



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61631 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G09B 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПАНКРЕАТИТУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

1

(21) u201015739

(22) 27.12.2010

(24) 25.07.2011

(46) 25.07.2011, Бюл.№ 14, 2011 р.

(72) КРИЛОВА ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА, РУДЕНКО АНАТОЛІЙ ІВАНОВИЧ, ГАЙДАР ЮРІЙ АДОЛЬФОВИЧ, МАКАРЧУК ВІКТОРІЯ АНАТОЛІЇВНА, ОПИХАЙЛО МАКСИМ СЕРГІЙОВИЧ, ЧЕЛКАН ВІРА ВОЛОДИМИРІВНА

2

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ

(57) Спосіб моделювання панкреатиту в експерименті, який включає введення діючої речовини внутрішньочеревинно, який **відрізняється** тим, що щурам вводять N^G-нітро-L-аргінін.

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до способів моделювання панкреатиту, може бути використана у лабораторіях та науково-дослідних установах для вивчення ефективності терапевтичних агентів.

Постійна увага до проблеми панкреатиту обумовлена тим, що це прогресуюче захворювання підшлункової залози (ПЗ), яке характеризується появою під час загострення гострого запального процесу, поступовим заміщенням паренхіми органа сполучною тканиною й розвитком недостатності екзо- й ендокринної функції залози.

В останні роки надається велике значення ролі оксиду азоту (NO) і його метаболітів у різних фізіологічних і патологічних процесах, у патогенезі різних захворювань, шлунково-кишкового тракту.

Доведено подвійну роль цього універсального ендогенного регулятора, здатного надавати як пошкоджуючі, так і захисні дії на слизову оболонку, які багато в чому залежать від концентрацій цієї сполуки. NO регулює моторику травного тракту, шлункову секрецію, мікроциркуляцію, стимулює секрецію слизу і у фізіологічних умовах надає цитопротективну дію. Вважають, що на ранніх етапах розвитку запалення в слизовій оболонці відбувається підвищення продукції NO, що є компенсаторним механізмом для забезпечення кровопостачання та підтримки високого рівня метаболізму в тканинах за рахунок прямої вазодилатації. При прогресі захворювання відбувається виснаження джерел синтезу NO (L-аргінін) і зниження його виділення, що призводить до підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів, зниження фібринолітичної активності крові, порушення регуляції судинного тонуусу і розвитку мікротромбозів судинної системи. Негативна дія вмісту NO починає ви-

являтися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, що призводить до функціонального та структурного пошкодження органу.

Тому участь NO в розвитку патологічного процесу не викликає сумніву. Відома участь NO-синтаз (NOS) в розвитку експериментального панкреатиту. Вона обумовлена дією високих доз L-аргініну на підшлункову залозу. Однак, логічно припустити, що неспецифічне інгібування всіх ізоформ NOS спричинить ураження ПЗ, яке виникає внаслідок інгібування iNOS, eNOS і nNOS, тобто пов'язане з порушенням перфузії, нервової регуляції та антимікробного захисту ПЗ. У зв'язку з цим правомірним є створення нової моделі експериментального панкреатиту, що ґрунтується на інгібуванні неспецифічної NOS.

Більшість моделей гострого панкреатиту отримують за допомогою механічної дії, спеціальних дієт або вливань в протоку підшлункової залози.

Хронічний панкреатит у тварин важко відтворити, оскільки важко імітувати характерні клінічні або морфологічні особливості. Існуючі моделі фокусують увагу на різних аспектах панкреатиту, але не об'єднують характерні зміни підшлункової залози, які спостерігаються у людей.

Так, існує модель панкреатиту, яка виникає за рахунок тимчасової оклюзії біліопанкреатичних протоків та введення 12 г/кг алкоголю щодня протягом 2 місяців (Pap A. Alcohol-induced chronic pancreatitis in rats after temporary occlusion of biliopancreatic ducts with Ethibloc/A. Pap, U. Boros // Pancreas.-1989. - V 4. - P.249-255). Ця модель дуже нагадує клінічну ситуацію пацієнтів, що страждають на хронічний алкогольний панкреатит. Од-

(19) UA (11) 61631 (13) U

нак, відтворення цієї моделі потребує тривалого часу та зусиль.

Існує модель відтворення ХП шляхом щоденного введення щурам розчину кальцію хлориду (50 мг/кг, внутрішньочеревно) протягом 7 тижнів (Демидов С.М. Оптимизация лечения хронического панкреатита путем сочетанного воздействия инфракрасного лазерного излучения и введения далагина в экспериментальных условиях / С.М. Демидов, А.А. Горбунов, И.В. Гомонюк // Вісник морської медицини.-2001. - № 2 (14). – С. 13-16).

Даний спосіб, як найбільш близький до того, що заявляється, за суттю та ефектом який досягається, вибрано за прототип.

Недоліком способу є те, що необхідно тривале введення розчину кальцію хлориду для відтворення моделі панкреатиту.

В основу корисної моделі, що заявляється, поставлена задача розробити ефективну модель панкреатиту, яку можна відтворити за невеликий проміжок часу, яка максимально характеризує зміни підшлункової залози при панкреатиті у людей та дає змогу прослідити всю динаміку патологічного процесу - від норми через передпатологічний стан до панкреатиту.

Загальними ознаками прототипу та способу що заявляється є те, що для відтворення моделі панкреатиту щурам діюча речовина вводиться внутрішньочеревинно.

Відмінними ознаками є те, що для відтворення моделі панкреатиту використовується N^G-нітро-L-аргінін.

Вирішення поставленої задачі виконували шляхом експериментальних досліджень на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар, масою 220-280 г. За 16-20 годин до експерименту тварин піддавали харчовій депривації при вільному доступі до води. Всього було проведено 2-е серії експериментів. Блокування NO-синтази здійснювалося за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції N^G-нітро-L-аргініну (L-NNA, виробництво Sigma-Aldrich) (40 мг/кг маси тіла). В 1-й серії досліджень (n=10) тваринам вводили неспецифічний інгібітор NOS нітро-L-аргініну протягом 6-ти та протягом 12-ти днів. В 2-й контрольній серії щурам внутрішньочеревинно вводили стерильний фізіологічний розчин.

Екскреторну функцію ПЗ оцінювали за активністю амілази, ліпази та трипсину крові за відомими методами.

Після закінчення дослідження тварин декапітували після попереднього введення етаміналу натрію (85 мг/кг), підшлункову залозу резекували та відразу фіксували в середовищі Bouin і готували мікроскопічні зрізи тканини із забарвленням гематоксилін-еозин та за Маллорі-Слінченко.

Для уточнення ступеня макроморфологічних змін підшлункової залози, її видаляли, промивали фізіологічним розчином та фіксували в розчині Боуена.

Моделювання недостатності NO-синтази (на 6 день) не супроводжувалося погіршенням загального стану тварин, тоді як у подальшому, на 12 день спостерігались зміни - поведінка щурів в умовах звичайного середовища перебування (в клітці) ставала більш пасивною стосовно будь-якого пе-

ресування; погіршувався апетит, а також відмічалось незначне зменшення на 5,0-9,0 грамів маси тіла кожної тварини.

Зміна загального стану тварин супроводжувалась морфологічними змінами підшлункової залози. Так, у більшості щурів на 12-й день недостатності NO-синтази визначались морфологічні зміни.

При морфологічному дослідженні у всіх щурів, яким вводили інгібітор NOS, було виявлено панкреатит з різним ступенем ушкодження паренхіми. Характерна наявність повнокрів'я, стази в дрібних судинах, вираженого набряку навколо часточок ПЗ, що вказує на порушення кровообігу в залозі із наступним руйнуванням ацинарної тканини.

На 6 добу у ПЗ усіх щурів спостерігались різні розміри вогнища ушкодження ацинарної тканини, а саме: мембрани ацинарних клітин місцями не контурувались, відзначались виражений перичелюлярний набряк, гіперхромія ядер ацинарних клітин, місцями - зменшення їх розмірів, наявність помірно вираженої дифузної інфільтрації стромы лімфоцитами і переважно сегментоядерними нейтрофілами.

Примітно, що біля великих проток також виявлялась помірно виражена дифузна лімфогістіоцитарна інфільтрація з наявністю сегментоядерних нейтрофілів і поодиноких плазмодитів. Місцями серед пошкодженої ацинарної тканини зустрічались 4-5 незмінених ацинарних клітин, які вціліли. При цьому, запальна реакція в основному проявлялась перидуктулярно, особливо поблизу великих вивідних протоків. При цьому встановлено, що острівці Лангерганса не постраждали - серед патологічно зміненої тканини виявлялись звичайної форми і розмірів інтактні острівці ендокринної тканини. У контрольних тварин спостерігалась гістологічно незмінена ПЗ.

Морфологічні зміни супроводжувались змінами зовнішньосекреторної функції ПЗ. На 6-у добу рівень ферментативної активності ПЗ зростав: достовірно збільшився рівень α -амілази та ліпази в 1,4 рази, активність трипсину - майже у 9,0 раз (таблиця).

В подальшому на 12 добу моделювання панкреатиту активність в крові щурів амілази та ліпази незначно зросла по відношенню до 6-ї доби, тоді як активність трипсину навпаки достовірно знизилась в 1,4 рази. Цей факт можна розглядати як захисний адаптаційно-компенсаторний механізм спрямований проти пошкодження ПЗ.

Отже неспецифічне інгібування усіх ізоформ NOS спричиняє ураження ПЗ, яке виникає внаслідок інгібування iNOS, eNOS і nNOS, тобто пов'язане на ранніх етапах як з порушенням перфузії, так і з нітроергічною ланкою регуляції, а в подальшому і антимікробним захистом ПЗ. У зв'язку з цим правомірним є створення нової моделі експериментального панкреатиту, що ґрунтується на інгібуванні неспецифічної NOS.

Таблиця

Ферментативна активність сироватки крові щурів при тривалому введенні нітро-L-аргініну

Показник	Контроль (n=8)	6-та доба (n=8)	12-та доба (n=6)
	M±m	M±m	M±m
α-амілаза, г/ч·мл	93,32±19,63	132,66±2,49*	142,2±3,31*
Ліпаза, мл нМоль/сл	2,01±0,02	2,38±0,11*	2,40±0,14*
Трипсин, мкМ/мл/хв	3,50±1,42	9,02±2,65	2,66±0,92*

Примітка

* - $p < 0,01$ - вірогідність змін між показниками груп щурів у порівнянні з групою контролю

Раніше повідомлялося, що NO є головним медіатором, який визначає розслаблення сфінктера Одді, анального сфінктера. Виходячи з того, що NO впливає не тільки на кровообіг судин ПЗ, але і регулює сфінктер Одді, нами було зроблено припущення, що тривале блокування нітроергічної ланки регуляції (веденням неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G-нітро-L-аргініну) створює ситуацію, що наближається до клінічних умов, а саме спазм сфінктеру Одді, порушення мікроциркуляції, що веде до пошкодження паренхіми ПЗ, посилення зовнішньосекреторної активності ПЗ. Це тільки один з можливих патогенетичних механізмів розвитку патологічного процесу, який може відбуватися в ПЗ особливо на початкових, тобто передпатологічних станах розвитку панкреатиту.

Таким чином, створено новий спосіб моделювання панкреатиту на щурах який індуковано тривалим блокуванням нітроергічної ланки регуляції, на основі застосування неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G-нітро-L-аргініну, як домінуючого фактора первинного гострого панкреатиту, а в подальшому, розвитку хронічного панкреатиту.

Тривале блокуванням нітроергічної ланки регуляції неспецифічним блокатором NO-синтаз N^G-нітро-L-аргініну супроводжується зростанням зовнішньосекреторної функції ПЗ.

У порівнянні з прототипом, запропонована модель панкреатиту є легше відтворюваною, потребує менше часу та менш працезатратна. Так, в прототипі необхідно було в 3,5 разів більше часу для отримання результату в порівнянні зі способом, який заявляється.