

Koshelnik E. L., Desyatsky V. V. Медикаментозна корекція гострого панкреатиту в щурів за експериментальних умов = Rats' experimental acute pancreatitis pharmacological correction. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(10):199-206. ISSN 2391-8306. DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.32619>
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%2810%29%3A199-206>
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/661564>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011–2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.
Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.
Zgodnie z informacją MNiSW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.
The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).
© The Author (s) 2015;
This article is published with open access at Licensee Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland
Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.
The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.
Received: 05.08.2015. Revised 05.09.2015. Accepted: 20.10.2015.

УДК 591.437:616.37-002-08

МЕДИКАМЕНТОЗНА КОРЕКЦІЯ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ В ЩУРІВ ЗА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ УМОВ RATS' EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS PHARMACOLOGICAL CORRECTION

О. Л. Кошельник, В. В. Десятський
E. L. Koshelnik, V. V. Desyatsky

Одеський національний медичний університет, Одеса
Odessa National Medical University, Odessa

Summary

Work is dedicated to model of acute pancreatitis and pathological changes of pancreatic tissues of rats with L-arginine-induced acute experimental pancreatitis and morphological tests of therapeutic effects of different forms of dalargin. The obtained data indicate that using of free and liposomal forms of dalargin, with therapeutic aims, in conditions of results in processes of macro- and microscopic changes in pancreatic tissue normalization. Efficacy significantly prevails the same of peptide's free form. This positive effect is the experimental background in clinical use of nitric oxide blocking and liposomal form of dalargin for treatment of acute pancreatitis.

Key words: model, acute experimental pancreatitis, morphology, treatment.

Резюме

Робота присвячена моделюванню та вивченню патологічних змін тканини підшлункової залози у щурів з L-аргінін-індукованим гострим експериментальним панкреатитом, а також морфологічному тестуванню лікувальних ефектів різних форм даларгіну та NG-нітро-L-аргініну за цих умов. Показано, що за умов використовуваної нами моделі ГЕП, індукованого за допомогою дворазової ін'єкції L-аргініну, в тканині ПЗ формуються морфологічні зміни, що характерні для гострого патологічного процесу: запалення, геморагії, некроз. Це підтверджує адекватність використаної нами моделі відповідному клінічному стану.

Застосування вільної та ліпосомальної форм даларгіну при L-аргінін-індукованому ГЕП також сприяє нормалізації макро- та мікроскопічних змін в тканинах ПЗ. При цьому ефективність ліпосомальної форми даларгіну в 1,5 раза перевищувала таку у вільної форми пептиду. Отримані дані є експериментальним обґрунтуванням можливого клінічного застосування інгібіторів синтезу окису азоту та ліпосомальних форм опіоїдних пептидів з метою лікування гострого панкреатиту.

Ключові слова: модель, гострий експериментальний панкреатит, морфологія, лікування.

Резюме

Работа посвящена изучению патологических изменений ткани поджелудочной железы крыс с L-аргинин-индуцированным острым экспериментальным панкреатитом, а также морфологическому тестированию лечебных эффектов различных форм даларгина и NG-нитро-L-аргинина. Показано, что в условиях использованной нами модели ГЭП, индуцированного двукратной инъекцией L-аргинина, в тканях поджелудочной железы формируются изменения, характерные для острого патологического процесса: воспаление, геморрагии, некроз. Это подтверждает адекватность использованной нами модели соответствующему клиническому состоянию.

Использование свободной и липосомальной форм даларгина также способствует нормализации макро- и микроскопических изменений ткани ПЖ. При этом эффективность липосомальной формы даларгина в 1,5 раза превышала таковую у свободной формы пептида. Полученные данные являются экспериментальным обоснованием целесообразности использования ингибиторов синтеза оксида азота и липосомальных форм опиоидных пептидов в лечебных мероприятиях при остром панкреатите в клинике.

Ключевые слова: модель, L-аргинин, острый экспериментальный панкреатит, морфология, лечение.

Згідно з результатами останніх численних досліджень гострий панкреатит (ГП) є асептичним запаленням демаркаційного характеру, в основі якого лежать процеси некробіозу панкреоцитів та ферментної аутоагресії з послідуочим розвитком некрозу, дегенерації залози та приєднанням вторинної інфекції [4,5].

Важливим місцем серед причин високої смертності, яка досягає при деструктивних формах ГП 30 – 40 %, займає пізня діагностика або її помилки, неадекватний вибір консервативної чи оперативної тактики [2,7,9,12]. На механізми виникнення, характеру перебігу і розповсюдження патологічного процесу значно впливає те що підшлункова залоза (ПЗ), розвиваючись із трьох зародків ентодерми кишкової трубки, зберігає деяку розрізненість анатомічних частин: голівки, тіла й хвоста.

При аналізі відомих нам класифікацій, які засновані на різноманітності морфологічних проявів та варіантах клінічного перебігу ГП, провідним є те, що відрізняються вони лише принципом побудови й різним трактуванням термінів відповідно до рівня знань про патогенетичну сутність форм та варіантів перебігу хвороби [6,7].

Проведені за останні роки дослідження відносно патогенезу ГП свідчать, що важлива роль у пусковому механізмі розвитку патологічного процесу відводиться оксиду азоту [1-3]. Йдеться про цитотоксичні ефекти цієї субстанції та її прозапальну дію. Основним у розвитку гострого запалення паренхіми підшлункової залози є те - що окис азоту індукує вазодилатацію, локальне ураження паренхіми органу та ішемію [3]. Саме це і явилось підставою для вивчення основних патогенетичних ланок перебігу ГП на моделі L-аргінин-індукованого гострого експериментального панкреатиту (ГЕП) з ціллю пошуку нових методів діагностики та лікування зазначеного патологічного процесу.

Мета роботи - вивчення патоморфологічних змін тканини ПЗ у щурів з L-аргінин-індукованим ГЕП, а також морфологічне тестування лікувальних ефектів різних форм даларгіну за цих умов [8]. Літературні дані свідчать про короткочасну активність даларгіну в кровоносному руслі внаслідок його руйнування під впливом пептидаз, що стало підставою до експериментів, проведених на лабораторних тваринах з метою дослідження принципової можливості підвищення ефективності лікування ГЕП

шляхом застосування ліпосомальної форми даларгіну. З урахуванням прогресивності розвитку патологічних змін у тканині ПЗ при різних моделях ГЕП, було оцінено лікувальну ефективність речовин за морфологічними змінами через 24 години з моменту індукції гострого запального процесу [9,10].

Матеріал та методи дослідження. Дослідження виконані за умов гострого експерименту на 83 статевозрілих щурах лінії Вістар масою 160—200 г у відповідності до вимог GLP та комісії з біоетики ОНМедУ (протокол № 84 від 10 жовтня 2008 р.). Результати досліджень було схвалено комісією ОНМедУ з біоетики проведення експериментальних досліджень.

У експериментальних тварин ГЕП відтворювали двома внутрішньоочеревинними ін'єкціями 20 % розчину L-аргініну ('Sigma Chemical Co', USA) в сумарній дозі 5 г/кг, з інтервалом введення в 1 год за методикою Szako L. et al.(2000). Щурам групи контролю вводили по 2,5 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Максимальна вираженість біохімічних, морфологічних та інших неспецифічних показників, що характеризують перебіг L-аргінін-індукованого ГЕП виявляється через 24 год з моменту його відтворення [9,10]. Евтаназію тварин для подальших біохімічних та морфологічних досліджень здійснювали внутрішньоочеревинним введенням етаміналу натрію в дозі 100 мг/кг. З лікувальною метою ліпосомальну та вільну форми даларгіну вводили одноразово, через 30 хв після ін'єкції L-аргініну

Враховуючи мету та задачі дослідження всі експериментальні тварини були розподілені на чотири групи: 1 група — контроль; 2 група — щури з ГЕП; 3 група — щури з ГЕП, яким вводили даларгін; 4 група — щури з ГЕП, яким вводили ліпосомальний даларгін. В кожному з названих груп входило не менш 10 тварин.

Після евтаназії у тварин виділяли підшлункову залозу, фіксували у 10 % нейтральному формаліні і занурювали в парафін. Згідно стандартної методики готували зрізи тканини з наступним фарбуванням гематоксилін-еозином, проводили мікроскопію при збільшенні $\times 250$. Макро - та мікроскопічні зміни фіксували в балах за методикою Hughes C.V. et al. [11]. Поверхню залози умовно розділяли на квадранти площею $0,01\text{см}^2$, у кожному з яких вивчалися морфологічні зміни в паренхімі та морфофункціональні порушення мікросудинного русла ПЗ із кількісним визначенням запальних і постзапальних ознак. Якщо площа квадранту нормальної структури залози, становила менше 50 % такий квадрант не брали до уваги. Підрахунок робили в 10 квадрантах ПЗ, узятій від кожного щура.

Статистичну обробку проводили за допомогою комп'ютерної програми статистичного аналізу "Statgraph", яка є прийнятною для проведення медико-біологічних досліджень.

Результати дослідження та їх обговорення. Макро- та мікроскопічні зміни в ПЗ за умов цієї моделі ГЕП відповідали характерним змінам морфологічної будови залози при ГП. Макроскопічно через 24 год залоза була збільшена, щільна, на розрізі – темно-червоного кольору з ділянками незміненої структури. Гістологічно виявлялися різномасштабні вогнища геморагічного некрозу ацинарної тканини з геморагічним просиченням інтерстицію та жировими некрозами клітковини. В судинах органа виявлялися розповсюджені судинні зміни у вигляді повнокрів'я, агрегації формених елементів крові, тромбозу, а також ураження судинних стінок у вигляді фібриноїдного просичення.

За умов застосування з лікувальною метою даларгіну показники набряку ПЗ у щурів були на 26 % меншим відносно аналогічних даних у щурів з ГЕП без лікування ($p < 0,01$). Показники геморагії та жирового некрозу тканини ПЗ при цьому були на 29 % ($p < 0,01$) та 19 % ($p < 0,05$), відповідно, меншими у порівнянні з аналогічними даними в щурів з ГЕП без лікування. Відмічалось також істотне зменшення під впливом даларгіну проявів асцити (у 2,5 рази; $p < 0,001$) та явищ запальної реакції тканини залози (у 2 рази; $p < 0,05$) щодо аналогічних даних, отриманих нами в групі щурів з ГЕП без лікування.

Після введення з лікувальною метою ліпосомального даларгіну показники набряку ПЗ в щурів склали на 44 % менше щодо аналогічних даних у щурів з ГЕП без лікування ($p < 0,001$) та на 25 % менше аналогічного результату, отриманого при введенні «вільної» форми пептиду ($p < 0,001$). Показники геморагії та жирового некрозу тканини ПЗ при цьому були на 61 % ($p < 0,001$) та 43 % ($p < 0,01$), відповідно, менше в порівнянні з аналогічними даними в щурів з ГЕП без лікування, а також на 45 % ($p < 0,001$) та 30 % ($p < 0,001$), відповідно, менше в порівнянні з аналогічними даними в щурів з ГЕП, яким вводили неліпосомальну форму пептиду. Показники запалення та ацинарного некрозу тканини ПЗ під впливом ліпосомального даларгіну були на 84 % ($p < 0,001$) та 68 % ($p < 0,01$), відповідно, менше в порівнянні з аналогічними даними в щурів з ГЕП без лікування, а також на 68 % ($p < 0,01$) та 29 % ($p > 0,05$), відповідно, менше в порівнянні з аналогічними даними в щурів з ГЕП, яким вводили неліпосомальну форму пептиду.

Таким чином, ліпосомальний даларгін впливав на виразність макро- та мікроскопічних ознак ГЕП. Його позитивні ефекти були значнішими порівняно з вільним даларгіном ($p < 0,05$) [12]. Йдеться про усунення морфологічних ознак запалення тканини

ПЗ. Ймовірно, що протективна дія ліпосомальних форм опіоїдних пептидів спрямована переважно на зменшення інтенсивності процесів запалення паренхіми залози. Морфологічний аналіз структури клітин паренхіми ПЗ дозволив зробити припущення, що одним із механізмів вказаної дії ліпосомальних форм опіоїдних пептидів є стабілізація клітинних мембран.

Висновки.

1. Результати досліджень свідчать, що перебіг L-аргінін-індукованого ГЕП супроводжується формуванням морфологічних змін у тканині ПЗ, що проявляються наявністю набряку, геморагій, жирового некрозу, ознаками запалення та ацинарного некрозу тканини залози, а також асцитом, що підтверджує адекватність використаної нами моделі відповідному клінічному стану.

2. За умов L-аргінін-індукованого ГЕП виражену лікувальну ефективність мали обидві форми даларгіну. При цьому лікувальна ефективність ліпосомальної форми даларгіну істотно перевищувала таку у неліпосомальній формі пептиду. Факт більш вираженої лікувальної ефективності ліпосомальної форми даларгіну підтвердив наші припущення щодо доцільності залучення даларгіну в ліпосомальну оболонку з метою подовження тривалості його перебування в кровоносному руслі та підвищення його активності, що свідчить про доцільність початку клінічних дослідів цієї речовини.

Перелік літератури

1. Демидов В. М. Роль ендогенного окису азота в патогенезі гострого панкреатиту у щурів / В. М. Демидов, С. М. Демидов // Досягнення біології та медицини. – 2003.— № 2 (2). – С. 16—21.
2. Лобенко А. О. NO-опосередковані механізми експериментального панкреатиту / А. О. Лобенко, В. М. Демидов, С. М. Демидов // Журнал АМН України. –2002. – Т.8, № 2. – С. 385—393.
3. Kikuchi Y. The role of nitric oxide in mouse cerulein-induced pancreatitis with and without lipopolysaccharide pretreatment / Y. Kikuchi, T. Shimosegawa, A. Satoh // Pancreas. — 1996. — Vol .12, № 1. — P. 68—75.
4. Мартов Ю. Б. Острый деструктивный панкреатит / Ю. Б. Мартов, В. В. Кирковский, В. Ю. Мартов. – М : Медицинская литература, 2001. – 78 с.

5. Suda K. Histopathologic and immunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis / K. Suda, T. Ogama, V. Matsumoto // *Am. J. Gastroenterology*. - 1990. - Vol. 85, N 3. - P. 271-276.
6. Савельев В.С. Острый панкреатит / В. С. Савельев, В. М. Буянов, Ю. В. Огнев. – М : Медицина, 1983. - 124 с.
7. Tani S. Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal cerulein stimulation / S. Tani, M. Otsuki, H. Itoh // *Int. Pancreatol.* -1987. - Vol. 2, N 2. - P. 337-348.
8. Демидов В. М. Даларгін сприяє покращенню лікування гострого панкреатиту за умов експериментального його відтворення / В. М. Демидов, О. А. Синовець, О. Л. Кошельник // *Матеріали XIV з'їзду терапевтів України*. - Київ, 1998. - С. 102-103.
9. Czako L. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: Inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin / L. Czako, T. Takacs, I. S. Varga // *Physiology (Paris)*. – 2000. – Vol. 94. - P. 43-50.
10. Varga I. S. Oxidative stress changes in L-arginine-induced pancreatitis in rats / I. S. Varga, B. Matkovics, L. Czako // *Pancreas*. – 1997. – Vol. 14. – P. 355–359.
11. Hughes C. B. Inhibition of TNF- α improves survival in an experimental model of acute pancreatitis / C. B. Hughes, L. W. Gaber, A. B. M. El-Din // *The Am. J. Surg.* - 1996. - Vol. 62, N 1. - P. 8-13.
12. Демидов В. М. Ліпосомальні форми даларгіну та сандостатину сприяють розвитку позитивного ефекту за умов експериментального гострого панкреатиту у щурів / В. М. Демидов, С. М. Демидов, С. В. Ціповяз // *Гастроентерологія*. – 2000. – Вип. 31. – С. 80—87.

References

1. Demidov V. M. Endogenous nitric oxide pathogenetical role in the acute pancreatitis in rats / V.M.Demidov, S.M.Demidov // *Adv. Biol. Med.* – 2003.— N 2 (2). – P. 16—21 (In Ukrainian).
2. Lobenko A.O. NO-mediated mechanisms of the experimental pancreatitis / Lobenko A.O., Demidov V.M., Demidov S.M. // *J. Acad. Med. Sci. Ukraine*. –2002. – Vol. 8, N 2. – P. 385—393 (In Ukrainian).
3. Kikuchi Y. The role of nitric oxide in mouse cerulein-induced pancreatitis with and without lipopolysaccharide pretreatment / Y. Kikuchi, T. Shimosegawa, A. Satoh // *Pancreas*. — 1996. — Vol .12, № 1. — P. 68—75.

4. Martov Yu. B. Acute destructive pancreatitis / Yu. B. Martov, V. V. Kirkovsky, V. Yu. Martov. – M : Medical literature, 2001. – 78 p (In Russian).
5. Suda K. Histopathologic and immunohistochemical studies on alcoholic pancreatitis and chronic obstructive pancreatitis / K. Suda, T. Ogama, V. Matsumoto // *Am. J. Gastroenterology*. - 1990. - Vol. 85, N 3. - P. 271-276.
6. Savelyev V. S. Acute pancreatitis / V. S. Savelyev, V. M. Buyanov, Yu. V. Ognev. – M : Medicine, 1983. - 124 p.
7. Tani S. Histologic and biochemical alterations in experimental acute pancreatitis induced by supramaximal caerulein stimulation / S. Tani, M. Otsuki, H. Itoh // *Int. Pancreatol.* -1987. - Vol. 2, N 2. - P. 337-348.
8. Demidov V. M. Dalargin improves experimental acute pancreatitis treatment / V. M. Demidov, O. A. Synovets, O. L. Koshelnik // *Abstr. XIV Congr. of Therapeutists of Ukraine*. - Kyiv, 1998. - P. 102-103 (In Ukrainian).
9. Czakó L. The pathogenesis of L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis: Inflammatory mediators and endogenous cholecystokinin / L. Czakó, T. Takács, I. S. Varga // *Physiology (Paris)*. – 2000. – Vol. 94. - P. 43-50.
10. Varga I. S. Oxidative stress changes in L-arginine-induced pancreatitis in rats / I. S. Varga, B. Matkovics, L. Czakó // *Pancreas*. – 1997. – Vol. 14. – P. 355–359.
11. Hughes C. B. Inhibition of TNF- α improves survival in an experimental model of acute pancreatitis / C. B. Hughes, L. W. Gaber, A .B .M. El-Din // *The Am. J. Surg.* - 1996. - Vol. 62, N 1. - P. 8-13.
12. Demidov V. M. Dalargin and sandostatin liposomal forms induce positive effects in conditions of experimental acute pancreatitis in rats / V. M. Demidov, S. M. Demidov, S. V. Tsypoviaz // *Gastroenterol.* – 2000. – Vol. 31. – P. 80—87 (In Ukrainian).