонки стравоходу проводили на 1, 3 та 7-му добу після введення розчину лугу. Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за хімічних опіків стравоходу (Ванцян, Тошаків, 1971). Наприкінці експерименту тварин умертвляли методом дислокації шийних хребців. Отриманий стравохід розрізали поздовжньо, промивали холодним фізіологічним розчином. Для морфологічного дослідження використовували шматочки стравоходу довжиною близько 1,5 см. Їх фіксували в розчині 12% формаліну і заливали в парафін. Депарафіновані зрізи товщиною 5 мкм фарбували гематоксилін-еозином за Ван Гізоном. Дослідження стану слизової стравоходу проводилося візуальним методом. Макроскопічно за допомогою лупи при яскравому освітленні визначали кількість і площу деструкцій.

Біохімічні показники визначали в сироватці крові, яку отримували центрифугуванням крові при 2000g 40 хв. У нашому дослідженні використовували біохімічний аналізатор Humalyser 3000. Визначення вмісту загального білка проводилося з використанням набору для колориметричного фотометричного визначення концентрації загального білка біуретовим методом. Визначення рівня альбуміну проводилося з використанням набору для колориметричного визначення концентрації альбуміну з використанням бромкрезолового зеленого. Визначення рівня іонів  $K^+$  проводилося з використанням набору для фотометричного турбідиметричного визначення концентрації іонів  $K^+$ . Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ) проводилося з використанням набору для колориметричного визначення АЛТ. Визначення активності аспартатамінотрансферази (АСТ) проводилося з

використанням набору для колориметричного визначення АСТ.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики та кореляційного аналізу з використанням комп'ютерної програми *Excel*. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента ( $t$ ). При цьому достовірними вважались різниці  $P < 0,05$ .

**Результати та обговорення.** Відомо, що луги пошкоджують слиз і білкову субстанцію клітин, омилюють жири, утворюючи лужні альбуміни, розпушують і розм'якшують тканини, які стають більш доступними для проникнення речовин у глибші шари стравоходу. Луги залишають глибокі опіки в стравоході, у той час як шлунок страждає менше, ніж при отруєнні кислотами, у зв'язку з частковою нейтралізацією лугу шлунковим соком (Лужников, 2007). Показано, що 10% та 20% NaOH проникає в тканини і призводить до значних уражень слизової стравоходу (рис. 1. А, Б, В, Г). Виявлено набряк, гіперемію, пошкодження поверхневих шарів епітелію, крововиливи в підслизовий шар.

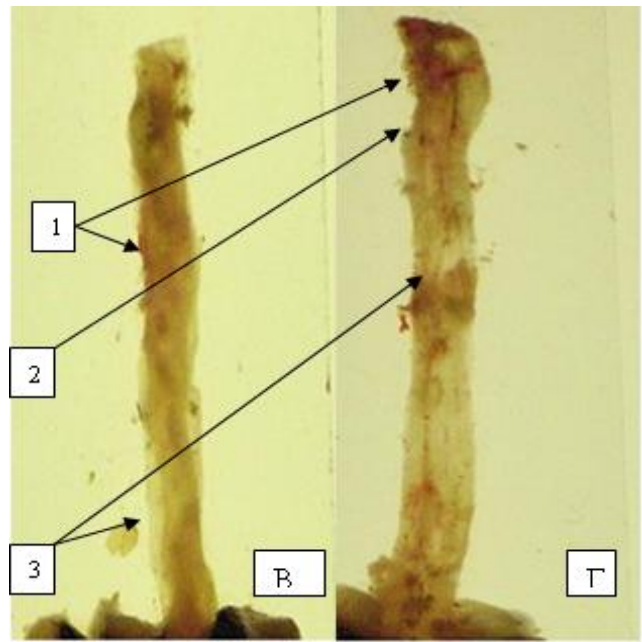
Мікрофотографія слизової стравоходу (рис.2, А) демонструє ураження тканин стравоходу щурів за умов експериментального моделювання ЛОС 10% NaOH: десквамативний езофагіт, гіперемія, набряк, підвищена ранимість слизової оболонки. На мікрофотографії (рис.2, Б) показано ураження тканин стравоходу щурів за умов експериментального моделювання ЛОС 20% NaOH: фібринозний, ерозивний езофагіт (пошкодження слизової та підслизового шару) виражений набряк. Порівняння виявлених уражень та досліджень стану слизової оболонки стравоходу дітей з опіком I та II-го ступеню показало відповідність експериментальних моделей (за Терновский, 1963, і за Ванцян, Тошаків, 1991).

Як відомо, опік стравоходу супроводжується тривалими порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів та систем (Лужников, 2007). Тому одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості ЛОС є визначення біохімічних показників. Нами були обрані такі показники, як рівень загального білка, альбуміну, сечовини, іонів калію, креатиніну, АСТ, АЛТ, що є основними біохімічними показниками сироватки крові, за якими можна охарактеризувати функціональний стан організму та оцінити ступінь метаболічних порушень за умов досліджуваної патології.



**Рис. 1.** Макрофотографія слизової оболонки стравоходу щурів при експериментальному моделюванні лужного опіку стравоходу 10% NaOH (А- 1 доба, Б - 7 доба) та 20% NaOH (В- 1 доба, Г - 7 доба).

Примітка: 1 – пошкодження поверхневих шарів епітелію; 2 – крововиливи; 3 – набряк.



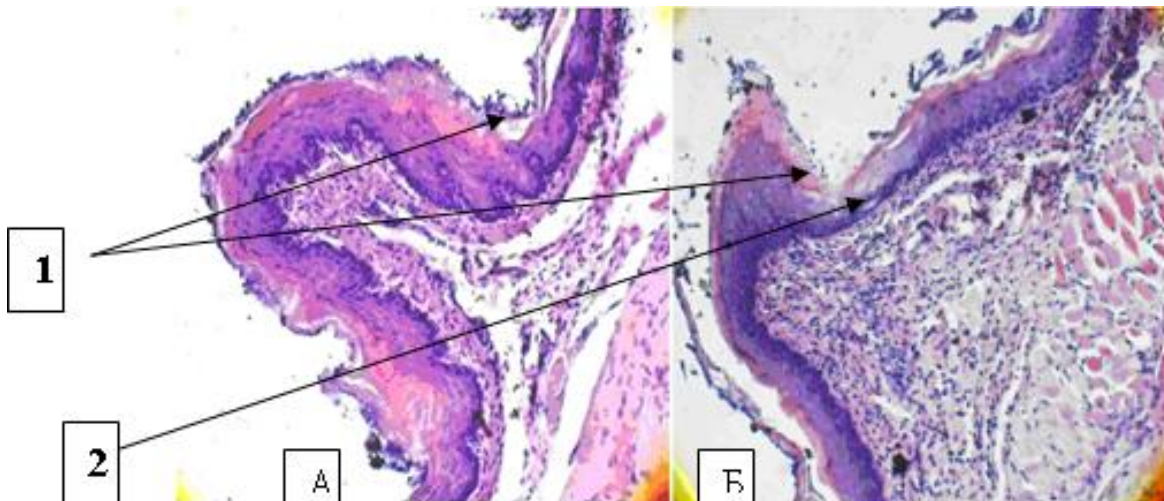
**Fig. 1.** Macrophotography of the rats esophageal mucosa after experimental simulation of an alkali burn with 10% NaOH (A– 1<sup>st</sup> day, Б – 7<sup>th</sup> day) and 20% NaOH (B– 1<sup>st</sup> day, Г–7<sup>th</sup> day).

Note: 1- damage to the superficial layers of the epithelium; 2 – hemorrhages; 3 – edema.

Нами було визначено концентрацію загального білка в сироватці крові щурів з ЛОС (10% NaOH) стравоходу, в ході дослідження були отримані наступні дані, які подані в таблиці 1. Встановлено, що експериментальний опік стравоходу 10% NaOH призводить до значних змін вмісту загального білка. На 1, 3 і 7 добу

спостережень його вміст поступово знижувався, відповідно, в 1,2, 1,5 та в 1,6 разів, порівняно з контрольними значеннями.

Показано, що на 3 і 7 добу відбувається поступове зниження вмісту альбуміну, відповідно, в 1,7 і 2,1 разів порівняно з контрольними значеннями.



**Рис. 2.** Мікрофотографія слизової оболонки стравоходу щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 10% NaOH (А) та 20% NaOH (Б).

Примітка: 1- пошкодження слизової, 2 - пошкодження підслизового шару.

**Fig. 2.** The micrograph of the rat esophageal mucosa after experimental simulation of an alkali burn with 10% NaOH (A) and 20% NaOH (Б).

Note: 1- damage to the mucosa, 2 - damage to the submucosa.

Отже, має місце гіпопротеїнемія, яка виникає переважно за рахунок зменшення кількості альбумінів.

У клінічній лабораторній діагностиці велику роль відіграє визначення вмісту кінцевих продуктів обміну білка, які прийнято розглядати як систему залишкового азоту. Майже половина компонентів цієї системи припадає на сечовину. У клініці показник рівня сечовини має вирішальне значення для діагностики захворювань нирок. За умов ЛОС 10% NaOH ми спостерігали підвищення: на 1, 3 та 7 добу рівень сечовини в 1,3, 1,9 та 2,1 рази, відповідно, що може свідчити про розвиток важкого патологічного процесу.

Нами було визначено рівень креатиніну в сироватці крові піддослідних тварин. В ході дослідження були отримані дані (табл. 1), які свідчать про те, що експериментальний опік стравоходу в період 1, 3 і 7 доби призводить до значних змін рівня креатиніну, який, зазвичай, використовується як маркер токсичного впливу на організм та може вказувати на ниркову недостатність. Експериментальний опік стравоходу зумовлював підвищення рівня креатиніну в сироватці крові в період всього терміну дослідження, на 1, 3 та 7 добу в 1,5, 2,1 та 2,3 рази, порівняно з контрольними значеннями, що відповідає літературним даним. Отже, опікова хвороба характеризується гострою

інтоксикацією, порушенням в організмі водно-сольового обміну, що часто призводить до ураження нирок (Ванцян, Тошаків, 1971; Гонський та ін., 2001; Лужников, 2007).

Дослідження рівня іонів  $K^+$  в сироватці крові щурів з ЛОС 10% NaOH дозволило встановити його підвищення 1,4, 2,4, 2,9 рази в усі терміни.

Вивчення динаміки активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів при моделюванні опіку стравоходу показало, що активність АЛТ підвищувалась у 2,5, 2 і в 1,5 рази, активність АСТ зростала у 1,5, 1,3, 1,2 рази, відповідно, на 1, 3, 7 добу експерименту. Встановлені зміни основних печінкових трансфераз за умов моделювання ЛОС 10% NaOH вказують на суттєві порушення функціонування різних органів, що може бути підтвердженням формування стійкого стану опіку стравоходу I-го ступеню у дослідних тварин.

Отже, за умов моделювання ЛОС I-го ступеню – рівень досліджуваних біохімічних показників (загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну) змінювався найбільшою мірою на 7-му добу досліджень. Активність АСТ та АЛТ за умов моделювання ЛОС I-го ступеню найбільше зростала на 7-му добу експерименту.

Також нами було визначено концентрацію загального білка в сироватці крові щурів з ЛОС (20% NaOH), в ході дослідження були отримані наступні дані, які подані в таблиці 1.

**Табл.1. Біохімічні параметри сироватки крові щурів за умов експериментального моделювання лужного опіку стравоходу 10% та 20% NaOH ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

**Tab. 1. Biochemical parameters in blood serum of rats under experimental modeling of an alkali esophagus burn with 10% and 20% NaOH ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )**

Показник	Контроль	ЛОС, 10% NaOH			ЛОС NaOH 20%		
		1 доба	3 доба	7 доба	1 доба	3 доба	7 доба
Загальний білок, (г/л)	65,01±0,1	51,02±2,1*	44,8±2,1*	41,2±1,0*	43,1±1,9*	50,7±2,1*	52,3±1,2*
Альбумін, (г/л)	37,5±0,12	21,9±1,6*	20,9±2,4*	18,3±1,3*	20,01±0,9*	21,9±1,02*	23,6±1,12*
Сечовина, (ммоль/л)	8,8±0,2	12,2±1,23	18,3±1,01*	20,7±1,3*	21,4±1,12*	20,7±1,2*	17,1±0,7*
Креатинін, (мкмоль/л)	88,0±0,1	130,8±4,2*	140,6±5,02*	178,8±3,98*	153,9±3,01*	153,6±1,1*	145,01±2,1*
$K^+$ , (ммоль/л)	5,0±0,1	5,7±0,1*	11,8±1,01*	14,6±0,9*	13,8±1,1*	13,4±1,2*	8,0±0,5*
АЛТ, од/л	27,7±0,1	68,31±1,03*	70,99±1,11*	78,12±1,33*	86,5±1,87*	77,98±1,22*	71,1±2,2*
АСТ, од/л	55,5±0,13	61,3±1,2*	62,12±0,9*	67,1±1,7*	79,7±3,3	71,6±1,47*	70,1±2,3*

Примітка: \* -  $P < 0,05$  по відношенню до контролю.

Встановлено, що експериментальний опік стравоходу 20% NaOH призводить до значних змін вмісту загального білка. На 1, 3 і 7 добу спостережень його вміст знижувався, відповідно, в 1,5, 1,3 та в 1,2 рази, порівняно з контрольними значеннями. Показано, що на 1,3,7 добу відбувається зниження вмісту альбуміну, відповідно, в 1,8, 1,6 і 1,5 разів порівняно з контрольними значеннями. За умов ЛОС 20% NaOH ми спостерігали підвищення: на 1, 3 та 7 добу рівень сечовини в 2,4, 2,3 та 1,9 рази, відповідно. ЛОС 20% NaOH зумовлював підвищення рівня креатиніну в сироватці крові в період всього терміну дослідження, на 1, 3 та 7 добу в 1,73, 1,72 та 1,63 рази, порівняно з контрольними значеннями. Дослідження рівня іонів  $K^+$  в сироватці крові щурів з ЛОС дозволило встановити його підвищення 2,72, 2,71, 1,56 рази в усі терміни. Вивчення динаміки активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів при моделюванні опіку стравоходу показало, що активність АЛТ підвищувалась у 3,1, 2,8 і в 2,6 рази, активність АСТ зростала у 1,4, 1,3, 1,2 рази, відповідно, на 1, 3, 7 добу експерименту. Таким чином, за умов моделювання ЛОС II-го ступеню – рівень досліджуваних біохімічних показників (загального білка, альбуміну, сечовини, креатиніну) змінювався найбільшою мірою вже на 1-шу добу досліджень. Активність АСТ та АЛТ за умов лужного опіку II-го ступеню найбільше зростала на 1-шу добу експерименту.

**Висновки.** Отже, за допомогою 10% NaOH та 20% NaOH нами було відтворено модель ЛОС I,II-го ступеню, яка супроводжувалась відповідними морфологічними ураженнями слизової оболонки стравоходу та змінами основних біохімічних показників. Отримані результати дозволяють стверджувати, що змодельований стани є адекватною моделлю ЛОС I та II-го ступеню у дітей віком від 1-го до 8-ми років. Даний підхід може бути використаний у дослідженні біохімічних та імунологічних механізмів патогенезу хімічного опіку стравоходу I,II-го ступеню на тваринах.

#### Список літератури:

1. Ванцян Э.Н., Тошаков Р.А. Лечение ожогов и рубцовых сужений пищевода. – М.: 1971. – 260 с.
2. Волков С.В., Ермолаев А.С., Лужников Е.А. Химические ожоги пищевода и желудка. – М.: Медпрактика-М., 2005. – 119 с.
3. Гонський Я.І., Максимчук Т.П. Біохімія людини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – 736 с.
4. Гелашвили О. А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека

- и крысы.//Саратовский научно-медицинский журнал. –2008. – Т. 22 № 4. – С. 125–126.
5. Доржиев Б.Д., Тыхенова М.Л., Пунсуков К.Д. Экспериментальная модель химического ожога пищевода и желудка современными агрессивными химическими агентами.// Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2012. – 86 ,№ 4. – С.46
  6. Ивашкин В. Т., Трухманов А. С. Болезни пищевода. — М.: Триада-Х, 2000. –179 с.
  7. Лужников Е. А.. Клиническая токсикология : учебник / - 2-е изд., перераб. и доп. –М. : Медицина, 1994. – 255 с.
  8. Разумовский А.Ю., Обыденнова Р.В., Куликова Н.В., и др.. Эволюция взглядов на хирургическое лечение детей с химическими ожогами пищевода.// Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии.– 2011. –№1. – С.51-59.
  9. Салахов Э.С. Лечение химических ожогов пищевода у детей. Дисс. ... канд. мед. наук. – СПб., 2007. С. 3-4.
  10. Сапожникова М.А. Химические ожоги пищевода и их отдаленные исходы при различных методах лечения: Дисс. ...д-ра мед. наук. – М., 1978. – 31 с.
  11. Черноусов А.Ф., Адрианов В.А., Домрачев С.А. и др. Выбор метода эзофагопластики при доброкачественных заболеваниях пищевода.//Анналы хирургии. – 1998. –№ 1. – С. 48–50.
  12. Раська Я.Б., Ішук Т.В., Савчук О.М., Остапченко Л.І. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу у щурів I-го ступеню.// Медична хімія. –2013. –Т.15(56) – С. 116-120.
  13. Bustamante T. F., et al. The use of mitomycin C in caustic esophagitis in rats.// Acta Cirúrgica Brasileira. –2013. – V. 28 (2) – P.136-141
  14. Dakshesh N. Parikh, David C.G. Crabbe, Alexander W. Auldist et al. Pediatric Thoracic Surgery. Rothenberg: London Limited. 2009. – 601p.
  15. Ekingen G. et al. Effect of the prostacyclin derivate iloprost in experimental caustic esophageal burn.// Pediatr Surg Int. – 2005. – V.21– P.441–444
  16. Guven A. et al. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn.// Journal of Pediatric Surgery. –2008. –V. 43, (9).– P.1679–1684.
  17. Ocak A. et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against NaOH-induced esophageal burns in rats.// International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. –2006. – V. 70,(10).– P. 1731–1739.
  18. Mattos G.M., Lopes D.D., Mamede R.C. et al. Effects of time of contact and concentration of caustic agent on the injuries. //Laryngoscope. –2006. Vol. 116. № 3. –P. 456–460.
  19. Mutaf O. The treatment of corrosive esophageal strictures by long-term stenting. // J. Pediatr. Surg. – 1996. –Vol. 31, № 5.–P. 681–685.
  20. Ziegler M.M., Azizkhan R.G., Weber T.R. Operative pediatric surgery. New York: McGraw-Hill., 2003. P. 341–345.

## EXPERIMENTAL MODELING OF 1<sup>ST</sup> AND 2<sup>ND</sup> DEGREES ALKALI ESOPHAGUS BURN IN IMMATURE RATS

**Ya.B. Raetska, T.V. Ischuk, O.I. Dzhus, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko**

*Exogenous poisoning with alkalis takes the leading position among causes of acute poisoning. There are many pathologies and complications following an alkali esophageal burns: swelling of the larynx, toxic shock syndrome, necrosis of esophageal and stomach tissue, dysmotility, scar stricture, esophageal deformations, corrosive esophagitis, gastroesophageal reflux, malignization in a remote period and others. Esophageal burns as a result of accidental swallowing of caustic material are seen frequently in children ages 1 to 8 years. Today there are a number of experimental models of an alkali esophagus burns (AEB) which require the use of chemicals for their creation where, in itself, they affect the certain biochemical parameters, which complicates the interpretation and analysis of the experimental results. The comparison of the detected lesions and researches of status of the esophageal mucosa of children with 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degree burns specified the experimental model conformity. Therefore, one of the major diagnostic criteria of the AEB severity is to determine biochemical parameters. We selected the following indicators as the level of total protein, albumin, urea, potassium ions, creatinine, AST, ALT, which are the main biochemical parameters of blood serum. Thus, we have reproduced the model of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degree an alkali esophageal burns using 10% and 20% NaOH which was accompanied by corresponding morphological lesions of esophageal mucosa and changes in basic biochemical parameters. This approach may be used in the study of biochemical and immunological mechanisms of pathogenesis of the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> degree an alkali esophageal burns of on animals.*

*Key words: alkali burn, esophagus, biochemical parameters*

*Одержано редколлегією 23.03.2014*