

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ромашенко А.В., Семенец И.А.

ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Ростов-на-Дону, e-mail: semenets.i.a@mail.ru

Проведенный анализ доступной отечественной и зарубежной литературы показал, что разработка новых методов моделирования панкреатита, в том числе алкогольной этиологии, и поиски путей их коррекции в настоящее время актуальны. Однако представленные в литературе способы базируются на оперативных вмешательствах и применении токсико-химических веществ. В связи с этим в настоящей статье представлен способ моделирования у крыс токсического панкреатита, развитого на фоне дислипидемии и принудительной алкоголизации. Авторами по окончании моделирования токсического панкреатита у крыс проведено исследование гомогената ткани поджелудочной железы (уровень лактата и пировиноградной кислоты, активность глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы и концентрация восстановленного глутатиона) и сыворотки крови (уровень амилазы, общего белка, щелочной фосфатазы, глюкозы и общего холестерина). Для выявления морфофункциональных сдвигов проведено исследование в патологоанатомическом бюро кусочков ткани поджелудочной железы. Согласно полученным данным исследования установлено нарушение метаболических процессов со стороны как углеводного обмена, так и антиоксидантной защиты в ткани поджелудочной железы экспериментальной группы. При морфологическом исследовании ткани поджелудочной железы обнаружены структурно-функциональные изменения, подтверждающие развитие токсического панкреатита у крыс. Таким образом, представленный авторами способ моделирования токсического панкреатита прост в воспроизведении, не требует оперативных вмешательств и использования токсико-химических веществ, в связи с чем может быть использован для изучения особенностей метаболических изменений при развитии данной патологии в условиях, наиболее приближенных для жизни человека.

Ключевые слова: токсический панкреатит, гиперхолестеринемия, алкоголизация, поджелудочная железа

MODELING OF TOXIC PANCREATITIS IN AN EXPERIMENT

Romashenko A.V., Semenets I.A.

Rostov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Rostov-on-Don,
e-mail: semenets.i.a@mail.ru

The analysis of available domestic and foreign literature has shown that the development of new methods for modeling pancreatitis, including alcoholic etiology, and the search for ways to correct them are currently relevant. However, the methods presented in the literature are based on surgical interventions and the use of toxic chemicals. In this regard, this article presents a method for modeling toxic pancreatitis in rats, developed against the background of dyslipidemia and forced alcoholization. At the end of the modeling of toxic pancreatitis in rats, the authors conducted studies of pancreatic tissue homogenate (lactate and pyruvic acid levels, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity and the concentration of reduced glutathione) and blood serum (amylase, total protein, alkaline phosphatase, glucose and total cholesterol). To identify morphofunctional shifts, a study of pieces of pancreatic tissue was conducted in the pathology bureau. According to the obtained data of the study, a violation of metabolic processes on the part of both carbohydrate metabolism and antioxidant protection in the pancreatic tissue of the experimental group was established. Morphological examination of pancreatic tissue revealed structural and functional changes confirming the development of toxic pancreatitis in rats. Thus, the method of modeling toxic pancreatitis presented by the authors is easy to reproduce, does not require surgical interventions and the use of toxic chemicals, and therefore can be used to study the features of metabolic changes in the development of this pathology in the conditions closest to human life.

Keywords: toxic pancreatitis, hypercholesterolemia, alcoholism, pancreas

Известно, что поджелудочная железа является уникальным органом, выполняющим ряд важных функций: вырабатывает специальные ферменты для переваривания пищи и производит инсулин, снижающий уровень глюкозы в крови. Нарушение работы поджелудочной железы приводит к сбою функционирования важных органов и различным заболеваниям, а именно к нарушению желудочно-кишечного тракта, развитию панкреатита, сахарного диабета и ряда сопутствующих заболеваний [1].

На сегодняшний день имеется представление о том, что регулярное употребление алкоголя приводит к формированию токсического панкреатита, сопровождающегося внутриорганной патологией. Но природа повреждающего фактора и взаимосвязь органических нарушений в патогенезе формирования токсического панкреатита окончательно не выяснены [2].

По этой причине не всегда возможно применить исключительно терапевтическое лечение и приходится проводить хирургические вмешательства [3].

В связи с этим актуальным является воспроизведение токсического панкреатита, развитого на фоне гиперлипидемии и алкоголизации, что, как правило, в жизни приводит к патологии поджелудочной железы. Выполнение этой задачи позволит уточнить патогенез заболевания, детально проанализировать механизмы формирования и развития патологического процесса как на тканевом, так и на клеточном уровне, а в дальнейшем поможет разрабатывать патогенетически обоснованные методы профилактики и лечения этого заболевания.

Из данных литературы известны несколько способов развития панкреатита у крыс путем моделирования [4; 5].

Один из способов, апробированный на крысах линии Wistar, включает создание гипертензии в биопанкреатическом протоке, за счет сужения просвета в 1,5 раза. Сужение и стенозирование обеспечивали с помощью внешнего сдавливания обернутым вокруг протока и фиксированным к нему лоскутом из вытянутого политетрафторэтилена [4]. Авторы установили, что морфологические признаки у животных появились на 1-е сутки после вмешательства острого панкреатита, а на 90-е сутки – хронического панкреатита. К недостаткам данного способа можно отнести необходимость хирургического вмешательства и то, что данный вид модели не имеет естественных патологических факторов, способствующих развитию панкреатита.

Другой способ, предложенный авторами [5], заключается в создании модели токсического панкреатита путем деструкции ткани поджелудочной железы крыс единичным введением 1%-го раствора тритона X-100 в объеме 0,1 мл, с последующей алкоголизацией животных в течение трех месяцев 15%-м водным раствором этанола, используемым для питья вместо воды. Но недостатком данного метода является введение животным химического вещества тритона X-100, используемого для разрушения эукариотических клеток, что является не естественным в жизни человека и вызывает падеж экспериментальных животных.

Цель исследования – воспроизвести модель токсического панкреатита на крысах путем моделирования дислипидемии и принудительной алкоголизации.

Материалы и методы исследования

В проводимом авторами статьи эксперименте использовали беспородных крыс-самцов 12 месяцев (вес 300-350 г). В процессе эксперимента животные были разделены на 2 группы: в первую группу входили интактные животные (контрольная) – 30 жи-

вотных, которых кормили натуральными и брикетированными кормами в соответствии с нормами, утвержденными Приказом № 755 от 12.08.77 (Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»); у крыс второй группы – 35 животных (экспериментальная группа), индуцировали токсический панкреатит. Для этого животных содержали на высокожировом рационе в течение трех месяцев, развивая дислипидемию, а после достижения целевого уровня холестерина, равного $3,83 \pm 0,31$ ммоль/л (контроль $2,2 \pm 0,2$ ммоль/л) [6], каждые 24 часа принудительно внутривентрикулярным методом вводили 20%-й спиртовой раствор в расчете 3 мл/кг через пищевой зонд в течение двух месяцев.

По окончании эксперимента животных декапитуировали под эфирным наркозом. Все манипуляции выполнялись в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов над животными», утвержденным I Национальным конгрессом по биоэтике. Забор биоматериала для биохимического и морфологического исследования проводили в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных», «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

Для проведения биохимического анализа готовили гомогенаты ткани печени и поджелудочной железы в соотношении 1 часть ткани к 9 частям охлажденного физиологического раствора, центрифугировали при 3000 об./мин.

В гомогенатах определяли концентрацию лактата, пировиноградной кислоты (ПВК) и восстановленного глутатиона (GSH), а также активность ферментов: глутатионпероксидазы (ГПО) и глутатионредуктазы (ГР) [7].

В сыворотке крови определяли уровень амилазы, общего белка, щелочной фосфатазы, глюкозы и общего холестерина после 12 ч голодания из хвостовой вены крыс (0,3-0,7 мл).

Статистическая обработка проводилась с использованием пакета прикладной программы Statistica, версия 10.0, и Microsoft Office Excel Worksheet. После проверки распределения на нормальность о достоверности отличий учитываемых показателей сравниваемых групп судили по величине t-критерия Стьюдента, при ненормальности распределения – U-критерия Манна – Уитни. Статистически достоверными считали

отличия, соответствующие оценке ошибки вероятности $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что баланс уровня восстановленного и окисленного глутатиона в клетках контролируется отношением ферментов ГР и ГПО, что свидетельствует об антиоксидантной защите клетки и состоянии адаптивно-компенсаторных изменений [8].

Результаты биохимических изменений, полученные при анализе ткани поджелудочной железы, отражены в таблице 1.

Анализ показателей углеводного обмена в гомогенате поджелудочной железы у экспериментальных животных (группа 2) указывал на существенное увеличение уровня лактата на 128,57% ($p < 0,001$) и ПВК на 161,54% ($p < 0,001$) относительно данных контрольной группы, что свидетельствует об усилении аэробных процессов и формировании тканевой гипоксии.

Результаты определения активности ключевых ферментов глутатионового звена антиоксидантной защиты у группы с токсическим панкреатитом в поджелудочной железе указывают на уменьшение активности ГПО на 36,17% ($p < 0,001$) и активности ГР на 53,91% ($p < 0,001$), на фоне тенденции к накоплению концентрации GSH на 28,45% ($p > 0,05$) относительно данных контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении антиоксидантной защиты. Эти данные отражают снижение возможностей глутатионового звена антиоксидантной защиты, что ведет к накоплению продуктов радикальной природы в панкреоцитах.

Результаты анализа крови, полученные по окончании эксперимента у группы с токсическим панкреатитом, отображены в таблице 2.

У животных с токсическим панкреатитом относительно группы контроля выявлено увеличение активности амилазы на 298% ($p < 0,001$) и глюкозы на 107, 24% ($p < 0,001$), а также снижение концентрации общего белка на 16,04% ($p > 0,001$) и активности щелочной фосфатазы на 7,73% ($p > 0,05$), что указывает на развитие воспалительного процесса в клетках поджелудочной железы.

Для выявления морфофункциональных сдвигов проведено исследование в патологоанатомическом бюро ГБУ РО «ПАБ» кусочков ткани поджелудочной железы и печени экспериментальных крыс. Парафиновые срезы фиксировались в 10%-м растворе нейтрального формалина и окрашивались гематоксилином-эозином.

Морфологически в ткани поджелудочной железы выявлена атрофия железистой паренхимы (1) и островков Лангерганса (2), выраженный перидуктальный меж- и внутридольковый липоматоз (3) (рисунок).

Таблица 1

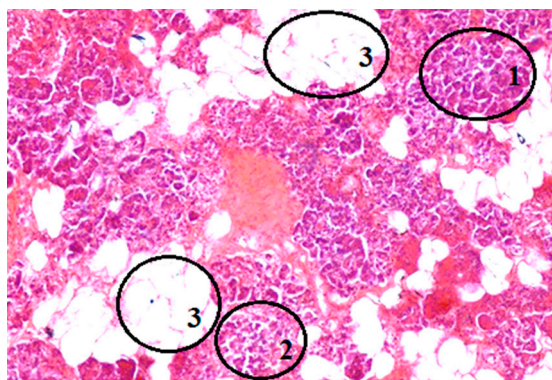
Состояние ключевых показателей углеводного и глутатионового обмена в ткани поджелудочной железы у животных с токсическим панкреатитом

Показатели	Группы	Группа 1, n=30 (контрольная группа)	Группа 2, n=35 (токсический панкреатит)
ПВК, мкмоль/мг белка		0,39±0,04	1,2±0,09*, $p < 0,001$
Лактат, мкмоль/мг белка		3,15±0,29	7,2±0,69*, $p < 0,001$
GSH, мкмоль/мг белка		49,94±5,1	64,15±6,6, $p > 0,05$
ГПО, мкмоль/мг белка		16,2±1,5	10,34±1,1*, $p < 0,001$
ГР, мкмоль/мг белка		1,28±0,13	0,59±0,06*, $p < 0,001$

Таблица 2

Биохимические изменения показателей крови у животных с токсическим панкреатитом

Показатель	Группа	Группа 1, n=30 (контрольная группа)	Группа 2, n=35 (токсический панкреатит)
Амилаза, Е/л		628,21±18,67	2502,33±130,77*, $p < 0,001$
Общий белок, г/л		102,55±3,29	86,1±3,79*, $p > 0,001$
Щелочная фосфатаза, Е/л		1145,78±45,96	134,51±8,46, $p > 0,05$
Глюкоза, ммоль/л		3,04±0,28	6,3±0,48*, $p < 0,001$



Ткань поджелудочной железы ($\times 100$).
На снимке изображена ткань поджелудочной
железы у испытуемого животного № 6
из группы с токсическим панкреатитом

Полученные результаты морфологического исследования доказывают наличие моделируемого заболевания и согласуются с данными, приведенными в литературе [9].

Заключение

Таким образом, полученные данные проведенного анализа показали, что представленный способ моделирования у животных токсического панкреатита приводит к нарушению в ткани поджелудочной железы ключевых звеньев метаболических процессов (углеводного и глутатионового обмена) и морфологических изменений, доказывающих данную патологию.

В отличие от приведенных в литературных источниках методов моделирования панкреатита, предложенный авторами данной статьи способ в эксперименте не требует хирургических манипуляций и введения химических веществ, не естественных в жизни человека, кроме этого, прост в исполнении и не вызывает падежа животных. В связи с этим представленный метод воспроизведения токсического панкреатита у крыс в экспериментальных исследованиях позволяет не только уточнить сложные механизмы развития патологического процесса и структурно-функциональные нарушения в поджелудочной железе, но и может

быть использован для составления схем коррекции, направленных на снижение патобиохимических изменений, происходящих в желудочно-кишечном тракте при токсическом панкреатите.

Список литературы

1. Чартаков Д.К. Динамика физиологических показателей поджелудочной железы в норме и патологии // *Мировая наука*. 2023. №6 (75). URL: https://www.science-j.com/_files/ugd/b06fdc_98de75da049849139d924da6a3da1997.pdf?index=true (дата обращения: 15.09.2023).
2. Окулова И.И., Шимов К.И., Исмаилов А.М., Чернощев Ф.В., Билалова Л.Ф., Рябова Е.Н., Чобаль Ю.М., Суворова О.А., Макарова Е.А., Ходырева Т.О., Рыбина В.А. Влияние алкоголя на организм // *Международный студенческий научный вестник*. 2017. № 5. URL: <https://eduherald.ru/ru/article/view?id=17347> (дата обращения: 12.06.2023).
3. Ивашкин В.Т., Кригер А.Г., Охлобыстин А.В., Анищенко М.А., Кардашева С.С., Алексеенко С.А., Багненко С.Ф., Быков М.И., Будзинский С.А., Буриев И.М., Вишневский В.А., Гальперин Э.И., Глабай В.П., Гольцов В.Р., Дюжева Т.Г., Кармазановский Г.Г., Королев М.П., Красильников Д.М., Кучерявый Ю.А., Маев И.В., Майстренко Н.А., Осипенко М.Ф., Прудков М.И., Симаненков В.И., Солонищин Е.Г., Федоров А.В., Федоров Е.Д., Хлынов И.Б., Чикунова М.В., Шабунин А.В., Шаповальянц С.Г., Шептулин А.А., Шифрин О.С. Клинические рекомендации по диагностике и лечению хронического панкреатита // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2022. № 32(2). С. 99-156. DOI: 10.22416/1382-4376-2022-32-2-99-156.
4. Корсаков И.Н., Восканян С.Э., Найденов Е.В. Способ моделирования хронического панкреатита // *Патент РФ № 2541824*. Патентообладатель ФГБУ «ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России». 2015. Бюл. № 5.
5. Микашинович З.И., Летуновский А.В., Воронкин Д.А., Белоусова Е.С., Бесштанько Е.С., Криволапова И.В. Способ моделирования хронического панкреатита // *Патент РФ № 2394280*. Патентообладатель Микашинович З.И., Летуновский А.В., Воронкин Д.А., Белоусова Е.С., Бесштанько Е.С., Криволапова И.В. 2010. Бюл. № 19.
6. Микашинович З.И., Белоусова Е.С., Семенец И.А., Ромашенко А.В., Кантария А.В. Способ моделирования эссенциальной гиперхолестеринемии // *Патент РФ № 2733693*. Патентообладатель Семенец И.А. 2020. Бюл. № 28.
7. Данилова Л.А. *Справочник по лабораторным методам исследований*. СПб.: Питер, 2003. 736 с.
8. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Алеид Р., Новичкова М.Д., Саприн А.Н., Березов Т.Т. Современные представления об антиоксидантной роли глутатиона и глутатионзависимых ферментов // *Вестник Российской АМН*. 2010. № 3. С. 46-54.
9. Паклина О.В., Кармазановский Г.Г., Сетдикова Г.Р. Патоморфологическая и лучевая диагностика хирургических заболеваний поджелудочной железы: атлас. М.: Видар-М, 2014. 188 с.