

УДК 616.37-002.3-089-019

В.В.Максим'юк

Кафедра хірургії (зав. – проф. І.Ю. Полянський) Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ

Резюме. В експерименті розроблено новий спосіб моделювання гострого панкреатиту, суть якого полягає у відтворенні внутрішньопротокової гіпертензії шляхом перев'язки протоки підшлункової залози з наступним введенням у паренхіму органа розчину медичної жовчі з трипсином. Застосування розробленої моделі дозволяє досягти внутрішньоацинарної активізації панкреатичних ензимів і вірогідно відтворювати основні макро- та мікроскопічні ознаки гострого панкреатиту, що створює необхідні умови для адекватного дослідження його патогенетичних механізмів.

Ключові слова: гострий панкреатит, експериментальна модель.

Моделювання гострого панкреатиту (ГП) – одна з складних та невирішених проблем експериментальної хірургії. Це зумовлено різноманітністю та варіабельністю альтераційних чинників, що зумовлюють ініціацію автокаталітичного ураження підшлункової залози (ПЗ) та багатокomпонентністю патогенетичних механізмів, які беруть участь у розвитку місцевої адаптаційної відповіді [1].

Упродовж останніх десятиліть було розроблено цілий ряд експериментальних моделей ГП у різних тварин: 1) імунологічні; 2) індуковані секреторами; 3) індуковані дією; 4) індуковані перев'язкою протоки ПЗ; 5) індуковані введенням у головну протоку ПЗ різноманітних речовин; 6) мікрораскулярні [1-8].

Разом з тим, багато дослідників вказують на те, що агенти, які найбільш часто використовуються для індукції ГП у експериментальних тварин (церулеїн, холіндефіцитна і етіонінвмісна дієта та ін.), передбачають ініціацію лише окремих його патогенетичних ланок [2, 4, 7, 8]. У зв'язку з цим, існує загальноновизнана думка, що жодна із запропонованих на сьогодні експериментальних моделей не є ідеальною у відтворенні клінічного перебігу ГП і може застосовуватись лише для вивчення окремих патогенетичних феноменів, які притаманні даній патології.

Мета дослідження: розробити нову експериментальну модель гострого панкреатиту, використання якої дозволяло відтворювати розвиток поширеного деструктивного автокаталітичного ураження підшлункової залози, ознаки якого значною мірою відповідали б характеру перебігу гострого деструктивного панкреатиту в клініці.

Матеріал і методи. Об'єктом експериментальних досліджень стали 63 статевозрілі кролі породи "Сірий велетень", вагою від 8 до 10 кг, у яких виконували моделювання ГП за розробленою методикою (патент на корисну модель № 66667). Для цього експериментальним тваринам під комбінованим внутрішньовенним наркозом виконували лапаротомію. У місці примикання ПЗ до стінки кишки, шляхом ретельного препарування тканин за використання оптичного обладнання, проводили виділення протоки ПЗ та її повну перев'язку прошивною лігатурою. Після цього у паренхіму всіх відділів ПЗ ін'єкційним шляхом вводили розчин медичної жовчі з трипсином з розрахунку 0,4-0,5 мл/кг. Черевну порожнину зашивали наглухо.

З метою оцінки адекватності розробленого способу та його відповідності характеру перебігу ГП у клініці проводили визначення рівня трипсину крові за В.Ф. Erlander et al. (1961) у модифі-

© Максим'юк В.В., 2013

кації В.А. Шатерникова (1966), ліпази крові за Р. Fossati et. al. (1992), амілази крові та сечі за W.T. Caraway (1959). Паралельно виконували динамічну оцінку макро- та мікроморфологічних проявів ГП. Забарвлення гістологічних зрізів проводили гематоксилін-еозином. Забір матеріалу досліджень (крові, сечі, тканин ПЗ) проводили до моделювання панкреатиту, а також на 1-у, 3-ю, 5-у, 7-у та 14-у добу з часу його ініціації.

При виконанні досліджень дотримувались загальноприйнятих світових та вітчизняних норм здійснення досліджень у галузі біології та медицини, а саме: Ванкуверської конвенції про біомедичні дослідження (1979,1994) та інших законодавчих актів, що діють на території України.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що впродовж 24 год з часу моделювання панкреатиту летальності у дослідних тварин не спостерігалось. При спостереженні за тваринами відмічали: кволість, втрату апетиту, блювання, ригідність та болючість (позитивна моторно-рухова реакція на виклик больових подразників) черевної стінки. Аускультативно відмічалось послаблення перистальтичних хвиль.

Макроскопічно в черевній порожнині виявляли незначну кількість геморагічного ексудату, набряк ПЗ з наявністю окремих субкапсулярних вогнищевих крововиливів, гіперемію місцевої очеревини, набряк та геморагічну імбібіцію тканин великого сальника, помірно роздуті петлі кишечника.

При гістологічному дослідженні ПЗ відмічено помірно виражений набряк міжчасточкового інтерстиційного простору і субкапсулярної ділянки. У розширених сполучнотканинних прошарках спостерігались плазморагії, геморагії, відкладення фібрину, запальна клітинна інфільтрація, а у стромі – наявність множинних дрібних крововиливів. Серед ацинусів з нормальною будовою виявлялися окремі групи клітин з деструктивними змінами різного типу та окремі вогнища колікваційного некрозу.

Через 72 год з часу моделювання панкреатиту шість тварин померло (летальність – 9,6%). У тварин, які вижили, відмічали загальну слабкість, відмову від їжі, обмеженість рухових функцій, блювання, ригідність та болючість черевної стінки, виражене пригнічення перистальтики, метеоризм.

Макроскопічно виявлялись вірогідні ознаки деструктивного ураження ПЗ: помірна кількість геморагічного перитонеального ексудату, вогнища некрозу панкреатичної паренхіми, вира-

жений набряк великого сальника та суміжних тканин, стеатонекрози, гіперемія пристінкової та нутрошевої очеревини. Тонка та товста кишка були помірно роздутими.

При гістологічному дослідженні визначалися виражений набряк та повнокров'я стромы ПЗ, різке наповнення вен та судин мікроциркуляторного русла, геморагічна імбібіція між- та внутрішньочасточкової стромы, початкові ознаки формування фібринових мікротромбів, розширення внутрішньо- та міжацинарних протоків. Відмічали наявність вогнищ колікваційного некрозу та появу осередків жирового некрозу (рис. 1).

Впродовж перших п'яти діб перебігу експериментального панкреатиту померло 19 тварин (летальність – 30,2%). У даний термін часу тварини були кволими, майже не рухались, відмічалось багаторазове блювання, надуття живота, повна відсутність перистальтичних хвиль.

Макроскопічно виявлялись вірогідні ознаки прогресуючого змішаного (геморагічного та жирового) панкреонекрозу. Тонка та товста кишка були роздуті, переповнені.

При гістологічному дослідженні ПЗ у більшості ацинусів виявлялися виражені порушення тканинної архітектоники, некроз і гнійне розплення ацинарних клітин, яке починалось з периферії ацинусів і носило тотальний характер. При цьому, у збережених ацинусах панкреатоцити вирізнялись вираженим поліморфізмом (переважно були дрібними) та містили невелику кількість апікально розташованих секреторних гранул.

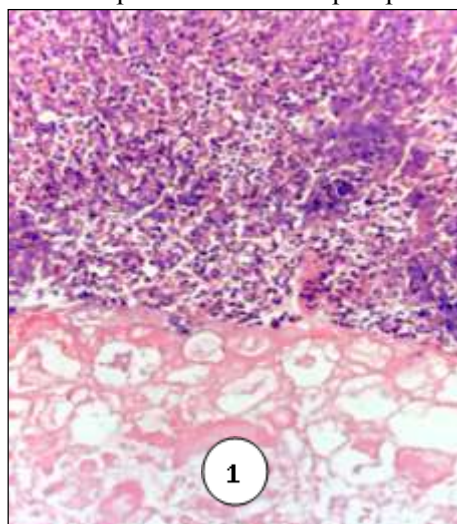


Рис. 1. Гістологічний зріз підшлункової залози кроля через 72 год з часу моделювання гострого панкреатиту: жировий некроз панкреатичної паренхіми (1). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.10х. Ок.20х

Острівці Лангерганса визначалися тільки в ацинусах зі збереженою цитоархітектонікою. Впродовж 7 діб з часу моделювання експериментального панкреатиту померло 24 тварини (летальність - 38,1%). При спостереженні за тваринами, що вижили, відмічали: виражену загальну слабкість, повну відмову від їжі і води, блювання, швидко прогресуюче зневоднення та виражені ознаки гіповолемії, тахіпное, ціаноз слизових оболонок, олігурію, виражений метеоризм, відсутність випорожнень.

При ревізії черевної порожнини: тотальне некротичне ураження ПЗ на тлі її вираженого набряку та порушення часточкової структури; множинні вогнища стеатонекрозів та геморагій у ПЗ, заочеревинній клітковині, брижі кишечника; виражений набряк великого сальника та парапанкреатичних тканин з численними вогнищами стеатонекрозів; деформацію і розширення просвіту дванадцятипалої кишки з вираженою гіперемією та інфільтрацією її стінки; значну кількість геморагічного перитонеального ексудату; гіперемію пристінкової та нутрощевої очеревини з вогнищами дрібних крапкоподібних крововиливів.

При гістологічному дослідженні ПЗ виявлялися виражені ознаки поширеного деструктивного ураження ацинарного компартменту з розвитком тотального некрозу ацинусів та їх повного лізису (рис. 2). Серед некротичного детриту панкреоцитів спостерігалися окремі осередки вцілілих острівців Лангерганса, які були утворені дрібними гетерогенними клітинами з гомогенною цитоплазмою. Окремо слід зазначити, що у багатьох препаратах виявлялися значно дилатовані міжацинарні протоки, наявність яких засвідчувало застій пасажу панкреатичного секрету.

На 14-у добу перебігу експериментального панкреатиту живими залишалися тільки п'ять тварин (летальність – 92,1%), при огляді яких відмічали виражену кволість, адинамію, тахіпное, пригнічення перистальтики та метеоризм. Пальпаторно у верхніх відділах черевної порожнини (у проєкції ПЗ) визначався нерухомий інфільтрат з нерівною поверхнею та без чіткого контуру, при надавлюванні на який відмічалась різка позитивна моторно-рухова реакція тварин на виклик больових подразників.

При ревізії черевної порожнини виявляли пухкий запальний парапанкреатичний іфільтрат, представлений ПЗ, стінками шлунка і дванадцятипалої кишки, великим сальником та задньою черевною стінкою. На стінках цих органів визначалися численні осередки стеатонекрозів. При роз'єднанні інфільтрату, як правило в

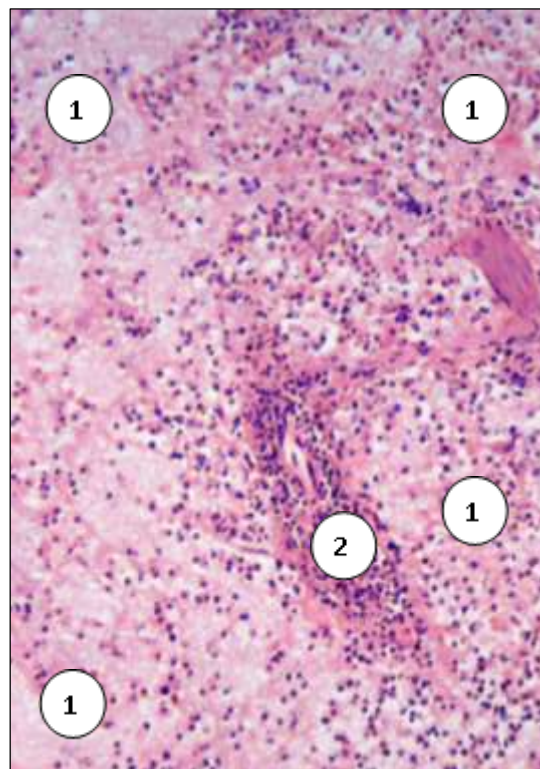


Рис. 2. Гістологічний зріз підшлункової залози кроля через 7 діб з часу моделювання гострого панкреатиту: виражені ознаки поширеного деструктивного ураження ацинарного компартменту з розвитком тотального некрозу ацинусів та їх повного лізису (1); периваскулярний запальний інфільтрат (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.10х. Ок.10х.

дистальній частині (голівки) ПЗ, відмічались вірогідні ознаки абсцедування панкреатичної паренхіми – місцеве накопичення гнійного ексудату з домішками детриту та некротизованої панкреатичної паренхіми, яке відмежовувалось від суміжних тканин та органів власною піогенною оболонкою, представленою фібрознозміненими тканинами (рис. 3).

При гістологічному дослідженні тканин в ділянці формування абсцесу визначали тотальний некроз екзо- та ендокринних клітин, їх лізис та розплавлення, руйнування колагенових волокон. У перифокальних тканинах виявлялись різка демаркаційна інфільтрація поліморфонуклеарними лейкоцитами (лімфоїдними елементами), а у сполучнотканинних прошарках навколо ацинусів, виявлялися фібробласти, що свідчило про початок розвитку фіброзних змін (рис. 4).

Унаслідок вивчення активності панкреатичних ферментів на різних стадіях перебігу експериментального панкреатиту встановлено, що через 24 год з часу ініціації захворювання активність ліпази венозної крові істотно зростала у 3,8



Рис. 3 Макропрепарат підшлункової залози кроля через 14 діб з часу моделювання гострого панкреатиту: порожинна абсцесу підшлункової залози (1), піогенна оболонка, представлена фібрознозміненими тканинами (2). Збільшено у 1,5 раза

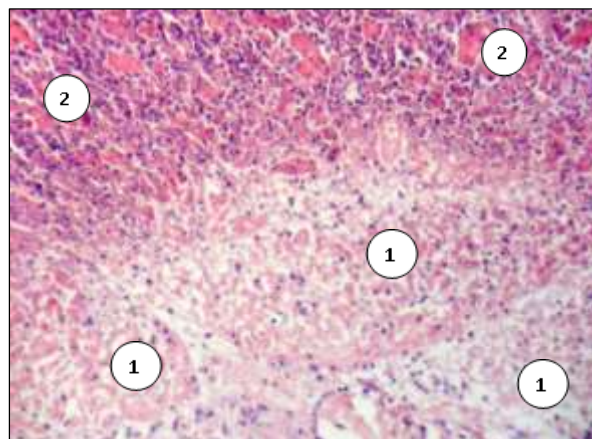


Рис. 4 Гістологічний зріз підшлункової залози кроля через 14 діб з часу моделювання гострого панкреатиту: тотальний некроз екзо- та ендокринних клітин, їх лізис (1), перифокальна демаркаційна інфільтрація поліморфонуکلєарними лейкоцитами (2). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Об.10х. Ок.10х

раза ($P < 0,001$), трипсину – у 1,4 рази ($P < 0,01$), α -амілази – у 1,6 рази ($P < 0,05$).

При розвитку початкового некротичного ураження ПЗ (3-я доба) та його подальшому поширенні та прогресуванні (5-7-а доба) активність ферментів ПЗ прогресивно знижувалась. Зокрема, на 7-у добу перебігу експериментального панкреатиту порівняно з 1-ою добою, активність ліпази, трипсину та амілази істотно зменшувалась у 6,1 ($P < 0,001$), 1,6 ($P < 0,001$) та 2,0 рази ($P < 0,05$) відповідно. Подібну динаміку змін виявлено при вивченні активності α -амілази сечі. Величина вказаного показника на 1-у та 3-ю добу з часу моделювання панкреатиту, при порівнянні з контролем, у 2,2 ($P < 0,05$) та 3,9 ($P < 0,001$) рази відповідно істотно зростала з наступним зниженням на 7-у добу, при порівнянні з 3-ою добою, майже у 10 разів ($P < 0,001$). З 7-ої по 14-у добу перебігу експериментального панкреатиту відмічено істотне зниження активності трипсину крові у 2,2 рази ($P < 0,05$) та тенденції до зниження рівня ліпази крові та амілази крові і сечі.

Виявлена динаміка змін вказаних діагностично-моніторингових параметрів автокаталітичного ураження ПЗ свідчить, що ініціація панкреатиту за розробленою методикою супроводжується вираженим підвищенням рівня панкреати-

чних ензимів у крові та сечі, а розвиток та прогресування поширеного панкреонекрозу характеризується різким зниженням їх активності.

Висновки 1. Розроблена експериментальна модель забезпечує внутрішньооцинарну активацію панкреатичних ензимів з наступним розвитком тотального автокаталітичного ураження панкреатичної паренхіми, що дозволяє адекватно відтворювати стадійність перебігу гострого деструктивного панкреатиту та виникнення його гнійно-некротичних ускладнень. 2. За умов застосування розробленої експериментальної моделі гострого панкреатиту, його ініціація, розвиток та прогресування супроводжується виникненням специфічних клінічних, лабораторних, макро- та мікроморфологічних змін, які у значній мірі відповідають характерним ознакам перебігу гострого деструктивного панкреатиту в клінічних умовах. 3. Розроблена модель гострого панкреатиту є технічно простою та низьковартісною, що може бути використана для широкого експериментального застосування.

Перспективи наукового пошуку. Розроблення адекватного експериментального відтворення місцевих та системних ускладнень гострого панкреатиту, що дозволить дослідити нові механізми їх виникнення та розробити ефективні методи лікування.

Список використаної літератури

1. Моделирование острого панкреатита у крыс введением трипсина и змеиного яда / В.Г. Вискунов, А.Б. Пупышев, С.И. Проценко [и др.] // Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2008. – № 6. – С. 17-21.
2. Патент 24584 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання гострого панкреатиту / Ничитайло М.Ю., Підмурняк О.О., Берегова Т.В., Фалалєєва Т.М.; заявник та патентовласник Інститут хірургії та трансплантології АМН України. Заявка №

и200700464; заявл. 17.01.07; опубл. 10.07.07, Бюл. № 10. 3. Способ моделирования острого деструктивного панкреатита (Экспериментальное исследование) / А.О. Луговой, С.А. Заринская, В.Г. Владимиров [и др.] // *Анналы хирург. гепатол.* – 2007. – Т. XII, № 4. – С. 84-90. 4. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Nataurocholate / J.M. Laukkarinen, G.J.D. Van Acker, E.R. Weiss [et al.] // *Gut.* – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1590-1598. 5. Chan Y.C. Acute pancreatitis: animal models and recent advances in basic research / Y.C. Chan, P.S. Leung // *Pancreas.* – 2007. – Vol. 34, № 1. – P. 1-14. 6. Granger J. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators / J. Granger, D. Remick // *Shock.* – 2005. – Vol. 24, № 1. – P. 45-51. 7. L-Arginine-induced experimental pancreatitis / P. Hegyi, Z.Jr. Rakonczay, R. Sari [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 10., № 3. – P. 2003-2009. 8. Pathologic alterations detected in acute pancreatitis induced by sodium taurocholate in rats and therapeutic effects of curcumin, ciprofloxacin and metronidazole combination / A. Gulcubuk, K. Sonmez, A. Gurel [et al.] // *Pancreatology.* – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 345-353.

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА

Резюме. В эксперименте разработан новый способ моделирования острого панкреатита, суть которого заключается в воспроизведении внутрипротокового гипертензии путем перевязки протока поджелудочной железы с последующим введением в паренхиму органа раствора медицинской желчи с трипсином. Применение разработанной модели позволяет достичь интраацинарной активизации панкреатических энзимов и достоверно воспроизводить основные макро- и микроскопические признаки острого панкреатита, создает необходимые условия для адекватного исследования его патогенетических механизмов.

Ключевые слова: острый панкреатит, экспериментальная модель.

METHOD OF ACUTE PANCREATITIS MODELLING

Abstract. A new method of acute pancreatitis modeling was designed experimentally, the essence of which consists in reproducing intraductal hypertension by means of ligation of the excretory pancreatic duct followed by administration of bile medical solution with trypsin into the pancreatic parenchyma. The application of the designed model makes it possible to achieve intra-acinar activation of pancreatic enzymes and reliably reproduce the major macro and microscopic signs of acute pancreatitis, creating the conditions necessary for an adequate study of its pathogenic mechanisms.

Key words: acute pancreatitis, experimental model.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 20.09.2013 р.

Рецензент – проф. Гнатюк М.С. (Тернопіль)