



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 90510

(13) U

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 00482**

(22) Дата подання заявки: **20.01.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **26.05.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **26.05.2014, Бюл.№ 10**

(72) Винахідник(и):

**Макарчук Вікторія Анатоліївна (UA),
Ушакова Галина Олександрівна (UA),
Бабій Олександр Михайлович (UA),
Шевченко Борис Федорович (UA),
Ошмянська Наталія Юріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА ІНСТИТУТ
ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ,
пр. Правди, 96, м. Дніпропетровськ, 49074
(UA),
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О. ГОНЧАРА,
пр. Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, 49010
(UA)**

(54) СПОСІБ БІОХІМІЧНОЇ ОЦІНКИ ФІБРОЗНОЇ ТРАНСФОРМАЦІЇ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ЗАПАЛЕННІ, ВИКЛИКАНОМУ ТРИВАЛОЮ ОКЛЮЗІЄЮ ПАНКРЕАТИЧНОЇ ПРОТОКИ

(57) Реферат:

Спосіб біохімічної оцінки фіброзної трансформації підшлункової залози при тривалій оклюзії панкреатичної протоки включає визначення стану сполучної тканини та визначення концентрації оксипроліну як маркера фіброзних змін органа в організмі піддослідної тварини, при цьому спочатку після виведення щура з експерименту проводять забір 5 мл крові, і в плазмі крові визначають вміст ГК, ОПб/зв та ОПв, розраховують КОПб/зв, КОПв та коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв, після чого встановлюють числові інтервали біохімічних коефіцієнтів для характеристики запально-некротичної стадії гострого панкреатиту, перехідної, атрофічно-префіброзної стадії гострого панкреатиту та фіброзної стадії хронічного панкреатиту.

UA 90510 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до способів біохімічної оцінки фіброзних змін при запаленні підшлункової залози, викликаному тривалою оклюзією панкреатичної протоки.

Фіброз підшлункової залози - характерна ознака хронічного панкреатиту [1]. При фіброзі органа основними продуцентами надлишку фібрилярного колагену і таких молекул позаклітинного матриксу, як фібронектин і ламінін, є активовані панкреатичні зірчасті клітини [2]. Визначення маркерів фіброзу в периферичній крові - це неінвазивні методи діагностики. Відомо, що при панкреатиті відбувається зміна рівня гіалуронової кислоти (ГК) в екстрацелюлярному матриксі [3]. Зростання концентрації даного глікозаміноглікану в плазмі крові обумовлене збільшенням його продукції зірчастими клітинами та порушенням деградації ГК гіалуронідазами, через зменшення їх активності. Гіалуронідази відіграють важливу роль в деградації ГК [4, 5]. Таким чином, можна припустити, що з розвитком хронічного панкреатиту відбувається дисбаланс в системі "гіалуронова кислота - гіалуронідаза" в бік збільшення синтезу цього глікозаміноглікану. Отже, ГК - це неінвазивний маркер, поява якого в плазмі крові може мати важливе значення при оцінці ступеня фіброзних змін органа, в тому числі і підшлункової залози.

В лабораторній оцінці патогенезу хронізації та прогресування захворювань паренхіматозних органів також важливим є визначення змін параметрів метаболізму системи сполучної тканини - оксипроліну білковозв'язаного (ОПб/зв) та оксипроліну вільного (ОПв) [6]. Оксипролін - одна із основних амінокислот колагену і це дозволяє вважати її маркером, який відображає катаболізм цього білка. Близько 20 % оксипроліновмісних пептидів, що вивільнюються із колагену, екскретуються з сечею, а 80 % - метаболізуються в печінці. У вільному вигляді знаходиться лише 1 % оксипроліну [7]. Тому зміни вмісту ОПб/зв та ОПв в сироватці крові дозволяють свідчити про порушення синтезу колагену.

Для проведення комп'ютерної морфометрії, оцінки фіброзних змін підшлункової залози при експериментальному панкреатиті, біоптати, отримані інвазивним методом, фотографували та здійснювали вимірювання за допомогою програми ImageJ 1.45S (розроблена в "National Institutes of Health", USA). Так, комп'ютерний індекс фіброзу (КІФ - співвідношення фіброзної тканини до загальної площі біоптату) для контролю становив $0,50 \pm 0,07$, на 6 добу експерименту КІФ дорівнював $1,13 \pm 0,66$ (і встановлена запально-некротична стадія гострого панкреатиту), на 15 добу - $3,11 \pm 2,03$ (і встановлена перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту), а на 30 добу - $20,79 \pm 5,12$ ($p < 0,01$ відносно контрольного значення, встановлена фіброзна стадія хронічного панкреатиту). Слід відзначити, що на 30 добу експерименту КІФ в 18,4 рази ($p < 0,01$) перевищував аналогічний показник для 6 доби і в 6,7 рази - для 15 доби ($p < 0,01$).

Відомий спосіб оцінки стану сполучної тканини у тварин за допомогою біохімічних тестів, що можуть слугувати важливими прогностичними та діагностичними критеріями хвороб печінки різного ґенезу, який полягає в тому, що у сироватці крові визначають вміст глікопротеїнів, сіалових кислот, загальних хондроїтинсульфатів та фракцій глікозаміногліканів (хондроїтин-6-сульфат, хондроїтин-4-сульфат, гепарансульфат), а також рівень екскреції із сечею оксипроліну та уонових кислот, і збільшення концентрації глікопротеїнів на 80,6 % ($p < 0,001$) з $0,62 \pm 0,02$ у здорових тварин до $1,12 \pm 0,06$ г/л, сіалових кислот - на 62,7 % ($p < 0,001$) з $2,09 \pm 0,11$ (контроль) до $3,40 \pm 0,15$ ммоль/л, хондроїтинсульфату - на 93,9 % ($p < 0,001$) з $0,196 \pm 0,007$ (контроль) до $0,380 \pm 0,021$ г/л, загальних глікозаміногліканів - на 27,4 % ($p < 0,001$) з $20,1 \pm 0,70$ (контроль) до $25,6 \pm 0,64$ ум. од., хондроїтин-6-сульфату - на 21,6 % ($p < 0,05$) з $11,6 \pm 0,58$ (контроль) до $14,1 \pm 0,46$ ум. од., хондроїтин-4-сульфату - на 28,6 % ($p < 0,05$) з $6,3 \pm 0,25$ (контроль) до $8,1 \pm 0,37$ ум. од., гепарансульфату - на 54,5 % ($p < 0,01$) з $2,2 \pm 0,24$ (контроль) до $3,4 \pm 0,11$ ум. од., оксипроліну сечі - на 87,0 % ($p < 0,001$) з $35,3 \pm 4,20$ (контроль) до $66,0 \pm 2,65$ мг/л та уонових кислот - на 39,2 % ($p < 0,05$) з $7,4 \pm 0,64$ до $10,3 \pm 0,44$ мг/л свідчить про накопичення в паренхімі печінки атипових форм колагену, глікопротеїнів і протеогліканів, що є провідною патогенетичною ланкою розвитку її фіброзу [8]. Даний спосіб вибраний як найближчий аналог.

Недоліки даного способу наступні:

1. Не визначена залежність між вираженістю змін біохімічних маркерів метаболізму сполучної тканини та ступенем фіброзних змін в печінці при розвитку гепатопатії у тварин.

2. Визначення оксипроліну у сечі значно ускладнює використання даної методики та схеми дослідження при постановці та проведенні експериментів на дрібних тваринах.

Спосіб біохімічної оцінки процесів колагеноутворення в підшлунковій залозі при фіброзній стадії хронічного панкреатиту має ряд переваг у порівнянні з найближчим аналогом (визначається концентрація ОПб/зв, що характеризує анаболізм колагену, та ОПв, що характеризує його катаболізм, в плазмі крові тварин; розраховується коефіцієнт співвідношення біохімічних маркерів фіброзу ОПб/зв до ОПв; досліджується залежність між числовим

значенням розрахованого коефіцієнта ОПб/зв до ОПв та 1) відсутністю фіброзних змін в тканині підшлункової залози при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту, 2) поступовою активацією фіброзних змін в тканині підшлункової залози при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту та 3) наявністю фіброзних змін в тканині підшлункової залози при фіброзній стадії хронічного панкреатиту, які визначені при морфологічному дослідженні; визначається концентрація ГК - компонента екстрацелюлярного матриксу в плазмі крові) і може успішно застосовуватися в гастроентерології.

В основу корисної моделі поставлена задача розробки неінвазивного способу дослідження, який шляхом визначення в плазмі крові біохімічних показників колагеноутворення дозволить би характеризувати прогресування фіброзних змін при запаленні підшлункової залози, викликаному тривалою оклюзією панкреатичної протоки в експерименті.

Поставлена задача вирішується у способі біохімічної оцінки фіброзної трансформації підшлункової залози при тривалій оклюзії панкреатичної протоки, що включає визначення стану сполучної тканини та визначення концентрації оксипроліну як маркера фіброзних змін органа в організмі піддослідної тварини, згідно з корисною моделлю, після виведення щура з експерименту проводять забір 5 мл крові, і в плазмі крові визначають вміст ГК, ОПб/зв та ОПв і розраховують кОПб/зв, кОПв та коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв, встановлюють числові інтервали біохімічних коефіцієнтів для характеристики запально-некротичної стадії гострого панкреатиту, перехідної, атрофічно-префіброзної стадії гострого панкреатиту та фіброзної стадії хронічного панкреатиту.

Спосіб виконують шляхом визначення в плазмі крові псевдооперованих щурів (контроль) та дослідних щурів, яким здійснювали тривалу оклюзію панкреатичної протоки лігатурою, що не розсмоктується - Prolene 5/0, вмісту біохімічних маркерів фіброзу ОПб/зв, ОПв та ГК (Табл. 1). Розраховується коефіцієнт ОПб/зв (кОПб/зв) та коефіцієнт ОПв (кОПв) і загальний коефіцієнт фіброзу кОПб/зв/кОПв. У I групі щурів з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (6 доба експерименту) середня концентрація ОПб/зв становить $183,62 \pm 7,43$ мкмоль/л, ОПв - $9,69 \pm 0,62$ мкмоль/л; рівень кОПб/зв дорівнює $1,10 \pm 0,04$, кОПв відповідає значенню $0,97 \pm 0,06$ та коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнює $1,17 \pm 0,11$; середня концентрація ГК дорівнює $1,43 \pm 0,06$ мкг/мл. У II групі щурів, перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту (15 доба експерименту) середня концентрація ОПб/зв становить $206,16 \pm 13,80$ мкмоль/л, ОПв - $7,76 \pm 0,45$ мкмоль/л; рівень кОПб/зв дорівнює $1,24 \pm 0,08$, кОПв відповідає значенню $0,78 \pm 0,05$ та коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнює $1,63 \pm 0,18$; середня концентрація ГК дорівнює $1,60 \pm 0,12$ мкг/мл. У III групі щурів, із фіброзною стадією хронічного панкреатиту (30 доба експерименту) середня концентрація ОПб/зв становить $230,81 \pm 8,82$ мкмоль/л, ОПв - $6,97 \pm 0,39$ мкмоль/л; рівень кОПб/зв дорівнює $1,38 \pm 0,05$, кОПв відповідає значенню $0,70 \pm 0,04$ та коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв дорівнює $2,03 \pm 0,18$ (при встановленій нормі 1), середня концентрація ГК дорівнює $1,88 \pm 0,10$ мкг/мл (див. табл.). Отримані співвідношення кОПб/зв/кОПв для всіх щурів кожної з трьох груп дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів для характеристики стадій гострого та хронічного панкреатиту: при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту -1,09-1,43, при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту -1,44-1,78, при фіброзній стадії хронічного панкреатиту -1,79 і >.

Порівняльний аналіз заявленого способу та найближчого аналога дозволяє встановити, що вони мають ряд загальних ознак:

1. Визначення стану сполучної тканини.
2. Визначення концентрації оксипроліну як маркера фіброзних змін органа.
3. Визначення глікозаміногліканів як маркерів фіброзних змін органа.

Заявлений спосіб має наступні відмінності від прототипу:

1. Проводиться біохімічна оцінка фіброзних змін підшлункової залози.

2. Визначені показники стану сполучної тканини в плазмі крові підтверджуються морфометричним дослідженням тканини підшлункової залози.

3. Визначається дві фракції оксипроліну: ОПб/зв та ОПв в плазмі крові.

4. Визначається концентрація ГК в плазмі крові.

5. Розраховується коефіцієнти відношення ОПб/зв до ОПв до норми.

6. Розраховується коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв.

7. Розраховуються числові діапазони для коефіцієнтів кОПб/зв/кОПв на етапах переходу панкреатиту з гострої форми в хронічну.

Визначені біохімічні маркери обміну сполучної тканини в найближчому аналогу характеризують лише фіброзні зміни печінки, але морфологічні/гістологічні дослідження підшлункової залози доводять, що процеси фіброзоутворення у цьому органі аналогічні таким у

печінці [9]. Тому дані дослідження можна застосовувати і для характеристики фіброзної трансформації підшлункової залози при розвитку хронічного панкреатиту.

Таким чином, заявлений спосіб має суттєві відмінні ознаки у порівнянні з найближчим аналогом, які разом із вже відомими, дозволять досягнути технічний результат: отримати інформацію про особливості фіброзних змін підшлункової залози на етапах переходу панкреатиту з гострої форми в хронічну на основі значень та числових діапазонів біохімічних показників і попередити при цьому побічні ефекти та ускладнення, підвищити діагностичне значення результатів дослідження, як наслідок, вирішити поставлену задачу.

Оцінка кількісних характеристик результатів дослідження базується на даних, отриманих авторами при вивченні біохімічних показників у 18 псевдооперованих щурів (з експерименту виводилося по 6 тварин на 6, 15 та 30 добу після оперативного втручання, але у зв'язку із відсутністю достовірних відмінностей між цими групами вони були об'єднані в одну групу), які склали контрольну групу, та 18 дослідних щурів. На підставі результатів комп'ютерної морфометрії, що здійснювалася за допомогою програми ImageJ 1.45S, дослідні щури розділялися на наступні групи: I група - запально-некротична стадія гострого панкреатиту (6 доба виведення з експерименту), II група - перехідна, атрофічно-префіброзна стадія гострого панкреатиту (15 доба виведення з експерименту) та III група - фіброзна стадія хронічного панкреатиту (30 доба виведення з експерименту). Результати досліджень представлені в таблиці.

Спосіб здійснюють наступним чином: після виведення щура з експерименту проводиться забір 5 мл крові, і в плазмі крові визначається вміст ГК, ОПб/зв та ОПв і розраховується КОПб/зв, КОПв та коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв, встановлюються числові інтервали біохімічних коефіцієнтів для характеристики запально-некротичної стадії гострого панкреатиту, перехідної, атрофічно-префіброзної стадії гострого панкреатиту та фіброзної стадії хронічного панкреатиту. Концентрація ГК в плазмі крові оцінюється за допомогою методу Голда, особливість якого полягає в тому, що лужний розчин ($pH=8,6$), який використовується для забарвлення несультатованого глікозаміноглікану (ГК), містить ацетат натрію - 0,5 М та альціан блакитний - 0,1 % [10]. Рівень біохімічних маркерів активності проліферативних процесів у сполучній тканині визначається за вмістом в плазмі крові ОПб/зв та ОПв за методом М.А. Осадчука, який полягає в тому, що оксипролін з реактивом Ерліха дає рожеве забарвлення [11, 12]. Для розрахунку числових діапазонів біохімічних коефіцієнтів використовують статистичні методи [13].

Ми перерахували концентрацію ОПб/зв та ОПв в умовні одиниці відносно контролю.

Концентрація ОПб/зв в контролі прийнята за 1 (ОПб/зв).

КОПб/зв в досліді = концентрації ОПб/зв досліджуваної сироватки/концентрацію ОПб/зв в контролі.

Концентрація ОПв в контролі прийнята за 1 (ОПв).

КОПв в досліді = концентрації ОПв досліджуваної сироватки/концентрацію ОПв в контролі.

Потім розраховували коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв.

Результати досліджень вмісту в плазмі крові компонента екстрацелюлярного матриксу, ГК, та продуктів метаболізму колагену показали, що в результаті фіброзування підшлункової залози при хронізації процесу концентрація ГК та ОПб/зв зростає, а ОПв - знижується у порівнянні з групою контролю, що свідчить за активацію процесів синтезу колагену над його розпадом. Так, у щурів I групи вміст ГК має тенденцію до підвищення на 11,7 % з $1,28 \pm 0,06$ (контроль) до $1,43 \pm 0,06$ мкг/мл, у щурів II групи спостерігається достовірне підвищення даного показника на 25,0 % ($p < 0,05$) до $1,60 \pm 0,12$ мкг/мл, а у щурів III групи - на 46,9 % ($p < 0,001$) до $1,88 \pm 0,10$ мкг/мл, що, в свою чергу, на 31,5 % ($p < 0,01$) нижче, ніж у тварин I групи. Концентрація ОПб/зв у крові щурів I групи також підвищується недостовірно на 10,2 % з $166,69 \pm 9,24$ (контроль) до $183,62 \pm 7,43$ мкмоль/л, в II групі спостерігається статистично значиме зростання даного показника - на 23,7 % ($p < 0,05$) до $206,16 \pm 13,80$ мкмоль/л і в III групі - на 38,5 % ($p < 0,001$) до $230,81 \pm 8,82$ мкмоль/л. Слід відзначити, що у щурів III групи вміст ОПб/зв на 25,7 % ($p < 0,01$) вищий, ніж у щурів I групи, в якій спостерігається лише тенденція до зниження вмісту ОПв з $9,96 \pm 0,60$ (контрольна група) до $9,69 \pm 0,62$ мкмоль/л, достовірне зниження концентрації даного показника відбувається у крові щурів II групи - на 22,1 % ($p < 0,05$) до $7,76 \pm 0,45$ мкмоль/л, що на 19,9 % нижче, ніж у щурів I групи ($p < 0,05$), а у щурів III групи - на 30,0 % до $6,97 \pm 0,39$ мкмоль/л, що також на 28,1 % нижче, ніж у щурів I групи ($p < 0,01$). У щурів I групи рівень КОПб/зв дорівнює $1,10 \pm 0,04$, КОПв відповідає значенню $0,97 \pm 0,09$ та коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв дорівнює $1,17 \pm 0,11$. У щурів II групи визначений рівень КОПб/зв дорівнює $1,24 \pm 0,08$, КОПв відповідає значенню $0,78 \pm 0,05$, що на 19,6 % ($p < 0,05$) вище, ніж у щурів I групи, та коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв дорівнює $1,63 \pm 0,18$, що також на 39,3 % ($p < 0,05$) вище, ніж у

щурів I групи. У щурів III групи рівень КОПб/зв дорівнює $1,38 \pm 0,05$, КОПв відповідає значенню $0,70 \pm 0,04$, що на 27,8 % ($p < 0,01$) вище, ніж у щурів I групи та коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв дорівнює $2,03 \pm 0,18$ (при встановленій нормі 1). Слід відзначити, що коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв у групі щурів з фіброзною стадією хронічного панкреатиту був на 73,5 % ($p < 0,01$) вищим порівняно з групою тварин з запально-некротичною стадією гострого панкреатиту (Табл. 1). Отримані співвідношення КОПб/зв/КОПв для всіх щурів кожної з трьох груп дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів, які при значенні 1,09-1,43 характеризують запально-некротичну стадію гострого панкреатиту і відсутність фіброзних змін, при значенні 1,44-1,78 - перехідну, атрофічно-префіброзну стадію гострого панкреатиту, при значенні 1,79 і > - фіброзну стадію хронічного панкреатиту.

Запропонований спосіб ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Дослідження проведено псевдооперованій тварині (щур № 1, 6 місяців, вага 210 г) з метою визначення параметрів норми в контрольній групі. Після декапітації тварини проведено забір 5 мл крові та здійснено комп'ютерну морфометрію біоптатів підшлункової залози (визначення КІФ). Визначено рівень ГК, ОПб/зв та ОПв та розраховано коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв .

Встановлено, що концентрація ГК, ОПб/зв та ОПв дорівнює 1,16 мкг/мл, 167,20 мкмоль/л та 11,09 мкмоль/л відповідно. $\text{КОПб/зв}=1,00$, $\text{КОПв}=1,11$, $\text{КОПб/зв/КОПв}=0,90$. Отримані дані підтверджуються результатами морфометрії: КІФ дорівнював 0,57 (Фіг. 1).

Запропонований спосіб у псевдооперованій тварині свідчить за відсутність фіброзу підшлункової залози.

Приклад 2. Щур № 8 (6 місяців, вага 205 г), якому здійснювали тривалу оклюзію панкреатичної протоки, виведений із експерименту на 6 добу після оперативного втручання, проведено забір 5 мл крові та здійснено комп'ютерну морфометрію біоптатів підшлункової залози (визначення КІФ). Визначено рівень ГК, ОПб/зв та ОПв та розраховано коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв .

При відсутності ознак фіброзних змін підшлункової залози при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту, яка встановлена при морфологічному дослідженні, визначається концентрація ГК, ОПб/зв та ОПв , що дорівнює 1,43 мкг/мл, 183,56 мкмоль/л та 9,20 мкмоль/л відповідно. $\text{КОПб/зв}=1,10$, $\text{КОПв}=0,92$, $\text{КОПб/зв/КОПв}=1,19$, що входить в інтервал значень 1,09-1,43. Отримані дані підтверджуються результатами морфометрії: КІФ дорівнював 0,92 (Фіг. 2).

Таким чином, отримані в даному прикладі результати біохімічного дослідження стану сполучної тканини підшлункової залози щурів на 6 добу експерименту після тривалої оклюзії панкреатичної протоки характеризують запально-некротичну стадію гострого панкреатиту та свідчать про відсутність фіброзних змін досліджуваного органа.

Приклад 3. Щур № 15 (6 місяців, вага 202 г), якому здійснювали тривалу оклюзію панкреатичної протоки, виведений із експерименту на 15 добу після оперативного втручання, проведено забір 5 мл крові та здійснено комп'ютерну морфометрію біоптатів підшлункової залози (визначення КІФ). Визначено рівень ГК, ОПб/зв та ОПв та розраховано коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв .

При перехідній, атрофічно-префіброзній стадії трансформації підшлункової залози, яка встановлена при морфологічному дослідженні, визначається концентрація ГК, ОПб/зв та ОПв дорівнює 1,82 мкг/мл, 209,60 мкмоль/л та 7,55 мкмоль/л відповідно. $\text{КОПб/зв}=1,26$, $\text{КОПв}=0,76$, $\text{КОПб/зв/КОПв}=1,66$. Отримані дані підтверджуються результатами морфометрії: КІФ дорівнював 2,45 (Фіг. 3).

Таким чином, отримані в даному прикладі результати біохімічного дослідження стану сполучної тканини підшлункової залози щурів на 15 добу експерименту після тривалої оклюзії панкреатичної протоки характеризують перехідну, атрофічно-префіброзну стадію трансформації підшлункової залози.

Приклад 4. Щур № 24 (6 місяців, вага 195 г), якому здійснювали тривалу оклюзію панкреатичної протоки, виведений із експерименту на 30 добу після оперативного втручання, проведено забір 5 мл крові та здійснено комп'ютерну морфометрію біоптатів підшлункової залози (визначення КІФ). Визначено рівень ГК, ОПб/зв та ОПв та розраховано коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв .

При фіброзній стадії перебудови підшлункової залози, яка встановлена при морфологічному дослідженні, визначається концентрація ГК, ОПб/зв та ОПв дорівнює 1,95 мкг/мл, 243,20 мкмоль/л та 6,77 мкмоль/л відповідно. $\text{КОПб/зв}=1,46$, $\text{КОПв}=0,68$, $\text{КОПб/зв/КОПв}=2,15$. КІФ дорівнював 19,68 (Фіг. 4), що підтверджує помітне поширення фіброзу у порівнянні з щурами контрольної групи.

Таким чином, отримані в даному прикладі результати біохімічного дослідження стану сполучної тканини підшлункової залози щурів на 30 добу експерименту після тривалої оклюзії панкреатичної протоки характеризують фіброзну стадію перебудови підшлункової залози.

Заявлений спосіб, що застосований у Державній установі "Інститут гастроентерології НАМІ України" у 18 дослідних тварин дозволив встановити, що у I групи щурів коефіцієнт співвідношення КОПб/зв/КОПв дорівнює $1,17 \pm 0,11$; у II групи - $1,63 \pm 0,18$; у III групи - $2,03 \pm 0,18$ (при встановленій нормі 1).

Отримані співвідношення КОПб/зв/КОПв для всіх щурів кожної з трьох груп дозволили визначити числові інтервали коефіцієнтів для характеристики панкреатиту в гострій та хронічній стадії: при запально-некротичній стадії гострого панкреатиту - $1,09-1,43$, при перехідній, атрофічно-префіброзній стадії гострого панкреатиту - $1,44-1,78$, при фіброзній стадії хронічного панкреатиту - $1,79$ і $>$.

Даний спосіб дозволяє встановити ступінь фіброзної трансформації підшлункової залози при запаленні, викликаному тривалою оклюзією панкреатичної протоки в експерименті. Застосування заявленого способу підтверджує його працездатність та можливість екстраполяції у лікувальну практику медичних установ для підвищення ефективності діагностики фіброзних змін в підшлунковій залозі при панкреатиті.

Таблиця

Концентрація ГК, ОПб/зв та ОПв в плазмі крові експериментальних тварин та розраховані коефіцієнти співвідношення КОПб/зв/КОПв

Показник	Контроль (n=18)	I група (n=6)	II група (n=6)	III група (n=6)
ГК, мкг/мл	$1,28 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,06$	$1,60 \pm 0,12^*$	$1,88 \pm 0,10^{***}$
ОПб/зв, мкмоль/л	$166,69 \pm 9,24$	$183,62 \pm 7,43$	$206,16 \pm 13,80^*$	$230,81 \pm 8,82^{***}$
КОПб/зв	1	$1,10 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,05^{**}$
ОПв, мкмоль/л	$9,96 \pm 0,60$	$9,69 \pm 0,62$	$7,76 \pm 0,45^{* \#}$	$6,97 \pm 0,39^{***}$
КОПв	1	$0,97 \pm 0,06$	$0,78 \pm 0,05^{\#}$	$0,70 \pm 0,04^{**}$
КОПб/зв/КОПв	1	$1,17 \pm 0,11$	$1,63 \pm 0,18^{\#}$	$2,03 \pm 0,18^{**}$

Примітки:

1. * - ($p < 0,05$), ** - ($p < 0,01$) та *** - ($p < 0,001$) - достовірність відмінностей між групою контролю та дослідними групами щурів;

2. # - ($p < 0,05$) - достовірність відмінностей між I та II групами щурів

3. ** - ($p < 0,01$) - достовірність відмінностей між I та III групами щурів.

Джерела інформації:

1. Masamune A. Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis / A. Masamune, T. Watanabe, K. Kikuta, and T. Shimosegawa // Clinical gastroenterology and hepatology. - 2009. - 7. - pp. 48-54.

2. Туманський В.О. Імуногістохімічні особливості експресії матриксної металопротеїнази 9 та її тканинного інгібітора TIMP-1 при хронічному фіброзно-індуративному панкреатиті / В.О. Туманський, І.С. Коваленко // Патологія. - 2012. - № 1 (24). - С. 72-76.

3. Venkatasubramanian P.N... Imaging the pancreatic ECM / P.N. Venkatasubramanian // Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. - 2012. - pp. 11-27.

4. El-Shabrawi M. Omar Predictive accuracy of serum hyaluronic acid as a non-invasive marker of fibrosis in a cohort of multi-transfused Egyptian children with b-thalassaemia major / M. El-Shabrawi, M.Y. Zein El Abedin, N. // Arab Journal of Gastroenterology. - 2012. - 13. - pp. 45-48.

5. Duterme C. Two Novel Functions of Hyaluronidase-2 (Hyal2) Are Formation of the Glycocalyx and Control of CD44-ERM Interactions / C. Duterme, J. Mertens-Strijthagen, M. Tammi, and B. Flamion // The journal of biological chemistry. - 2009. - № 48 (284), pp. 33495-33508.

6. Павлов С.Б. Морфофункциональные изменения соединительной ткани у крыс с экспериментальной патологией печени, вызванной интрагастральным и интраперитонеальным введением тетрахлорметана / С.Б. Павлов, А.Н. Велигоцкий, А.В. Гончарова и др. // Теоретична і експериментальна медицина. - 2010. - № 4 (40). - С. 21-24.

7. Эверт Л.С. Диагностика дисплазии соединительной ткани с использованием биомаркеров / Л.С. Эверт, С.В. Бороздун, Е.И. Боброва и др. // Journal of Siberian Federal University. - 2009. - № 2. - С. 385-390.

8. Морозенко Д.В. Біохімічні показники стану сполучної тканини у патогенезі, діагностиці та контролі ефективності лікування гепатопатії собак / Д.В. Морозенко, О.П. Тимошенко // Біологія тварин. - 2012. - № 1-2 (14). - 9 с.

9. Buchler M.W. A proposal for a new clinical classification of chronic pancreatitis / M.W. Buchler, M.E. Martignoni, H. Friess, and P. Malfertheiner // BMC Gastroenterology. - 2009. - 9:93.

10. Gold E.W. The quantitative spectrophotometric estimation of total sulfated glycosaminoglycan levels / E.W. Gold // Biochimica et Biophysica Acta. - 1981. - 673. - pp. 408-415.

11. Осадчук М.А. Белковосвязанный оксипролин плазмы крови при остром вирусном гепатите / М.А. Осадчук, В.М. Капустин // Лабораторное дело. - 1987. - № 7. - С. 16-18.

12. Осадчук М.А. Методы исследования оксипролина в крови и моче / М.А. Осадчук // Лабораторное дело. - 1979. - № 8. - С. 456-458.

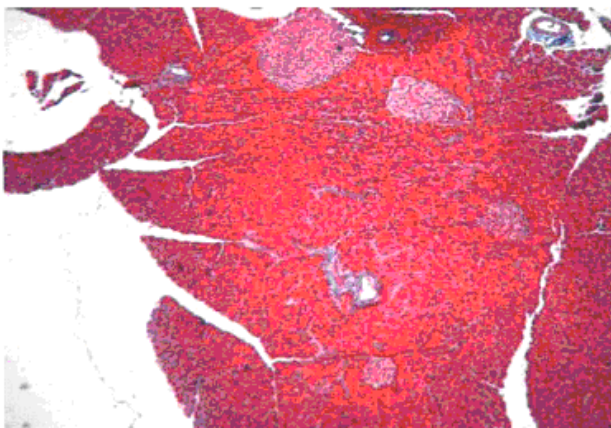
13. Наглядная статистика в медицине // Под ред. А. Петри, К. Сэбин. - М.: Гэотар-Мед, 2003. - 144 с.

15

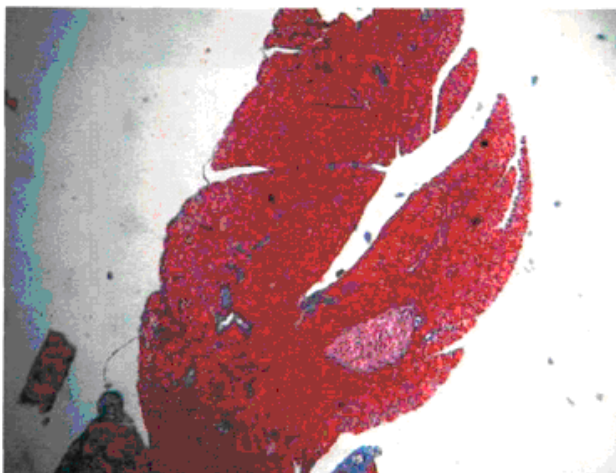
ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб біохімічної оцінки фіброзної трансформації підшлункової залози при тривалій оклюзії панкреатичної протоки, що включає визначення стану сполучної тканини та визначення концентрації оксипроліну як маркера фіброзних змін органа в організмі піддослідної тварини, який **відрізняється** тим, що спочатку після виведення щура з експерименту проводять забір 5 мл крові, і в плазмі крові визначають вміст ГК, ОПб/зв та ОПв, розраховують кОПб/зв, кОПв та коефіцієнт співвідношення кОПб/зв/кОПв, після чого встановлюють числові інтервали біохімічних коефіцієнтів для характеристики запально-некротичної стадії гострого панкреатиту, перехідної, атрофічно-префіброзної стадії гострого панкреатиту та фіброзної стадії хронічного панкреатиту.

25



Фиг. 1



Фиг. 2

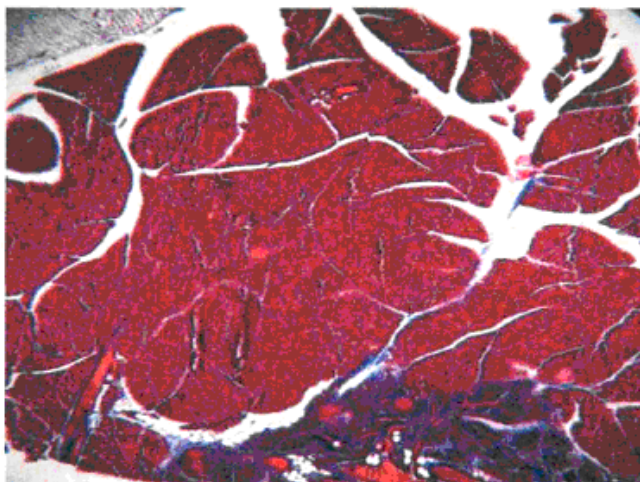


Fig. 3

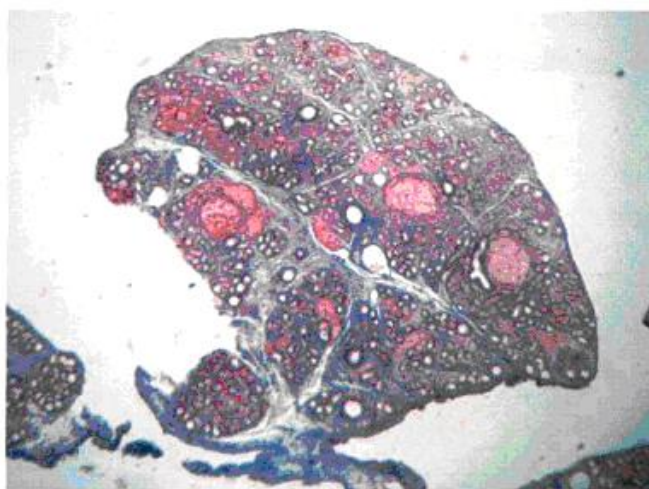


Fig. 4

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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