

Морфо-функціональний стан підшлункової залози при експериментальному хронічному панкреатиті

Б.Ф. Шевченко, О.М. Бабій, О.О. Галінський,

І.А. Кленіна, А.І. Руденко

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України» (Дніпропетровськ)

Останніми роками значно розширилися уявлення про роль оксиду азоту (NO), який представляє собою унікальний за своєю природою та механізмами дії вторинний месенджер у більшості клітин організму. NO бере участь в реалізації важливих фізіологічних функцій, зокрема, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, зниження агрегації тромбоцитів, реакція імунної системи, регуляція тонууса гладеньких м'язів, стану пам'яті та ін., а також деяких патологічних процесів, серед них запальні та дегенеративні зміни підшлункової залози (ПЗ) [1-5].

Залишається відкритим питання щодо впливу рівня концентрації NO в організмі на формування патологічних процесів, які викликають функціональне та структурне пошкодження органів травлення, зокрема, ПЗ [6, 7].

Мета дослідження. Встановити зміни функціонального та морфологічного стану ПЗ при моделюванні хронічного панкреатиту (ХП) із застосуванням неселективного блокатора NO-синтаз.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на 34 білих лабораторних щурах-самцях популяції Вістар, вагою 190-240 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Моделювання ХП проводили згідно патенту на корисну модель [8]. Проведено дві серії досліджень: I – моделювання ХП шляхом внутрішньочеревинного введення неселективного блокатора NO-синтаз – N^G-нітро-L-аргініну (L-NNA) в дозі 40 мг/кг протягом 6 та 12 діб; II – тваринам внутрішньочеревинно вводили ізотонічний розчин NaCl в дозі 1 мл. В якості анестетика використовували розчин кетаміна

гідрохлориду (110 мг/кг), для виведення тварин з експерименту через 6 та 12 діб моделювання патології ПЗ вводили летальну дозу анестетика.

Оцінку зовнішньосекреторної функції ПЗ проводили шляхом визначення в сироватці крові активності ферментів а-амілази («Філісіт»), трипсину (метод Ерлангера в модифікації Шатернікова) та ліпази за Тітцом [9]; ступеню фіброзування ПЗ – шляхом визначення оксипроліну білковозв'язаного (ОП_{б/зв}) [10].

Проводили гістологічне дослідження тканини ПЗ. За стандартною методикою ПЗ виділяли та відразу фіксували в середовищі 10% нейтрального розчину формаліну, проводили через ряд спиртів, заключали в парафін. Гістологічні зрізи тканини ПЗ товщиною 5 мкм фарбували гематоксилін-еозинем і за Маллорі-Слінченко.

Запис міоелектричної активності (МЕА) гладеньких м'язів ДПК здійснювали за допомогою біполярних платинових голкових електродів, які фіксували під час лапаротомії до ДПК на відстані 5-7 мм від пілоричного сфінктера. Реєстрацію МЕА здійснювали за допомогою поліграф-комп'ютера на базі RM-86 "Nihon Kohden". МЕА оцінювали за моторним індексом (MI) та фазами (I – фаза спокою, II – фаза активності) [11].

Дослідження проводили, дотримуючись нормативів Конвенції з біоетики Ради Європи (1997 р.), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових досліджень, загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001р.) [12].

Усі вихідні дані, отримані при виконанні роботи для математичної обробки вводилися у базу даних, побудовану за допомогою електронних таблиць Microsoft Excel 2010 та Origin Lab OriginPro v7.5. Отриманий числовий матеріал оброблявся за допомогою стандартних методів математичної статистики з визначенням середніх величин, їх стандартних помилок та інтервалів вірогідності за t-критерієм Стьюдента. Відмінності, отримані за методом парних порівнянь, вважали вірогідними при $p < 0,05$.

Дана робота є фрагментом науково-дослідної теми «Вивчити механізми розвитку фібротичних процесів при хронічному

панкреатиті та удосконалити технології їх хірургічної корекції з застосуванням нових технологій” (клініко-експериментальне дослідження), шифр ВН. 25.01.001.11, номер держреєстрації 0111U 001065.

Результати досліджень.

Під час проведення експериментальних досліджень не було зафіксовано летальних випадків серед піддослідних тварин. При внутрішньочеревинному введенні L-NNA протягом 6 діб загальний стан тварин не погіршувався, тоді як у подальшому, спостерігалось його пригнічення. Поведінка щурів в умовах звичайного середовища перебування (у клітці), ставала більш пасивною відносно будь-якого пересування, що також було виявлено в наших попередніх дослідженнях поведінкових реакцій з використанням методики «відкритого поля». У піддослідних тварин на 12 добу відмічалось вірогідне зменшення ваги тіла на $(8,0 \pm 2,1)$ г.

На 6 добу при внутрішньочеревинному введенні L-NNA МЕА ДПК мала слабо виражений фазний характер, при цьому визначити фази було досить складно.

Тривалість фази спокою ДПК протягом запису зменшилось до $(55,4 \pm 7,1)$ хв (інтактні показники – $(80,0 \pm 3,48)$ хв), переважали активні фази роботи ДПК – перехід між I та II фазами. МІ ДПК (табл. 1) збільшився в 1,3 рази ($p < 0,05$) по відношенню до контрольних значень, насамперед, за рахунок підвищення амплітуди першого висхідного коліна повільної хвилі основного електричного ритму, так як період базального ритму ДПК не мав вірогідних відхилень в порівнянні з контролем.

Таблиця 1 – Показники МІ ДПК при внутрішньочеревинному введенні L-NNA.

Показник	Контрольна група (n=4)	L-NNA	
		6 доба (n=4)	12 доба (n=4)
Моторний індекс, мкВ/с2	$4,55 \pm 0,14$	$6,00 \pm 0,21^*$	$2,60 \pm 1,16^*$

Примітка. * – $p < 0,05$ – вірогідність змін між показниками у порівнянні з контрольною групою.

На 12 добу при внутрішньочеревинному введенні L-NNA відбувалось зникнення фази спокою зі зменшенням амплітуди коливань базального ритму ДПК, електродуоденомограма втрачала чіткість періоду коливань. Мі ДПК знизився в 1,7 рази ($p < 0,05$), що свідчило про дезадаптацію та підвищення тонуусу гладеньких м'язів ДПК.

На 6 добу при внутрішньочеревинному введенні L-NNA активність α -амілази зросла в 1,7 рази ($p < 0,01$), ліпази – в 1,3 рази ($p < 0,01$), тоді як активність трипсину вірогідно не змінювалась, але спостерігалась тенденція до зниження в порівнянні з контрольною групою (табл. 2). Концентрація в крові маркеру анаболізму сполучної тканини – $OP_{6/зв}$ мала тенденцію до збільшення.

На 12 добу активність α -амілази зросла в 2,3 рази ($p < 0,01$), ліпази – в 1,4 рази ($p < 0,01$), тоді як активність трипсину вірогідно не змінювалась. Концентрація в крові $OP_{6/зв}$ вірогідно збільшилась в 1,4 рази ($p < 0,01$).

Таблиця 2 – Активність ферментів ПЗ та вміст $OP_{6/зв}$ в крові щурів при внутрішньочеревинному введенні L-NNA.

Показник	Контрольна група (n=10)	L-NNA	
		6 доба (n=6)	12 доба (n=6)
α -амілаза, мг/с·л	62,55±4,20	110,70±4,40**	155,83±8,05**
Трипсин, мкмоль/мл·хв	8,34±1,60	5,54±1,50	12,21±1,49
Ліпаза, мл нМоль/сЛ	2,01±0,02	2,56±0,12**	2,78±0,16**
$OP_{6/зв}$ мкмоль/л	177,84±12,00	196,59±15,10	254,45±6,38**

Примітка. ** – $p < 0,01$ – вірогідність змін між показниками у порівнянні з контрольною групою.

При морфологічному дослідженні на 6 добу при введенні L-NNA у лабораторних щурів спостерігалися прояви ХП зі стазом формених елементів крові у судинах та вогнищевим накопиченням лейкоцитів в паренхімі ПЗ (рис. 1).

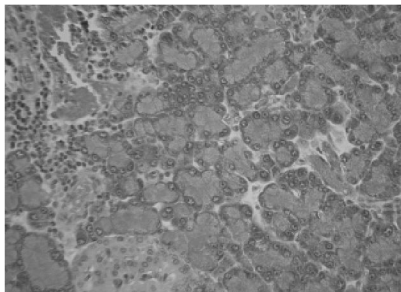


Рисунок 1 – ПЗ щура-самця на 6 добу після введення L-NNA. Стаз формених елементів крові в судинах та накопичення лейкоцитів в паренхімі ПЗ. Фарбування за Маллорі-Слінченко. X 200.

На 12 добу при внутрішньочеревинному введенні L-NNA в окремих часточках ПЗ з зонами атрофії ацинарної тканини формувалася нижній фіброз (рис. 2).

У контрольних тварин морфо-функціональних змін ПЗ не спостерігалось.

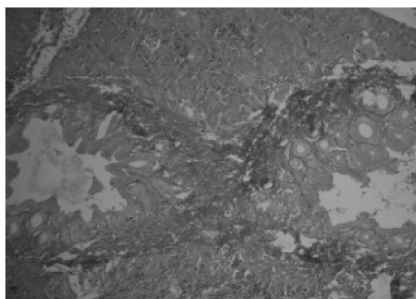


Рисунок 2 – ПЗ щура-самця на 12 добу при введенні L-NNA. Ознаки атрофії ацинарних клітин, формування нижнього фіброзу. Фарбування за Маллорі-Слінченко. X 200.

Таким чином, дефіцит NO запускає патологічні процеси в ПЗ, які обумовлені підвищенням тонуусу гладеньких м'язів ДПК, спазмом сфінктеру Одді, підсиленням ферментативної активності з формування морфологічних змін, характерних для хронічного запалення, атрофії ацинарного апарату та формування фіброзу.

Перспективи подальших досліджень. Будуть продовжені дослідження для уточнення строків хронізації патологічного процесу в ПЗ. Будуть з'ясовані кореляційні взаємовідношення біохімічних та морфо-функціональних змін в ПЗ, встановлені залежності стадій розвитку ХП та ступенів фіброзу ПЗ від тривалості моделювання ХП, що потребує подальшого дослідження шляхом подовження термінів моделювання.

1. *Ивашкин В.Т.* Клиническое значение оксида азота и белков теплового шока / *В.Т. Ивашкин, О.М. Дранкина.* - М. : Гэотар-Медиа, 2001. – 84 с.
2. Роль оксида азота в регуляции электрической и сократительной активности гладких мышц / *И.В. Ковалев, М.Б. Баскаков, Л.В. Катилевич [и др.]* // Бюл. Сиб. Мед. – 2004. – Т.1, №1. – С. 7–26.
3. *Лазебник Л.Б.* Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения / *Л.Б. Лазебник, В.Н. Дроздов, Е.Н. Барышников* // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2005. – № 2. – С. 4–11.
4. Механизмы NO-индуцированного расслабления гладких мышц сосудов / *А.Г. Попов, А.А. Панов, Ю.Л. Бородин [и др.]* // Актуальные вопросы кардиологии : межд. конф., 2000 г. : тезисы докл. – Томск, 2000. – С. 252.
5. Diagnosis and treatment of pancreatic pseudocysts in chronic pancreatitis / *A. Aghdassi, J. Mayerle, M. Kraft [et al.]* // *Pancreas.* – 2008. – Vol. 36, № 2. – P. 105–112.
6. *Bohus E.* Temporal metabolic modeling of L-arginine induced exocrine pancreatitis / *E. Bohus, M. Coen, H. C. Keun* // *J. Proteom Res.* – 2008. – Vol. 7 (10). – P. 4435–4445.
7. Pancreatitis induced in rats by repetitive administration of L-arginine / *S.B. Fredstrom, J. Jessurun, D.D. Gallaher* // *Pancreas.* – 2009. – Vol. 38, № 3. – P. 344–345.

8. Пат. 61631 Україна, МПК G09B№23/00 Спосіб моделювання панкреатиту в експерименті [Текст] / *О.О. Крилова, А.І. Руденко, Ю.А. Гайдар [та ін.]*; заявник і патентовласник ДУ «ІГ НАМН України». - № 201015739 ; заявл. 27.12.2010 ; опубл. 25.07.11, Бюл. №14. - 3 с.
9. *Горячковський О.М.* Клінічна біохімія : довідковий посіб. / *О.М. Горячковський.* - Вид. 2-е, вип. і доп. – Одеса : Астропринт, 1998. – 608 с.
10. *Логинов А.С.* Скрининг-метод определения общей липолитической активности крови / *А.С. Логинов, К.Ю. Асташенкова* // Лаб. дело. – 1986. – № 8. – С. 463–466.
11. *Трушенко О.С.* Міоелектрична активність шлунка та дванадцятипалої кишки при ушкодженні гастродуоденальної ділянки : матеріали 17-го з'їзду Укр. фізіол. тов. з міжнар. Участю (Чернівці, 18–20 травня 2006 р.) / *О.С. Трушенко, О.Б. Мурзін, А.І. Руденко* // Фізіологічний журнал. – 2006. – Т.52, № 2. – С. 169.
12. *Покровский В.И.* Биомедицинская этика / *В.И. Покровский.* – М., 1997. – 224 с.

MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL STATE OF PANCREAS IN CASE OF EXPERIMENTAL CHRONIC PANCREATITIS

*B. Shevchenko, A. Babiy, A. Galinsky,
I. Klenina, A. Rudenko*

*SI “Institute of Gastroenterology of NAMS of Ukraine”
(Dnepropetrovsk)*

There were performed the modeling of chronic pancreatitis introducing by intraperitoneal unselective blocker of NO-synthase – N^G-nitro-L-arginine to ratt-male during 6 and 12 days. There was established that NO deficiency led to pathological process in pancreas due to increase of smooth duodenum muscles tone, spasm of sphincter Oddi, increase of enzyme activity with formation of morphological changes, which are typical for chronic inflammation, atrophy of acinar apparatus and formation of fibrosis.