© Петрушенко В.В., Яковлева О.О., Зацерковна О.М., Гребенюк Д.І., Таран І.В., Паньків К.М., Білик О.М.

УДК: 616.37-002:619

Петрушенко В.В., Яковлева О.О., Зацерковна О.М., Гребенюк Д.І., Таран І.В., Паньків К.М., Білик О.М.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, Україна, 21018)

РОЗРОБКА ПАТОГЕНЕТИЧНИХ МОДЕЛЕЙ АСЕПТИЧНОГО ТА ІНФІКОВАНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ

Резюме. *В статті наведені дані експериментального дослідження по розробці патогенетичних моделей асептичного та інфікованого гострого панкреатиту у щурів. Моделювання гострого асептичного панкреатиту здійснювали шляхом інтрапаренхіматозної ін'єкції сукупності панкреатичних ферментів. Інфікування проводили шляхом введення в аналог сальникової сумки суспензії тонкокишкового вмісту. Результати експерименту оцінювали на 1, 3 та 7 добу макроскопічно, мікроскопічно та за результатами біохімічного дослідження. Запропоновані експериментальні моделі асептичного та інфікованого гострого панкреатиту є патогенетично адекватними, викликають характерні морфологічні та біохімічні зміни та можуть бути рекомендовані для використання під час вивчення нових експериментальних підходів до лікування гострого панкреатиту.*

Ключові слова: *гострий панкреатит, експериментальне дослідження, моделювання, щурі.*

Вступ

Гострий панкреатит є однією з найбільш поширених ургентних патологій шлунково-кишкового тракту. За даними ВООЗ захворюваність на гострий панкреатит складає 4,9-73,4 випадків на 100 000 населення. В Україні даний показник становить 67 чоловік на 100 000 населення та входить в трійку найпоширенішої гострої абдомінальної патології. З усіх форм гострого панкреатиту найбільш значним рівнем летальності супроводжується важкий гострий панкреатит, що має місце в 20-30 % випадків. Незважаючи на бурхливий розвиток хірургічних технологій та фармакологічної індустрії, впровадження результатів міжнародних рандомізованих досліджень в клінічну практику, проблема гострого панкреатиту залишається актуальною та потребує розробки нових підходів до ранньої його діагностики та лікування [1, 3, 4].

Саме тому актуальним залишається саме доклінічний експериментальний етап пошуку нових лікувально-діагностичних заходів.

Експериментальні дослідження гострого асептичного панкреатиту, в переважній своїй більшості, виконуються на трипсинових моделях панкреатиту, що не в повній мірі відображають основні патогенетичні механізми розвитку даної патології, насамперед, через те, що в процесі аутолізу підшлункової залози приймають участь всі панкреатичні ферменти [5].

Інфікований процес моделюють переважно шляхом введення калової суспензії в аналог сальникової сумки, що також не відповідає розвитку аналогічного процесу у людини. Це пояснюється тим, що інфікування в переважній більшості випадків здійснюється шляхом транслокації мікрофлори тонкої кишки у вогнище запалення, а як відомо, склад тонкокишкової та товстокишкової мікрофлори дещо відрізняється.

Враховуючи вищевказані недоліки традиційних моделей, нами було запропоновано дві моделі гострого панкреатиту (асептичного та інфікованого). Дані моделі базуються на введенні в паренхіму підшлункової залози фізіологічної сукупності панкреатичних ферментів, а інфікування, при потребі, здійснюється за рахунок тонкокишкової мікрофлори.

Мета дослідження - оцінити ефективність запропонованих експериментальних методик асептичного та інфікованого гострого панкреатиту.

Матеріали та методи

Експериментальне дослідження проводилося на базі віварію Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Всі досліди виконувалися з дозволу комітету з біоетики, згідно "Положення про використання тварин в біомедичних дослідах", з дотриманням основних положень Хельсинської декларації про гуманне ставлення до тварин (1964-2000 р.), GLP (1981 р.), Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин (1977 р.), Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄЕС № 609 від 24.11.1986 р. і наказу МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р.

У дослідження було включено 30 білих лабораторних щурів, обох статей віком до 1 року і вагою від 120 до 220 грам. Середня маса тварин складала 186±17 грами.

З метою забезпечення спорожнення шлунку, перед дослідами тварини залишалися на 12 годин без доступу до їжі, але із вільним доступом до води.

Всі досліди проводилися в умовно стерильних умовах під кетаміновим наркозом із розрахунку 0,22 мл на 100 грам маси тіла піддослідної тварини.

Піддослідні тварини були розподілені на 3 групи - контрольну та дві дослідні, по 9 щурів у кожній групі.

Тваринам контрольної групи імітували оперативне втручання шляхом виконання лапаротомії та ушивання лапаротомного доступу.

Тваринам першої дослідної групи моделювали гострий асептичний панкреатит шляхом інтрапаренхіматозної ін'єкції сукупності панкреатичних ферментів (Позитивне рішення по заявці № u 2015 11512 на Патент

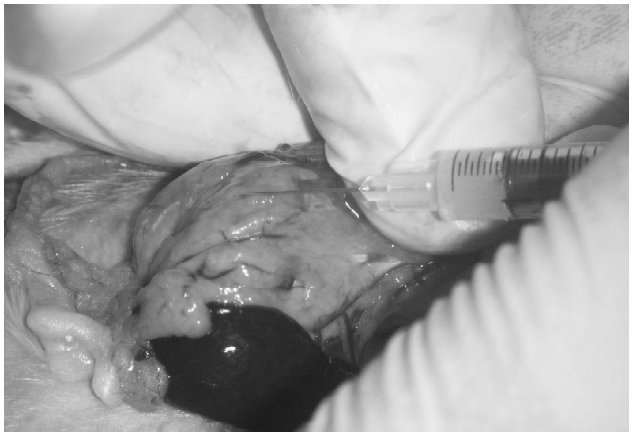

Рис. 1. Інтрапаренхіматозна ін'єкція фільтрату гомогенату підшлункової залози.

України на корисну модель).

В якості розчину, що містив сукупність панкреатичних ферментів використовували фільтрат гомогенату підшлункової залози, який готували наступним чином.

Виконували прижиттєвий забір тканини підшлункової залози у 3 щурів-донорів. Отриманий донорський матеріал гомогенізували у фарфоровій ступці при кімнатній температурі, після чого, до гомогенату додавали буферний розчин та цетрифугували. В окрему стерильну пробірку відбирали супернатантну рідину, яка і є фільтратом гомогенату підшлункової залози. Наявність активного трипсину підтверджували якісною біуретовою реакцією, яку виконували по стандартній методиці. Після підтвердження наявності активного трипсину, кількісно визначали його активність в отриманому гомогенаті за стандартною методикою Ерлангера-Шатернікова. Якісну реакцію на амілазу проводили за стандартною методикою із використанням крохмалю та реактиву Люголя.

Моделювання гострого асептичного панкреатиту здійснювали наступним чином.

Під загальним знеболенням виконували верхньосерединну лапаротомію щуру-реципієнту. В операційну рану виводили шлунок, підшлункову залозу та селезінку. Шляхом трансілюмінації в затемненому операційному полі візуалізували протокову систему середньої частини підшлункової залози. По ходу протока в 3-5 точках ін'єкційно вводили фільтрат гомогенату підшлункової залози в індивідуально розрахованому об'ємі, виходячи із необхідної дози трипсину 25 мг/кг (рис. 1). Об'єм введеного фільтрату гомогенату підшлункової залози складав 0,075-0,1 мл. Виконували ревізію черевної порожнини та промивали її розчином антисептика. Лапаротомну рану ушивали пошарово наглухо.

Тваринам другої дослідної групи моделювали гострий панкреатит аналогічно вище описаній методиці, за виключенням промивання черевної порожнини розчином антисептика. Перед ушиванням лапаротомної рани для інфікування в аналог сальникової сумки вводили 0,2 мл 20 % суспензії тонкокишкового вмісту (Позитивне рішення по заявці № u 2015 11519 на Патент України на корисну модель).

Для забору вмісту тонкої кишки у щура-донора виконували резекцію проксимальної третини тонкої кишки, збирали тонкокишковий вміст шляхом проточного промивання її просвіту фізіологічним розчином, створюючи при цьому суспензію із концентрацією кишкового вмісту близько 20%. Виконували фільтрування отриманої суспензії з метою видалення крупних часток хімусу.

На 1, 3 та 7 добу експерименту оцінювали результати досліду макроскопічно, мікроскопічно та за результатами біохімічного дослідження (кількісне визначення амілази сечі).

Кількісне визначення амілази сечі виконували за методикою Дроздова-Фексона, розробленою для визначення активності амілази в біологічних рідинах [2].

Усі одержані дані, отримані в ході дослідження, фіксувалися та піддавалися подальшій обробці із використанням пакету статистичних програм SPSS 20.0 for Windows.

Результати. Обговорення

В контрольній групі (імітація оперативного втручання) на 1, 3 та 7 добу жодні макроскопічні або мікроскопічні зміни паренхіми печінки не спостерігалися.

У першій дослідній групі (гострий асептичний панкреатит) з 1 доби відмічалися зміни у поведінці тварин - в'ялість, гіподинамія, спрага. Макроскопічно на 3 добу відмічався набряк панкреатичної паренхіми, геморагічна її імбібіція, наявність незначної кількості серозно-геморагічного випоту в черевній порожнині. Мікроскопічно: підшлункова залоза набрякла, з масивними зонами крововиливів, відмічається порушення структури ацинусів, множинні судинні стази та тромбози.

У другій дослідній групі (гострий інфікований панкреатит) починаючи із 1 доби відмічали аналогічні зміни у поведінці тварин, проте суб'єктивно зміни були більш виражені. Макроскопічно на 3 добу в черевної порожнини 0,5-0,8 мл мутного випоту з фібрином та різким запахом, корінь брижі набряклий із одиничними стеатонекрозами, стеатонекрози по всій поверхні підшлункової залози. Мікроскопічно: підшлункова залоза набрякла, з зонами крововиливів та некрозів, відмічається порушення структури ацинусів, множинні судинні стази та тромбози.

Результати кількісного визначення амілази сечі на 1, 3 та 7 добу наведені в таблиці 1.

Як видно із таблиці 1 в контрольній групі протягом всього експерименту відмічалася тенденція до зниження активності амілази сечі. Так, на 1 добу рівень її був дещо вищим за норму, що можна пояснити реакцією на операційну травму. Проте вже на третю добу даний показник нормалізувався і залишався в межах норми до 7 доби включно.

Щодо показників активності амілази в першій

Таблиця 1. Показники активності амілази сечі в динаміці.

Доба	Активність амілази, г/л/год., у групах		
	Контрольна (імітація оперативного втручання)	Перша дослідна (гострий асептичний панкреатит)	Друга дослідна (гострий інфікований панкреатит)
1 доба	19,06±4,17	73,48±5,13	61,21±5,02
3 доба	13,14±4,38	76,49±21,75	83,76±6,59
7 доба	10,63±4,93	79,65±3,16	94,98±10,64

дослідній групі, то її активність підвищувалася від першої (73,48±5,13 г/л/год.) до 3 доби (76,49±21,75 г/л/год.) та досягала пікових значень на 7 добу (79,65±3,16 г/л/год.).

Аналогічна тенденція прослідковувалася і в другій дослідній групі. Активність амілази сечі підвищувалася від першої (61,21±5,02 г/л/год.) до 3 доби (83,76±6,59 г/л/год.) та досягала пікових значень на 7 добу (94,98±10,64 г/л/год.).

Це, на нашу думку, пояснюється значними деструктивними змінами в паренхімі підшлункової залоза та частковим виснаженням ресурсів острівців інтактної паренхіми.

Слід зазначити, що на всіх терміна дослідження показники активності амілази в дослідних групах достовірно відрізнялися від аналогічного показника в контрольній групі ($p<0,001$, t-критерій Стьюдента). Крім того, при порівнянні на 1, 3 та 7 добу між собою двох дослідних груп, показники активності амілази також достовірно відрізнялися ($p<0,05$, t-критерій Стьюдента). Це свідчить про більш виражену важкість процесу при гострому інфікованому панкреатиті.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Запропоновані експериментальні моделі асептичного та інфікованого гострого панкреатиту є патогенетично адекватними, викликають характерні морфологічні та біохімічні зміни та можуть бути рекомендовані для використання під час вивчення нових експериментальних підходів до лікування гострого панкреатиту.

Наступним етапом планується дослідження ефективності різних підходів до лікування гострого панкреатиту із використанням розроблених моделей.

Список літератури

1. Велигоцкий Н. Н. Современные подходы к лечению острого деструктивного панкреатита / Н. Н. Велигоцкий, А. Н. Велигоцкий // Сучасні медичні технології. - 2010. - № 1. - С. 67-70.
2. Дроздов Г. А. Определение активности амилазы в биологических жидкостях / Г. А. Дроздов, Э. Г. Фексон / / Лабораторное дело. - 1981. - № 3. - С. 138-139.
3. Диференційоване етапне хірургічне лікування гострого некротичного панкреатиту / В. М. Копчак, І. В. Хомяк, К. В. Копчак [та ін.] // Львівський медичний часопис. - 2010. - Т. 16, № 4. - С. 58-63.
4. Савельев В. С. Острый панкреатит как проблема ургентной хирургии и интенсивной терапии / В. С. Савельев, М. И. Филимонов, Б. Р. Гельфинд [и др.] // Consilium medicum. - 2000. - Т. 2, № 9. - С. 12-16.
5. Hyun J. J. Experimental models of pancreatitis / J. J. Hyun, H. S. Lee // Clin Endosc. - 2014. - № 47. - P. 212-216.

Петрушенко В.В., Яковлева О.А., Зацерковная Е.Н., Гребенюк Д.И., Таран И.В., Панькив К.М., Билык А.Н.
РАЗРАБОТКА ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ АСЕПТИЧЕСКОГО И ИНФИЦИРОВАННОГО ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Резюме. *В статье приведены данные экспериментального исследования по разработке патогенетических моделей асептического и инфицированного острого панкреатита у крыс. Моделирование острого асептического панкреатита осуществляли путем интрапаренхиматозной инъекции совокупности панкреатических ферментов. Инфицирования проводили путем введения в аналог сальниковой сумки суспензии тонкокишечного содержимого. Результаты эксперимента оценивали на 1, 3 и 7 сутки макроскопически, микроскопически и по результатам биохимического исследования. Предложенные экспериментальные модели асептического и инфицированного острого панкреатита являются патогенетически адекватными, вызывают характерные морфологические и биохимические изменения и могут быть рекомендованы для использования при изучении новых экспериментальных подходов к лечению острого панкреатита.*

Ключевые слова: *острый панкреатит, экспериментальное исследование, моделирование, крысы.*

Petrushenko V.V., Yakovleva O.O., Zatserkovna O.M., Hrebeniuk D.I., Taran I.V., Pankiv K.M., Bilyk O.M.
WORKING-OUT OF PATHOGENETIC MODELS OF ASEPTIC AND INFECTED ACUTE PANCREATITIS

Summary. *The data received in experimental study on development of pathogenetic models of aseptic and infected acute pancreatitis in rats are presented in this article. Modeling of acute aseptic pancreatitis was performed by intraparenchymal injection of the pancreatic enzymes. Infection was made by entering of suspension of content of the small intestine into analog of omental bag. Results of the experiment were estimated on 1st, 3rd, 7th day macroscopically, microscopically and using the results of biochemical study. Proposed experimental models of aseptic and infected acute pancreatitis are pathogenetically adequate. They cause typical morphological and biochemical changes and they could be recommended for using during the study of new experimental approaches to the treatment of acute pancreatitis.*

Key words: *acute pancreatitis, experimental study, modeling, rats.*

Рецензент - д.мед.н., проф. Шапринський В.О.

Стаття надійшла до редакції 12.11.2015 р.

Петрушенко Вікторія Вікторівна - д.мед.н., проф., проректор з наукової роботи Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 35-32-16; science@vsmu.vinnica.ua
Яковлева Ольга Олександрівна - д.мед.н., проф., зав. кафедрою клінічної фармації та клінічної фармакології, Вінницького

національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 35-32-16; science@vsmu.vinnica.ua
Зацерковна Олена Миколаївна - аспірант кафедри клінічної фармації та клінічної фармакології, Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 067 405-70-30; lena.zatserkovnaya.88@mail.ru
Гребенюк Дмитро Ігорович - к.мед.н., асистент кафедри хірургії №1 з курсом "Основи ендоскопічної та лазерної хірургії" Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 067 595-44-83; Doctor.Svo@gmail.com
Таран Ілля Васильович - асистент кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; + 38 097 450-97-70; scienceandroid@gmail.com
Паньків Катерина Михайлівна - аспірант кафедри хірургії №1 з курсом "Основи ендоскопічної та лазерної хірургії" Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 063 856-78-98; science@vsmu.vinnica.ua
Білик Олександр Миколайович - аспірант кафедри хірургії №1 з курсом "Основи ендоскопічної та лазерної хірургії" Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; +38 0432 35-32-16; science@vsmu.vinnica.ua