



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **87879** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G09B 23/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 09989	(72) Винахідник(и): Шевченко Борис Федорович (UA), Бабій Олександр Михайлович (UA), Руденко Анатолій Іванович (UA), Макарчук Вікторія Анатоліївна (UA), Ошмянська Наталія Юріївна (UA), Галінський Олексій Олексійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.08.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2014, Бюл.№ 4	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ, пр. Правди, 96, м. Дніпропетровськ, 49074 (UA)

(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ

(57) Реферат:

Спосіб моделювання хронічного панкреатиту включає порушення рівня оксиду азоту шляхом внутрішньочеревного введення діючої речовини. Розчин нітропрусиду натрію виготовлений ex tempore вводять один раз на добу з розрахунку 1,5 мг сухої речовини на кілограм ваги лабораторним тваринам протягом 30 діб.

UA 87879 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до способів моделювання панкреатиту в експерименті, може бути використана у лабораторіях, науково-дослідних установах, для вивчення ефективності різних лікарських препаратів на перебіг та розвиток експериментального хронічного панкреатиту (ХП) у дрібних лабораторних тварин.

ХП - запальне захворювання підшлункової залози (ПЗ), яке характеризується рецидивуючими панкреатичними атаками, прогресуючим фіброзом, асоційованим з незворотними структурними змінами її паренхіми, що призводить до розвитку екзокринної, а пізніше й до ендокринної недостатності. Гострий панкреатит відрізняється від ХП тим, що це частіше одна атака запального процесу, після якої функціональний та морфологічний стан ПЗ може повернутись до норми.

Провідні панкреатологи всього світу в процесі дискусій прийшли до висновку, що панкреатит є мультифакторним захворюванням, при якому залишається не до кінця вивченими патогенетичні механізми розвитку патологічних змін в ПЗ та участі оксиду азоту (NO) в цьому процесі.

Відомо, що NO здійснює міжклітинну комунікацію і регуляцію важливих фізіологічних функцій, таких як вазодилатація, нейротрансмісія, зниження агрегації тромбоцитів, активацію процесів запам'ятовування, регуляцію тонуусу гладких м'язів, впливає на перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) під час розвитку і протікання запальних процесів.

З одного боку, в шлунково-кишковому тракті NO регулює мікроциркуляцію, секрецію та моторику, та, за фізіологічних умов, має цитопротекторну дію. NO є головним інгібіторним медіатором, що забезпечує розслаблення гладкої мускулатури стравоходу, шлунка, тонкої та товстої кишок, жовчного міхура, сфінктера Одді, а також приймає участь у дуоденальній секреції бікарбонатів. З іншого боку, вступаючи в реакцію з киснем, NO утворює пероксинітрит і приймає участь у формуванні запальних процесів в шлунку, ПЗ та кишечнику. Негативний вплив NO починає проявлятися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, призводячи до функціонального та структурного пошкодження органу (в залежності від дози та тривалості впливу). Поліморфізм прояву його впливу пов'язаний з присутністю в травній системі різних форм NO-синтаз.

NO, як яскравий та потужний "модератор" багатьох фізіологічних функцій, приймає участь не тільки при гострих станах, але й при хронічних запальних процесах, зокрема при ХП. Відомо що дефіцит або гіперпродукція NO може мати як про-, так й протизапальні властивості. Так, при ХП дефіцит NO може сприяти інтенсифікації ПОЛ і виснаженню резервних можливостей антиоксидантного захисту. В свою чергу, хронічне запалення ПЗ та прогресування фіброзу у її тканині призводить до розвитку нутритивної недостатності і зменшення надходження основного субстрату для синтезу NO. Підвищений рівень ліпопротеїдів низької щільності при ХП з порушенням ліпідним обміном також призводять до зменшення продукції NO. Але, все ще бракує досліджень про роль NO та його взаємозв'язок з показниками окислювального стресу при загостренні ХП. В дослідженнях Петракова А.В. (А.В. Петраков та ін., 2011 р.) показано прямий кореляційний зв'язок між підвищенням рівня NO в сироватці крові пацієнтів та загостренням ХП. Таким чином, збільшення рівня NO пов'язано з активацією процесів ПОЛ, що в свою чергу може призводити до посилення уражень ПЗ. Отже, участь NO в розвитку патологічних процесів в ПЗ не викликає сумніву. У зв'язку з цим, правомірним є створення нової моделі експериментального ХП, що ґрунтується на порушенні балансу NO - ергічної системи регуляції шляхом введення донатора NO.

ХП у тварин досить важко відтворювати, оскільки складно імітувати характерні клінічні або морфологічні особливості, так як розвиток патології в більшості випадків викликається порушеннями не тільки на морфологічному, а й на функціональному рівнях. Існуючі моделі фокусують увагу на різних аспектах ХП, але не об'єднують характерні загальні зміни ПЗ, які спостерігаються при перебігу цієї патології.

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

Існує спосіб моделювання панкреатиту в експерименті, який включає введення піддослідним тваринам блокатора NO-синтаз NG-нітро-L-аргініну (40 мг/кг, внутрішньочеревно) протягом 12 діб (Крилова О.О. Роль NO в розвитку хронічного панкреатиту // Буковинський медичний вісник. - 2011. - Том 15. № 2 (58). - С. 218-221).

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

Недоліком способу є те, що він не враховує єдину ланку механізмів розвитку ХП, яка ґрунтується на патологічному впливі підвищеного рівня NO.

5 В основу корисної моделі поставлена задача розробити ефективну модель ХП, яку можна відтворити за відносно короткий проміжок часу, яка максимально характеризує зміни ПЗ, викликані порушенням регуляторних механізмів, а не токсичною дією різних агентів та дає змогу прослідити всю динаміку патологічного процесу - від норми до панкреатиту.

10 Поставлена задача вирішується тим, що для відтворення моделі ХП щурам порушують баланс NO, за допомогою введення діючої речовини внутрішньочеревно.

Відмінною ознакою є те, що для відтворення моделі ХП використовується донатор готових молекул NO - нітропрусид натрію:

15 Дослідження проведено на 40 лабораторних білих щурах-самцях лінії Wistar вагою 180-230 г. Експеримент проводився шляхом внутрішньочеревного введення донатора NO нітропрусиду натрію виробництва "Реахим" (Україна) в дозі 1,5 мг / кг протягом 1 доби (n=6); 2 діб (n=6); 6 діб (n=6); 12 діб (n=6); 30 діб (n=6). Розчин готували безпосередньо перед експериментом (згідно з рекомендаціями виробника препаратів) і вводили тваринам внутрішньочеревно о 9-10 годині ранку. Контрольну групу (n=8) становили інтактні щури, яким внутрішньочеревно вводили 0,9 % розчин NaCl протягом 1, 2, 6, 12 і 30 діб.

20 Після закінчення дослідження тварин декапітували після попереднього введення летальної дози кетаміну гідрохлориду (200 мг/кг). Для виконання гістологічних досліджень ПЗ відчищали від жиру і лімфатичних вузлів. Після цього ПЗ фіксували в 10,0 % розчині нейтрального забуферованого формаліну для подальшого гістологічного дослідження. Біоптати зневоднювали в спиртах висхідної концентрації і заливали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 3-5 мкм були пофарбовані гематоксиліном і еозином і за Маллорі в модифікації Слінченко.

30 Біохімічні процеси фіброзу ПЗ оцінювали за вмістом у сироватці крові оксипроліну вільного (ОПв), оксипроліну білковозв'язаного (ОПб/зв) і гексозамінів (ГА). Продукцію NO визначали за сумарним вмістом нітритів / нітратів у сироватці крові за допомогою реактиву Гріса. Для оцінки зовнішньосекреторної функції ПЗ в сироватці крові визначали активність панкреатичних ензимів: α -амілази набором фірми "Філісіт-діагностика" і трипсину - по Ерлангеру в модифікації Шатернікова. Стан інкреторної функції ПЗ було досліджено за допомогою визначення рівня глюкози сироватки крові (глюкозооксидазний метод) набором фірми "Філісіт-діагностика".

35 Морфологічний аналіз показав, що після 1-добового та 2-добового введення неспецифічного донатора NO натрію нітропрусиду у 100 % тварин в тканині ПЗ відзначалися дилатація судин і протоків, накопичення та застій секрету (схема. 1) Ступінь вираженості даних ознак варіював від незначного до помірного ступеня і не залежав від тривалості введення нітропрусиду натрію.

Суть корисної моделі пояснює креслення.

40 Фіг. 1. ПЗ щура через 24 години (ліворуч) та через 48 годин (праворуч). Дилатація протоків і судин, накопичення та застій секрету. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченко. $\times 100$.

Після 6 доби введення препарату відзначалися ознаки панкреатиту, структурною основою якого були ознаки запалення - інфільтрація строми лімфоцитами і нейтрофільними лейкоцитами, дилатація судин і внутрішньо часточкових протоків, стаз клітин крові. У 66,6 % усіх випадків виявлені великі групи ацинарних клітин в стані гіперсекреції. У 75,0 % даних випадків серед цих клітин зустрічалися поодинокі дрібні вогнища некрозу.

45 Після 12 доби явища повнокров'я судин ПЗ і стази формених елементів крові ставали найбільш вираженими. У 100 % випадків строма дифузно інфільтрована клітинами запалення, відзначається надмірне накопичення секрету в ацинарних клітинах, сегментарний апоптоз ацинарної тканини. У 66,6 % тварин розвивається вогнищева дрібно- і крупнокрапельна жирова дистрофія.

50 Незважаючи на виражену запальну активність, яка відзначалася після 12 доби від початку експерименту, у всіх тварин, які були виведені з експерименту через 30 діб щоденного введення нітропрусиду натрію, мікроциркуляторні зміни майже повністю компенсовані. Діаметр судин не відрізнявся від групи порівняння, інфільтрація або не визначалася, або була мінімальною. При цьому на тлі "спокійної" ацинарної тканини у 83,3 % випадків відзначалися дилатація між часточкових протоків і розвиток сполучної тканини. Пухка фіброзна тканина огортала магістральні протоки і великі судини, проникала в міжчасточковий простір (схема 2).

Фіг. 2. А) ПЗ щура на 6 добу експерименту. Дилатація судин і внутрішньо часточкових потоків, стаз клітин крові, запальна інфільтрація. Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченко. x200;

Б) ПЗ щура на 12 добу експерименту. Виражена дилатація судин зі стазом формених елементів крові, жирова дистрофія ацинарних клітин. Забарвлення гематоксиліном і еозином. x400;

В) ПЗ щура на 30 добу експерименту. Розвиток пухкої фіброзної тканини перидуктулярно (навколо магістральних проток). Забарвлення за Маллорі в модифікації Слінченко. x100.

Розвиток у щурів ХП, викликаний введенням донатора NO нітропрусида натрію, супроводжувався змінами біохімічних показників в крові, що характеризують процеси метаболізму сполучної тканини. Так, про збільшення синтезу колагену свідчило зростання після 30 доби вмісту ОПб/зв в 1,4 разу з $(179,28 \pm 9,19)$ мкмоль/л (контрольна група) до $(243,81 \pm 15,35)$ мкмоль/л ($p < 0,01$), а про збільшення його розпаду - зростання ОПв в 1,5 разу до $(16,37 \pm 1,39)$ мкмоль/л ($p < 0,01$) і в 1,8 разу до $(18,01 \pm 3,37)$ мкмоль/л ($p < 0,05$) на 12 і 30 добу відповідно в порівнянні з групою контролю $(9,96 \pm 0,77)$ мкмоль/л. Слід зазначити, що концентрація ОПб/зв в крові експериментальних тварин з 30-добовим введенням препарату була достовірно вище, ніж при 1-добовому ($p < 0,01$), 2-добовому ($p < 0,01$) та 6-добовому ($p < 0,05$) його введеннях (табл. 1).

Зростання вмісту ГА в крові свідчило про посилення розпаду вуглеводно-білкових компонентів сполучної тканини, оскільки ГА входять до складу як протеогліканів, так і глікопротеїнів - її складових. Зростання вмісту ГА є чинником, який характеризує запалення. Провідну роль при цьому відіграють протеолітичні ензими поліморфноядерних лейкоцитів, під дією яких відбувається розпад макромолекулярних комплексів, які містять ГА. Ймовірно, ГА є індукторами фіброзу та збільшення їх вмісту випереджає зміни інших показників, які характеризують функціональний стан сполучної тканини. Так, вміст ГА в крові щурів після 6 доби введення донатора NO нітропрусида натрію зріс в 1,4 разу до $(6,05 \pm 0,44)$ г/л ($p < 0,001$), на 12 добу - в 1,5 разу до $(6,42 \pm 0,19)$ г/л ($p < 0,001$), а після 30 доби - в 1,8 разу до $(7,73 \pm 0,06)$ г/л ($p < 0,001$) в порівнянні з групою контролю $(4,27 \pm 0,34)$ г/л. Концентрація ГА в групі тварин 30-добового введення була достовірно вище, ніж при 1-добовому ($p < 0,001$), 2-добовому ($p < 0,01$), 6-добовому ($p < 0,001$) і 12-добовому ($p < 0,001$) введеннях препарату (табл. 1).

Після першої і другої діб введення нітропрусида натрію відзначалося різке зниження в крові концентрації нітритів/нітратів у 2,9 разу до $(11,34 \pm 0,14)$ мкмоль/л ($p < 0,001$) і до $(11,21 \pm 2,09)$ мкмоль/л ($p < 0,01$) відповідно у порівнянні з групою контролю $(32,61 \pm 3,64)$ мкмоль/л. Вже після 6 доби спостерігалось різке зростання вмісту в крові метаболітів NO в 1,8 разу до $(57,1 \pm 7,06)$ мкмоль/л ($p < 0,05$) з подальшим поступовим його зниженням через 30 діб - в 3,7 разу до $(8,75 \pm 1,96)$ г/л ($p < 0,001$). Концентрація даного показника в крові тварин на 6 добу введення препарату була достовірно вище, ніж після 12 доби ($p < 0,01$) і після 30 доби ($p < 0,001$) (табл. 1).

Після першої доби введення препарату спостерігалось поступове зростання активності α -амілази в крові, яка досягала свого максимуму після 6 доби, збільшилась у 2,2 разу з $(96,02 \pm 11,72)$ мг/с·л (контроль) до $(209,41 \pm 38,50)$ мг/с·л ($p < 0,05$). Але вже через 30 діб відзначалося значне зниження активності даного ензиму в 1,5 разу до $(65,75 \pm 8,03)$ мг/с·л ($p < 0,05$). Слід відмітити достовірну різницю в активності α -амілази між групами з 6-добовим і 30-добовим введенням донатора NO нітропрусида натрію ($p < 0,05$) (табл. 1).

Трипсин є оптимальним маркером для виявлення патології ПЗ, так як він специфічний для цього органу. Активність даного ензиму змінювалася аналогічно активності α -амілази: достовірне зростання в 2,1 разу після 6 доби з $(4,19 \pm 0,92)$ мкмоль/мл·хв (контроль) до $(8,65 \pm 1,64)$ мкмоль/мл·хв ($p < 0,05$) і поступове зниження до показника групи контролю через 30 діб. Активність трипсину в крові експериментальних щурів з 30-добовим введенням препарату була достовірно нижче, ніж при 6-добовому його введенні ($p < 0,05$) (табл. 1).

Розвиток ХП супроводжувався поступовим порушенням вуглеводного обміну. Так, спостерігалось достовірне зростання в 1,4 разу концентрації глюкози в сироватці крові з $(3,18 \pm 0,42)$ ммоль/л (контрольна група) до $(4,34 \pm 0,30)$ ммоль/л ($p < 0,05$) та в 1,7 разу до $(5,37 \pm 0,38)$ ммоль/л ($p < 0,01$) відповідно через 12 та 30 діб введення препарату.

Таким чином, при хронізації панкреатиту відбувалося порушення інкреторної функції ПЗ (табл. 1).

Таблиця 1

Показники, одиниці вимірювання	Контрольна група (n=8)	1 доба/1,5 мг (n=6)	2 доби/1,5 мг (n=6)
Нітрити/нітрати, мкмоль/л	32,61±4,55	11,34±0,14***	11,21±2,09***
α-Амілаза, мг/с·л	96,02±11,72	111,27±15,23	142,58±40,20
Трипсин, мкмоль/мл·хв	4,19±0,92	4,69±0,30	7,50±2,18
ОПб/зв, мкмоль/л	179,28±9,19	170,50±11,76	178,35±12,35
ОПв, мкмоль/л	9,96±0,77	10,49±1,02	11,55±1,35
ГА, г/л	4,27±0,34	4,27±0,36	5,53±0,41
Глюкоза, ммоль/л	3,18±0,42	3,20±0,38	3,25±0,24

Продовження таблиці 1

Показники, одиниці вимірювання	6 діб/1,5 мг (n=6)	12 діб /1,5 мг (n=6)	30 діб/1,5 мг (n=6)
Нітрити/нітрати, мкмоль/л	57,1±7,06*	21,34±4,69**	8,75±1,96***
α-Амілаза, мг/сл	209,41±38,50*	164,80±66,68	65,75±8,03**
Трипсин, мкмоль/мл·хв	8,65±1,64*	5,70±0,49	3,91±0,93*
ОПб/зв, мкмоль/л	183,62±13,66	196,59±15,03	243,81±15,35***##xx*
ОПв, мкмоль/л	13,15±2,57	16,37±1,39**	18,01±3,37*
ГА, г/л	6,05±0,44**	6,42±0,19***	7,73±0,06***##xx***
Глюкоза, ммоль/л	3,42±0,29	4,34±0,30#	5,37±0,38***###xxx

Примітки:

1. * - (p<0,05), ** - (p<0,01) та * - (p<0,001) - достовірність відмінностей між групою контролю та групою з 1-добовим, 2-добовим, 6-добовим, 12-добовим та 30-добовим введенням препарату;

2. # - (p<0,05), ## - (p<0,01) та ### - (p<0,001) - достовірність відмінностей між групами з 1-добовим та 12- і 30-добовим введенням препарату;

3. x - (p<0,05), xx - (p<0,01) та xxx - (p<0,001) - достовірність відмінностей між групами з 2-добовим та 30-добовим введенням препарату.

4. • - (p<0,05), •• - (p<0,01) та ••• - (p<0,001) - достовірність відмінностей між групами з 6-добовим та 12-добовим, 30-добовим введенням препарату.

Після 1 та 2 діб введення препарату в сироватці крові відмічається достовірне збільшення метаболітів NO (p<0,001), тенденція до зростання активності панкреатичних ензимів - α-амілази та трипсину. Морфологічно відзначається дилатація судин і протоків, накопичення та застій секрету ПЗ.

Після 6 доби відмічається максимальне зростання в сироватці крові активності панкреатичних ензимів - α-амілази (p<0,05) та трипсину (p<0,05), рівня метаболітів NO (p<0,05) та спостерігається поступове зростання концентрації ГА (p<0,001). Морфологічні дослідження ПЗ підтверджують розвиток панкреатиту, структурною основою якого є ознаки запалення - інфільтрація строми накопиченням лімфоцитів і лейкоцитів, дилатація судин зі стазом формених елементів крові та розширення внутрішньо часточкових протоків з надмірним накопиченням секрету в ацинарних клітинах, поодинокі дрібні вогнища некрозу.

Після 12 доби відмічається тенденція до зниження в сироватці крові активності α-амілази та трипсину і достовірне зменшення рівня метаболітів NO у порівнянні з 6 добою (p<0,01). Спостерігається значне зростання концентрації ОПб/зв та достовірне збільшення вмісту ОПв (p<0,01) і ГА (p<0,001). Морфологічно зберігається стромальна інфільтрація й вазодилатація, до цих змін приєднується вогнищева жирова дистрофія та сегментарний апоптоз ацинарних клітин.

Через 30 діб після введення донатора NO нітропрусида натрію в сироватці крові відмічається одночасно максимальне зростання маркерів синтезу колагену - ОПб/зв (p<0,01) і розпаду колагену - ОПв (p<0,05) та ГА (p<0,001), розвивається функціональна недостатність ПЗ, яка проявляється різким зниженням активності панкреатичних ензимів -α-амілази (p<0,05) і трипсину. Зниження концентрації метаболітів NO (нітритів / нітратів) спостерігається після першої (p<0,001) і другої (p<0,001) діб введення донатора, а надалі, відбувається їх поступове зростання з максимальним значенням після 6 доби (p<0,05) і подальшим поступовим зниженням з мінімальним значенням через 30 діб (p<0,001). Морфологічно мікроциркуляторні зміни в ПЗ компенсовані, діаметр судин не відрізнявся від групи порівняння. Відмічається дилатація між часточкових протоків, в перидукулярній зоні починають формуватися тяжі

фіброзної тканини. Пухка фіброзна тканина огортає магістральні протоки і великі судини, проникає в міжчасточковий простір.

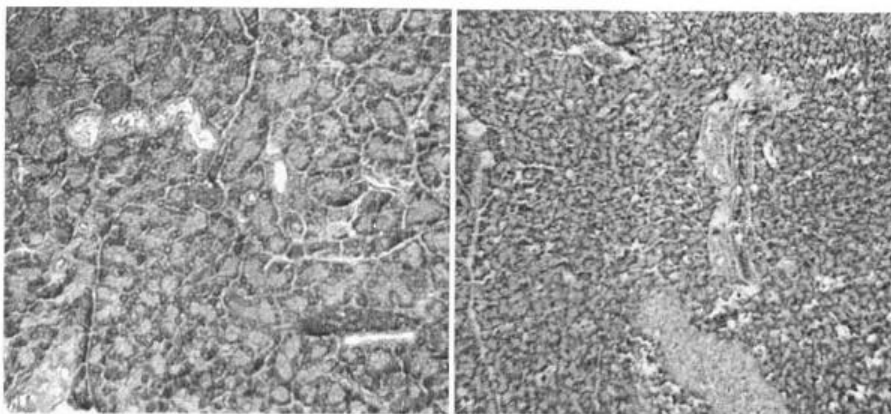
Отже, створена нова експериментальна модель ХП на щурах, яка індукована тривалим порушенням ланки регуляції на основі застосування донатора NO - нітропрусиду натрію.

У порівнянні з прототипом, запропонована модель ХП легко відтворювана, залучає іншу ланку формування ХП, пов'язану з дисбалансом NO, та розширює діапазон спостереження від ранніх до пізніх етапів його розвитку. В прототипі використовується модель ХП, ґрунтована на дефіциті NO та, як наслідок, спазмі судинної і протокової систем.

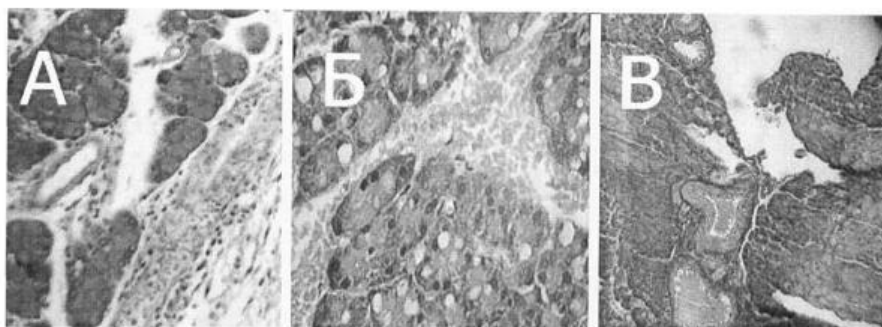
В запропонованій моделі ХП тривале надлишкове надходження NO, за рахунок внутрішньочеревного введення нітропрусиду натрію в дозі 1,5 мг/кг, приводить до вазодилатації зі стазом формених елементів крові, вогнищевого некрозу, деструкції ацинарної тканини, дилатації проток з погіршенням відтоку секрету ПЗ, жирової дистрофії, сегментарного апоптозу, формування фіброзної тканини в перидуктулярній і перивазальній зонах із проникненням в міжчасточковий простір, зростанням в крові вмісту біохімічних маркерів фіброзу, порушенням екзокринної функції ПЗ (посилення ферментативної активності з подальшим її пригніченням) та інкреторної недостатності, тобто до змін, які характерні для хронічного експериментального панкреатиту.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб моделювання хронічного панкреатиту, що включає порушення рівня оксиду азоту шляхом внутрішньочеревного введення діючої речовини, який **відрізняється** тим, що розчин нітропрусиду натрію виготовлений ex tempore вводять один раз на добу з розрахунку 1,5 мг сухої речовини на кілограм ваги лабораторним тваринам протягом 30 діб.



Фіг. 1



Фіг. 2

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601