



Куделич О.А.✉, Кондратенко Г.Г., Метелица Т.Г., Колесникова Т.С., Ходосовская Е.В.
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Обоснование выбора модели тяжелого острого панкреатита, пригодной для изучения новых подходов к его лечению

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Куделич О.А., Кондратенко Г.Г. – концепция и дизайн исследования; Куделич О.А., Метелица Т.Г. – проведение эксперимента; Куделич О.А. – обработка данных, оценка результатов, написание статьи; Метелица Т.Г., Колесникова Т.С., Ходосовская Е.В. – выполнение гематологических и биохимических исследований, иммуноферментный анализ; Кондратенко Г.Г. – утверждение рукописи для публикации.

Финансирование. Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований по заданию «Разработать метод терапии острого тяжелого экспериментального панкреатита с применением биопродуктов клеточного происхождения» подпрограммы «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2» государственной научно-технической программы «Биотехнологии-2» на 2021–2025 годы, присвоен № гос. регистрации в ГУ «Бел ИСА» 20220363 от 28.03.2022. Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей авторы не получали.

Одобрение комитета по этике. Протокол исследований утвержден на заседании этической комиссии УО «БГМУ» (№ 8 от 01.02.2022). Все работы проводились в соответствии с международными правилами и принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью (Страсбург, 18.03.1986), а также в соответствии с Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в УО «БГМУ».

Подана: 21.11.2022

Принята: 20.03.2023

Контакты: kudelichsurg@gmail.com

Резюме

Цель. По клинико-лабораторным данным обосновать выбор экспериментальной модели тяжелого острого панкреатита, пригодной для изучения новых подходов к системному (патогенетическому) лечению данного заболевания.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование проводилось на 30 половозрелых крысах-самцах линии Wistar. Животные случайным образом были разделены на 3 группы: I группа (n=6) – интактные животные, II группа (n=6) – моделирование острого панкреатита (ОП) путем введения 10% раствора Тритон X-100, III группа (n=18) – моделирование ОП путем введения 5% раствора Тритон X-100. Из эксперимента животных выводили путем эвтаназии на 1-е, 2-е, 3-и и 7-е сутки от начала моделирования ОП. У всех животных в контрольные сроки производили забор крови и органов для патоморфологических исследований.

Результаты. В результате экспериментальных исследований было установлено, что модель ОП, созданная введением 0,3 мл 5% раствора неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в желудочно-селезеночную часть поджелудочной железы, позволяет воспроизвести у животных тяжелую форму заболевания с существенным нарушением лабораторных показателей (повышением в крови уровня провоспалительных цитокинов, СРБ, накоплением продуктов перекисного окисления липидов, оксида азота) и развитием эндогенной интоксикации.

Заключение. Полученные результаты обосновывают выбор данного способа моделирования ОП для экспериментальной оценки влияния новых средств на динамику



заболевания, а также для выявления возможностей проводить коррекцию системных патологических изменений.

Ключевые слова: острый панкреатит, эксперимент, интерлейкины, синдром системного воспалительного ответа, поджелудочная железа

Kudelich O.✉, Kondratenko G., Miatselitsa T., Kalesnikava T., Khadasouskaya A.
Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Justification of the Choice of the Model of Severe Acute Pancreatitis Suitable for Studying New Approaches to Its Treatment

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Kudelich O., Kondratenko G. – conception and design of the work; Kudelich O., Miatselitsa T. – experiment, data collection and processing of research materials; Kudelich O. – data collection and processing of research materials, article writing; Miatselitsa T., Kalesnikava T., Khadasouskaya A. – performing hematological and biochemical studies, enzyme immunoassay; Kondratenko G. – final approval of the version to be published.

Funding. The work was carried out in accordance with the plan of scientific research on the assignment "Develop a method for the treatment of acute severe experimental pancreatitis using bioproducts of cellular origin" of the subprogram "Molecular and cellular biotechnologies-2" of the state scientific and technical program "Biotechnologies-2" for 2021–2025, awarded No. state. Registration in the State Institution "Bel ISA" 20220363 dated 03/28/2022. The authors received no financial support from the manufacturing companies.

Ethics committee approval. The research protocol was approved at the ethics committee of the Belarusian State Medical University meeting (No. 8 dated 02/01/2022). All works were carried out in accordance with international rules and the principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.03.1986), as well as in accordance with the Regulations on the use of experimental animals in research and educational process in the Belarusian State Medical University.

Submitted: 21.11.2022

Accepted: 20.03.2023

Contacts: kudelichsurg@gmail.com

Abstract

Purpose. Based on clinical and laboratory data, to justify the choice of an experimental model of severe acute pancreatitis suitable for studying new approaches to systemic (pathogenetic) treatment of this disease.

Materials and methods. This experimental study was carried out on 30 adults Wistar rat. Animals were randomly divided into 3 groups: group I (n=6) – intact animals, group II (n=6) – acute pancreatitis (AP) induced by the introduction of a 10% solution of Triton X-100, group III (n=18) – AP induced by the introduction of a 5% solution of Triton X-100. Animals were taken out of the experiment by euthanasia on the 1st, 2nd, 3rd and 7th day. Blood and organs were taken from all animals for pathomorphological studies at the control time.

Results. As a result of experimental studies, it was found that the model of AP induced by the introduction of a 0.3 ml of 5% solution of nonionic polyethylene glycol octylphenol ether detergent into pancreatic tissue allows to reproduce in animals a severe form of the disease with significant violation of laboratory parameters (increase of proinflammatory cytokines, CRP, accumulation of lipid peroxidation products, nitric oxide) and development of endogenous intoxication.

Conclusion. The results obtained justify the choice of this method of modeling AP for experimental evaluation of the effect of new agents on the dynamics of the disease, as well as to identify opportunities to carry out the correction of systemic pathological changes.

Keywords: acute pancreatitis, experiment, interleukins, systemic inflammatory response syndrome, pancreas

■ ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость острым панкреатитом (ОП) за последнее десятилетие остается на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению. Распространенность заболевания составляет в среднем 3–10% случаев среди неотложных заболеваний органов брюшной полости. У большинства пациентов развивается отечная форма ОП, которая не представляет сложности в лечебном отношении, характеризуется абортным течением и разрешается на протяжении 48–72 часов под воздействием комплексной консервативной терапии. Однако в 15–30% наблюдений заболевание отличается тяжелым течением с высокой летальностью – от 15 до 40% [1, 2]. Столь высокая частота неблагоприятных исходов острого тяжелого панкреатита во многом обусловлена тяжелой эндогенной интоксикацией (ЭИ), неадекватная и несвоевременная коррекция которой лежит в основе развития синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), полиорганной недостаточности и других панкреатогенных осложнений [1].

В последнее время требования к консервативной терапии ОП существенно возросли: она должна быть более целенаправленной и патогенетически строго обоснованной; методы инструментальной диагностики и виды хирургических пособий также продолжают совершенствоваться [3, 4]. Таким образом, тяжелый ОП до сих пор остается проблемным экстренным хирургическим заболеванием, что вынуждает искать новые лечебные подходы.

Согласно мировому медицинскому опыту доклиническая разработка, изучение и обоснование целесообразности использования новых методов лечения вначале должны проводиться в эксперименте. Поэтому важно, чтобы модель заболевания была обоснована определенными характеристиками: являлась легко воспроизводимой и приближенной к клинической практике.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

По клинко-лабораторным данным обосновать выбор экспериментальной модели тяжелого острого панкреатита, пригодной для изучения новых подходов к системному (патогенетическому) лечению данного заболевания.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился в клинике экспериментальной медицины Научно-исследовательской части при Белорусском государственном медицинском университете. Протокол исследований утвержден на заседании этической комиссии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (№ 8 от 01.02.2022).



Все работы проводились в соответствии с международными правилами и принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и с другой научной целью (Страсбург, 18.03.1986), а также в соответствии с Положением о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в Белорусском государственном медицинском университете [5].

Дизайн эксперимента

Экспериментальное исследование проводилось на 30 половозрелых крысах-самцах линии Wistar весом 275–380 г. Животные содержались в соответствии с нормативами индивидуального размещения [6–9]. Световой режим соответствовал естественному уровню освещенности в течение суток на географической широте г. Минска (53°54'N). Температура воздуха поддерживалась в пределах 20–22 °C, относительная влажность – 45–50%.

Перед началом проведения эксперимента животные выдерживались в выделенном боксе в течение одной недели для адаптации к новым условиям. С целью минимизации дополнительного контакта с различными антигенами во время эксперимента крысы содержались в закрытом режиме в вентилируемых шкафах (производство «Ламсистемс», Республика Беларусь). Выходящий воздух фильтровался через систему фильтров шкафа, входящий – подвергался антибактериальной обработке с использованием рециркуляторов бактерицидных LedNik Clean Air UV 4 (производство ООО «Ледник Лайт», Российская Федерация). Таким образом, достигался 8 ИСО класс чистоты фильтруемого воздуха согласно ГОСТ ИСО 14644-1-2017. Для содержания животных в шкафах использовались пластиковые клетки (производство Shanghai Pretty Industries, КНР). Габариты клеток (Ш×Г×В, см): 26×37×20. В течение эксперимента животные содержались в клетках индивидуально. Температура и влажность воздуха в шкафах регистрировались ежедневно с использованием комбинированного прибора Testo 608-H1 (гигрометр-термометр), который относится к средствам измерения и проходит ежегодную поверку в БелГИМ.

Перед проведением исследования все животные взвешивались, тщательно осматривались на наличие видимой патологии и признаков болезней. Животные с выявленной патологией выбраковывались. До начала основного эксперимента случайным образом было изъято 6 крыс (группа I, интактные животные) для предварительной оценки лабораторных показателей. Поскольку полученные данные не отличались от нормальных физиологических показателей у представителей используемых лабораторных животных, эти данные были приняты за норму.

Панкреатит моделировали по способу Э.С. Гульянц с соавт. (1986), при котором для создания модели различных форм ОП в ткань поджелудочной железы (ПЖ) вводят разные концентрации раствора Тритон X-100 (1–5%) в диапазоне доз от 0,2 до 0,4 мл [10]. Данная модель была выбрана не случайно, так как развитие острого экспериментального панкреатита, вызванного у животных таким способом, сопровождается развитием всех фаз острого панкреатита, наблюдающихся у людей [11]. В связи с этим для адекватного воспроизведения модели тяжелой (некротизирующей) формы ОП следовало отработать ее технологию, выбрать необходимую концентрацию, объем раствора и место введения в ткань ПЖ. Все манипуляции выполнялись у животных, подвергнутых анестезии тиопенталом натрия (производитель

ОАО «Синтез», г. Курган, Российская Федерация) из расчета 45 мг/кг массы. Для воспроизведения острого экспериментального панкреатита выполняли лапаротомию, извлекали желудочно-селезеночную часть поджелудочной железы (справочно: ПЖ крысы имеет три основные части – головку (дуоденальная часть), тело (пилорическая часть) и хвост (желудочно-селезеночная часть)). Инсулиновым шприцем в ткань ПЖ вводили 0,3 мл различной концентрации раствора неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира (Тритон X-100, производитель Carl Roth GmbH & Co. KG, Германия) стандартно всем опытным животным. После завершения манипуляции ПЖ аккуратно погружали в брюшную полость, переднюю брюшную стенку ушивали наглухо однорядными узловыми швами. Хирургические процедуры выполнялись в стерильных условиях. Все операции были выполнены одним автором, продолжительность каждой операции составила около 15 минут. В послеоперационном периоде всем животным проводили обезболивание внутримышечным введением кеторолака из расчета 4,8 мг/кг/сут массы животного, антибиотикопрофилактика не проводилась.

Животные случайным образом были разделены на 3 группы: I группа (n=6) – интактные животные, II группа (n=6) – моделирование ОП путем введения 10% раствора Тритон X-100, III группа (n=18) – моделирование ОП путем введения 5% раствора Тритон X-100. Из эксперимента животных выводили путем эвтаназии на 1-е, 2-е, 3-и и 7-е сутки от начала моделирования ОП. Последней точкой измерения выбраны 7-е сутки, так как ранее проведенными исследованиями установлено, что введение 0,3 мл 5% раствора неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в ткань ПЖ уже на 1-е сутки воспроизводит у животных тяжелую форму заболевания с гистологической картиной некроза ткани железы [12]. У всех животных в контрольные сроки производили забор крови для лабораторных исследований. Вначале выполнялась наркотизация животного с использованием тиопентала натрия в дозе 45 мг/кг веса посредством внутрибрюшинной инъекции, осуществлялось вскрытие грудной клетки и взятие крови из сердца в объеме 4,5–5 мл посредством пункции для биохимических, гематологических, серологических исследований. Затем животному дополнительно производили внутрибрюшинную инъекцию тиопентала натрия в дозе 200 мг/кг для эвтаназии.

Гематологические исследования

Кровь для гематологических исследований помещали в пробирку с калиевой ЭДТА соответствующего объема и перемешивали без вспенивания. На этикетке пробирки маркером для записи фиксировали номер каждого образца. Пробирки помещали в штативы и сохраняли в течение часа при температуре 20,0–22,0 °C до выполнения исследования. Исследования были выполнены на ветеринарном автоматическом гематологическом анализаторе 5-дифф. iVet-5, Norma Instruments Zrt. (Венгрия). Для калибровки анализатора были использованы контрольные материалы для ветеринарного гематологического автоматического анализатора iVet-5, произведенные изготовителем. У животных были изучены следующие гематологические показатели: количество эритроцитов, гемоглобин (Hb), гематокрит, количество тромбоцитов, количество лейкоцитов.



Биохимические исследования

Сыворотка крови для биохимического исследования от одного животного была получена следующим образом: цельную кровь добавляли в пробирку со спреевым активатором свертывания. На этикетку пробирки наносили маркировку. Пробирку помещали в термостат при температуре 37 °С на 30 минут. После этого пробирку центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 15 минут при температуре 20,0–22,0 °С. При помощи дозатора сыворотка отбиралась в микропробирку объемом 1,5 мл. На полоску пробирки ставилась маркировка. Далее сыворотка замораживалась в морозильной камере при температуре –20 °С до проведения исследования. В день проведения исследования сыворотку размораживали при температуре 20,0–22,0 °С. Исследования были выполнены с использованием биохимического анализатора А-25, BioSystems (Испания), и наборов реактивов для него (Fenox Medical Solutions, Республика Беларусь). Исследуемые биохимические показатели сыворотки крови – креатинин, мочевины, глюкоза, С-реактивный белок (СРБ), АЛТ, АсАТ, альфа-амилаза.

Иммуноферментный анализ

Для исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовалась сыворотка крови. Концентрацию интерлейкина-6 (ИЛ-6) в образцах крови определяли с использованием набора реагентов Fine Test RAT IL-6 Elisa Kit (КНР). Содержание в сыворотке крови фактора некроза опухоли альфа (ФНО-α) определяли с использованием набора реагентов Fine Test RAT TNF-α Elisa Kit (КНР). Содержание оксида азота (NO) определяли с использованием набора реагентов RAT Nitric Oxide BT LAB Kit (КНР) в соответствии с инструкциями производителя.

Оценка перекисного окисления липидов

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по уровню накопления вторичных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Содержание МДА в гемолизатах крови оценивали по методу T. Asakava и S. Matsushita [13].

Оценка цитотоксичности сыворотки крови

Оценка токсического действия исследуемых образцов сыворотки крови выполнялась на спленоцитах селезенки крысы. Выделенный образец селезенки интактной крысы переносили во флакон с культуральной средой RPMI-1640, содержащей 5% сыворотки FBS и антибиотики (стрептомицин – 100 мкг/мл, пенициллин – 100 МЕ/мл). Для получения суспензии клеток спленоцитов селезенку крысы подвергали механической дезагрегации методом гомогенизации. Далее суспензию клеток наслаивали на градиент Ficoll-Нугауе (Sigma, США) плотностью 1,077 г/см³ и центрифугировали в течение 25 минут при 1300 об/мин. Клетки «интерфазы» собирали и отмывали в культуральной среде RPMI-1640 с 5% FBS центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут. Далее в титровочные лунки с исследуемой сывороткой крыс добавляли по 100 мкл спленоцитов в концентрации 1 млн/мл. Плату культивировали в течение 24 часов при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. Подсчет жизнеспособности клеток проводили в камере Горяева, смешивая 0,2% раствор трипанового синего с равным объемом клеточной культуры.

Статистика

Статистическая обработка полученных в исследовании результатов производилась с помощью программы IBM SPSS Statistics 23 с предварительной проверкой соответствия рассматриваемых переменных нормальному распределению по критерию Колмогорова – Смирнова. Количественные признаки представлены как средняя арифметическая вариационного ряда и ее стандартная ошибка ($M \pm m$) при нормальном распределении или медиана и интерквартильный размах ($Me [Q_{25}; Q_{75}]$) при распределении, отличном от нормального. Для количественных имеющих нормальное распределение признаков оценку статистической значимости различий между группами проводили при помощи критерия Стьюдента (t). При отличном от нормального распределения признаков использовали непараметрический U-критерий Манна – Уитни (Mann – Whitney U-test). Непараметрической альтернативой t -критерию для зависимых выборок являлся критерий Вилкоксона (Wilcoxon signed-rank test). Для описания взаимосвязи двух количественных признаков использовали коэффициенты корреляции Пирсона (r) при нормальном распределении и Спирмена (r_s) – при распределении, отличном от нормального. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После моделирования ОП у крыс II группы в течение всего эксперимента отмечались адинамия, глубокое угнетение, вынужденное положение на боку, животные не употребляли пищу. Летальность в этой группе составила 100%. Три крысы погибли через 6 часов от начала моделирования ОП, одна – через 24 часа и две – на 2-е сутки эксперимента. Забор крови у животных этой группы не выполнялся, органы и ткани умерших животных подверглись только патоморфологическому анализу.

У животных III группы клинические проявления заболевания были однотипны: в течение первых суток у них отмечались гиподинамия, несколько заторможенное поведение, снижение исследовательской реакции, они переставали употреблять пищу. Летальности в этой группе не было.

Как следует из табл. 1, у животных III группы за весь период наблюдения не отмечалось достоверных изменений гематологических показателей в сыворотке крови по сравнению с контрольными значениями (Mann – Whitney U-test, $p > 0,5$).

Преждевременная активация внутриклеточных ферментов поджелудочной железы является важным ранним этапом патогенеза ОП. Согласно международным рекомендациям одним из критериев установки диагноза ОП является повышение ферментов поджелудочной железы (липаза/амилаза) по сравнению с нормальными значениями [3, 4]. В настоящем исследовании признаком развития острого панкреатита явилась ферментемия с повышением уровня α -амилазы в крови животных в 1,4 раза относительно нормальных значений. Как следует из табл. 2, уже на 1-е сутки от начала моделирования ОП отмечалось повышение активности α -амилазы до 1948,50 [1766,0; 1948,50] ед/мл по сравнению с нормальными значениями (1422,0 [1373,0; 1764,50] ед/мл) (Mann – Whitney U-test, $p = 0,096$), что свидетельствовало об уклонении в системный кровоток этого фермента поджелудочной железы. В дальнейшем на протяжении 7 суток отмечалось достоверное нарастание ферментемии, и к концу эксперимента содержание α -амилазы достигло 1975,5 [1679,75; 3107,50] ед/мл, показатели были достоверно выше по сравнению с нормой (Mann – Whitney U-test, $p = 0,025$).



Таблица 1
Изменение гематологических показателей в сыворотке крови животных III группы
Table 1
Changes in hematological parameters in the blood serum of animals of group III

Показатели	Интактные животные (n=6)	Животные III группы			
		1-е сутки (n=3)	2-е сутки (n=3)	3-и сутки (n=6)	7-е сутки (n=6)
Гемоглобин, г/л	125,50 [113,0; 139,25]	111,50 [101,0; 115,50] U=3,0; P=0,311	114,0 [108,0; 114,0] U=4,0; P=0,197; P ₁ =0,655	124,0 [109,0; 131,50] U=16,5; P=0,810; P ₂ =0,285; P ₄ =0,180	122,0 [117,5; 140,75] U=17,0; P=0,873; P ₃ =0,463; P ₅ =0,180; P ₆ =0,109
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	7,55 [6,93; 8,06]	7,28 [6,35; 7,28] U=6,0; P=1,0	7,16 [6,90; 7,16] U=4,0; P=0,197; P ₁ =0,653	7,20 [6,03; 7,30] U=9,5; P=0,172; P ₂ =0,593; P ₄ =0,655	6,9 [6,55; 7,25] U=8,0; P=0,109; P ₃ =0,916; P ₅ =0,655; P ₆ =0,593
Гематокрит, %	0,39 [0,33; 0,42]	0,35 [0,31; 0,35] U=4,0; P=0,505	0,34 [0,32; 0,34] U=5,0; P=0,302; P ₁ =0,655	0,35 [0,32; 0,37] U=11,5; P=0,297; P ₂ =1,0; P ₄ =0,655	0,36 [0,32; 0,38] U=11,5; P=0,294; P ₃ =0,833; P ₅ =0,655; P ₆ =0,285
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	6,23 [3,86; 8,34]	5,30 [4,70; 5,30] U=4,0; P=0,505	7,30 [6,80; 7,30] U=5,0; P=0,302; P ₁ =0,18	7,40 [4,31; 9,53] U=13,0; P=0,421; P ₂ =0,109; P ₄ =0,180	7,45 [6,60; 8,65] U=9,0; P=0,150; P ₃ =0,753; P ₅ =0,180; P ₆ =1,0
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	553,0 [428,25; 751,0]	452,0 [435,0; 452,0] U=3,0; P=0,317	476,0 [363,0; 476,0] U=5,0; P=0,302; P ₁ =0,655	376,0 [301,5; 784,0] U=13,0; P=0,423; P ₂ =0,109; P ₄ =0,655	651,50 [540,75; 782,25] U=12,0; P=0,337; P ₃ =0,116; P ₅ =0,618; P ₆ =0,285

Примечания: P – достоверность различий между интактными животными и животными III группы (Mann – Whitney U-test); P₁ – достоверность различий между 1-ми и 2-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₂ – достоверность различий между 2-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₃ – достоверность различий между 3-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₄ – достоверность различий между 1-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₅ – достоверность различий между 1-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₆ – достоверность различий между 2-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon).

Как показали ранее проведенные нами исследования, развитие тяжелых форм острого панкреатита не ограничивается поражением только поджелудочной железы. При данной патологии наблюдаются полиорганные поражения с нарушением функций сердечно-сосудистой системы, легких, печени и почек, что вносит значительный вклад в наступление летальных исходов при тяжелом (некротизирующем) остром панкреатите [14]. В результате массивного поступления в кровь активированных панкреатических и лизосомальных ферментов, биологически активных

Таблица 2
Динамика биохимических показателей в сыворотке крови животных III группы
Table 2
Dynamics of biochemical parameters in the blood serum of animals of group III

Показатели	Интактные животные (n=6)	Животные III группы			
		1-е сутки (n=3)	2-е сутки (n=3)	3-и сутки (n=6)	7-е сутки (n=6)
Альфа-амилаза, ед/мл	1422,0 [1373,0; 1764,50]	1948,50 [1766,0; 1948,50] U=1,0; P=0,096	1874,50 [1797,0; 1874,50] U=0,0; P=0,02; P ₁ =0,655	1937,0 [1567,0; 2493,0] U=5,0; P=0,037; P ₂ =0,593; P ₄ =0,655	1975,5 [1679,75; 3107,50] U=4,0; P=0,025; P ₃ =0,60; P ₅ =0,180; P ₆ =0,285
АсАТ, ед/л	124,50 [96,25; 156,0]	297,50 [244,0; 297,50] U=60,0; P=0,046	177,0 [166,0; 177,0] U=1,0; P=0,096; P ₁ =0,180	152,0 [97,50; 318,50] U=13,0; P=0,423; P ₂ =0,180; P ₄ =0,180	169,0 [136,50; 177,50] U=7,0; P=0,078; P ₃ =0,917; P ₅ =0,180; P ₆ =0,655
АлАТ, ед/л	55,0 [44,50; 63,50]	87,0 [82,0; 87,0] U=0,0; P=0,044	56,50 [54,0; 56,50] U=9,0; P=1,0; P ₁ =0,655	44,0 [39,50; 53,50] U=13,5; P=0,467; P ₂ =1,0; P ₄ =0,655	50,0 [44,25; 65,25] U=16,0; P=0,747; P ₃ =0,833; P ₅ =0,655; P ₆ =0,285
Мочевина, ммоль/л	6,0 [5,0; 6,25]	5,50 [5,0; 5,50] U=4,5; P=0,584	3,50 [3,0; 3,50] U=0,0; P=0,017; P ₁ =0,180	7,0 [5,50; 10,50] U=8,0; P=0,099; P ₂ =0,276; P ₄ =0,180	6,0 [5,0; 6,25] U=18,0; P=1,0; P ₃ =0,50; P ₅ =0,180; P ₆ =1,0
Креатинин, ммоль/л	77,71 [71,15; 92,76]	83,53 [79,69; 83,53] U=3,0; P=0,317	63,25 [62,40; 63,25] U=2,0; P=0,071; P ₁ =0,6180	79,18 [55,95; 57,77] U=16,0; P=0,749; P ₂ =0,593; P ₄ =0,180	67,62 [60,34; 77,45] U=11,0; P=0,262; P ₃ =0,917; P ₅ =0,180; P ₆ =0,285
Глюкоза, ммоль/л	8,0 [6,75; 8,25]	7,0 [5,0; 7,0] U=5,5; P=0,864	7,50 [7,0; 7,50] U=8,5; P=0,887; P ₁ =0,655	9,0 [6,50; 11,50] U=14,0; P=0,511; P ₂ =0,180; P ₄ =0,180	8,0 [6,25; 10,25] U=15,5; P=0,684; P ₃ =0,462; P ₅ =0,180; P ₆ =0,414

Примечания: P – достоверность различий между интактными животными и животными III группы (Mann – Whitney U-test); P₁ – достоверность различий между 1-ми и 2-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₂ – достоверность различий между 2-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₃ – достоверность различий между 3-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₄ – достоверность различий между 1-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₅ – достоверность различий между 1-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₆ – достоверность различий между 2-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon).



веществ, токсических продуктов распада ПЖ при некробиозе и активации калликреин-кининовой системы печень является одним из первых органов-мишеней панкреатогенной токсемии, так как отток венозной крови от ПЖ осуществляется в систему воротной вены. Такая агрессия эндотоксинов уже на ранних стадиях развития тяжелого ОП может приводить к изменению гистоструктуры печени и нарушению метаболизма гепатоцитов [15].

При изучении динамики изменений биохимических показателей в сыворотке крови животных III группы установлено, что уже через 24 часа от начала моделирования ОП достоверно увеличивалась концентрация ферментов цитолиза печени – аланиновой (АлАТ) и аспарагиновой (АсАТ) аминотрансфераз (табл. 2). На 1-е сутки у животных этой группы уровень АсАТ в сыворотке крови был достоверно выше, чем у интактных животных (297,50 [244,0; 297,50] и 124,50 [96,25; 156,0] ед/л соответственно; Mann – Whitney U-test, $p=0,046$). В дальнейшем на протяжении эксперимента отмечено снижение этого показателя, однако на 7-е сутки уровень АсАТ так и не достиг нормальных значений (169,0 [136,50; 177,50] ед/л; Mann – Whitney U-test, $p=0,078$). При исследовании уровня АлАТ через 24 часа от начала эксперимента у животных III группы также отмечен достоверный рост этого показателя по сравнению с нормальными значениями (87,0 [82,0; 87,0] и 55,0 [44,50; 63,50] ед/л соответственно; Mann – Whitney U-test, $p=0,044$).

Синдром системного воспалительного ответа в первые сутки от начала ОП провоцирует макро- и микроциркуляторные расстройства во внутренних органах, в частности в почках, приводя к их острому повреждению. В настоящем исследовании показатели азотовыделительной функции почек (мочевина и креатинин) достоверно не изменялись (табл. 2), однако на 3-и сутки зафиксировано повышение этих показателей относительно физиологической нормы.

В настоящее время окислительный стресс признан ключевым медиатором не только ранних интраацинарных событий, но и системных воспалительных реакций. Поврежденная ацинарная клетка выделяет свободные радикалы кислорода и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), которые способны активировать нейтрофилы с последующим потенцированием ССВО и микроциркуляторных расстройств. Интенсивность ПОЛ отображают концентрации промежуточных (диеновые конъюгаты) и конечных (малоновый диальдегид (МДА)) продуктов окисления [16]. Как следует из табл. 3, уже через 24 часа от начала моделирования ОП отмечалось достоверное повышение уровня МДА по сравнению с нормальными значениями (26,70 [25,30; 26,70] и 18,65 [16,50; 19,53] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U-test, $p=0,046$). В дальнейшем на протяжении 3-х суток сохранялась повышенная его концентрация в сыворотке крови, и только на 7-е сутки от начала эксперимента содержание МДА не отличалось от контрольных значений (16,65 [12,60; 19,45] мкмоль/мл; Mann – Whitney U-test, $p=0,423$).

Основные механизмы цитотоксического действия нейтрофилов обусловлены активацией кислородзависимых механизмов и синтеза оксида азота, которые для большого количества юных нейтрофилов, мигрировавших в очаг воспаления, являются наиболее энергетически выгодными, учитывая незрелость ферментативных систем клеток. Активные формы кислорода (АФК), выделяемые нейтрофилами, оказывают прямое цитотоксическое действие, кроме того, стимулируют процессы перекисного окисления липидов, а в результате взаимодействия оксида азота (NO)

Таблица 3

Изменение показателей окислительного стресса в сыворотке крови животных III группы

Table 3

Changes in indicators of oxidative stress in the blood serum of animals of group III

Показатели	Интактные животные (n=6)	Животные III группы			
		1-е сутки (n=3)	2-е сутки (n=3)	3-и сутки (n=6)	7-е сутки (n=6)
МДА, мкмоль/мл	18,65 [16,50; 19,53]	26,70 [25,30; 26,70] U=0,0; P=0,046	26,25 [24,60; 26,25] U=0,0; P=0,02; P ₁ =0,180	21,60 [19,40; 22,45] U=8,0; P=0,109; P ₂ =0,109; P ₄ =0,180	16,65 [12,60; 19,45] U=13,0; P=0,423; P ₃ =0,028; P ₅ =0,180; P ₆ =0,109
Оксид азота (NO), мкмоль/л	28,71 [21,70; 30,98]	58,21 [49,13; 51,21] U=0,0; P=0,046	43,93 [40,83; 43,93] U=0,0; P=0,02; P ₁ =0,180	41,21 [40,30; 41,79] U=0,0; P=0,004; P ₂ =0,109; P ₄ =0,180	22,84 [20,22; 27,95] U=10,0; P=0,20; P ₃ =0,028; P ₅ =0,180; P ₆ =0,109

Примечания: P – достоверность различий между интактными животными и животными III группы (Mann – Whitney U-test); P₁ – достоверность различий между 1-ми и 2-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₂ – достоверность различий между 2-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₃ – достоверность различий между 3-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₄ – достоверность различий между 1-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₅ – достоверность различий между 1-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₆ – достоверность различий между 2-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon).

с супероксидными анионами происходит образование пероксинитрита, который является крайне цитотоксичным продуктом. Это сильнодействующий оксидант, способный повреждать эпителий. Он вызывает вазодилатацию, нарушает транспорт кислорода и приводит к ухудшению кислородного статуса организма, NO также стимулирует секвестрацию тромбоцитов, увеличивает проницаемость клеточных мембран, вызывает метаболические и структурные повреждения клеток эндотелия, обладает цитотоксическим эффектом [18].

В первые сутки после моделирования концентрация NO в сыворотке крови животных III группы достоверно (в 2 раза) превышала исходные значения (58,21 [49,13; 51,21] и 28,71 [21,70; 30,98] мкмоль/мл соответственно; Mann – Whitney U-test, p=0,046) и на протяжении 72 часов оставалась высокой (p<0,05). Только на 7-е сутки содержание NO не отличалось от нормальных значений (22,84 [20,22; 27,95] мкмоль/мл; Mann – Whitney U-test, p=0,2) (табл. 3).

Необходимо подчеркнуть, что оксид азота играет важную роль в механизмах инициации окислительного стресса. У здоровых лиц обнаружена достоверная отрицательная корреляционная связь между параметрами NO и МДА, однако при окислительном стрессе происходит нарушение этой взаимосвязи [17]. В нашем исследовании в результате статистического анализа выявлена значимая корреляционная зависимость между содержанием NO и МДА (Spearman r = 0,704; p=0,002) со статистически достоверным повышением их уровня, что подтверждает наличие эндогенной интоксикации и окислительного стресса и указывает на развитие тяжелой формы экспериментального панкреатита.



Согласно данным специальной литературы, первичным источником провоспалительных медиаторов при ОП являются сами клетки ацинусов ПЖ. В ответ на прямое повреждение ацинарной клетки происходит синтез ИЛ-1 β и ФНО- α . Эта первоначальная реакция недостаточно сильна, чтобы она могла сама по себе вызвать серьезные патологические последствия. Однако она активизирует лейкоциты и молекулы сосудистой адгезии, что приводит к инфильтрации активированными лейкоцитами ткани поджелудочной железы [18, 19]. В связи с этим оценка тяжести моделируемого острого панкреатита производилась и по выраженности синдрома системного воспалительного ответа, для чего в динамике определяли уровни провоспалительных интерлейкинов (ФНО- α , ИЛ-6) и С-реактивного белка. В первые сутки после моделирования ОП отмечался рост концентрации ФНО- α по сравнению с интактными животными, хотя разница не была достоверной (20,87 [16,32; 20,87] и 16,18 [11,94; 20,95] пг/мл соответственно; Mann – Whitney U-test, $p=0,317$). На вторые сутки концентрация ФНО- α в этой группе снизилась и не отличалась от таковой до моделирования (14,17 [10,16; 14,17] пг/мл; Mann – Whitney U-test, $p=1,00$) (табл. 4).

Известно, что после того, как активированный нейтрофил проникает в ткань, происходит «респираторный взрыв» с выбросом большого количества протеолитических ферментов, свободных радикалов кислорода и цитокинов, способных

Таблица 4
Динамика маркеров ССВО в сыворотке крови животных III группы
Table 4
Dynamics of SIRS markers in the blood serum of animals of group III

Показатели	Интактные животные (n=6)	Животные III группы			
		1-е сутки (n=3)	2-е сутки (n=3)	3-и сутки (n=6)	7-е сутки (n=6)
ИЛ-6, пг/мл	5,0 [4,0; 6,25]	28,50 [25,0; 28,50] U=0,0; P=0,039	22,0 [4,0; 22,0] U=5,0; P=0,285; P ₁ =0,180	5,0 [4,50; 55,0] U=10,5; P=0,109; P ₂ =0,209; P ₄ =0,180	5,50 [4,75; 96,50] U=11,0; P=0,242; P ₃ =0,28; P ₅ =0,180; P ₆ =0,109
ФНО- α , пг/мл	16,18 [11,94; 20,95]	20,87 [16,32; 20,87] U=3,0; P=0,317	14,17 [10,16; 14,17] U=9,0; P=1,00; P ₁ =0,655	16,58 [10,04; 20,41] U=14,0; P=0,855; P ₂ =0,593; P ₄ =0,655	14,76 [7,57; 19,42] U=15,0; P=0,61; P ₃ =0,50; P ₅ =0,655; P ₆ =1,0
СРБ, мг/л	0,20 [4,0; 6,25]	0,35 [0,30; 0,35] U=0,5; P=0,034	0,30 [0,0; 0,30] U=1,5; P=0,025; P ₁ =0,655	0,40 [0,30; 0,55] U=1,0; P=0,004; P ₂ =0,109; P ₄ =0,655	0,30 [0,0; 0,30] U=3,0; P=0,005; P ₃ =0,917; P ₅ =0,655; P ₆ =1,0

Примечания: P – достоверность различий между интактными животными и животными III группы (Mann – Whitney U-test); P₁ – достоверность различий между 1-ми и 2-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₂ – достоверность различий между 2-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₃ – достоверность различий между 3-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₄ – достоверность различий между 1-ми и 3-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₅ – достоверность различий между 1-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon); P₆ – достоверность различий между 2-ми и 7-ми сутками (критерий Wilcoxon).

разрушать клетки и привлекать новые лейкоциты, в том числе моноциты. Моноциты затем превращаются в активные макрофаги, которые начинают вырабатывать большое количество провоспалительных медиаторов (ИЛ-6, ИЛ-8 и др.) и растворимых рецепторных белков. Выброс значительного количества провоспалительных цитокинов может активировать лейкоциты в системной циркуляции, включая микроциркуляторные русла печени, почек, легких и других органов, что снова индуцирует синтез медиаторов воспаления (цитокиновый каскад) [18]. Это приводит к сепсисоподобному состоянию, характеризующемуся лихорадкой, лейкоцитозом и высвобождением белков острой фазы, таких как СРБ, компонентов комплемента и ферритина. В исследовании Dambrauskas и соавт. было установлено, что тяжелый ОП был связан с гиперэкспрессией провоспалительных цитокинов, а ИЛ-6 является одним из маркеров дифференциальной диагностики между легким и тяжелым острым панкреатитом [19].

Как показал эксперимент, в первые сутки после моделирования ОП отмечался значительный рост концентрации ИЛ-6 (в 5 раз) по сравнению с нормой (28,50 [25,0; 28,50] и 5,0 [4,0; 6,25] пг/мл соответственно; Mann – Whitney U-test, p=0,039), уровень этого показателя оставался высоким и до окончания эксперимента (табл. 4).

Считается, что увеличение уровня СРБ у пациента с острым панкреатитом более 150 мг/мл может свидетельствовать о тяжелом течении данного заболевания [1, 3, 4]. Уже на 1-е сутки от начала моделирования ОП содержание СРБ в сыворотке крови животных III группы достоверно превышало исходный уровень (0,35 [0,30; 0,35] и 0,20 [4,0; 6,25] пг/мл соответственно; Mann – Whitney U-test, p=0,034) и оставалось высоким на протяжении всего срока наблюдения (табл. 4).

Эндогенная интоксикация и расстройства макро- и микрогемоциркуляции являются ключевыми звеньями патогенеза уже на ранних стадиях некротизирующих форм ОП, они определяют тяжесть течения и прогноз заболевания. Установлено (табл. 5), что у животных III группы через 24 часа от начала эксперимента заметно увеличилась цитотоксичность сыворотки крови. Так, при внесении в сыворотку крови этих животных взвеси спленоцитов выживаемость их падала и составляла 89% по сравнению с выживаемостью спленоцитов в сыворотке крови интактных животных. Последнее определенно свидетельствовало о наличии эндогенной интоксикации. В остальные сроки снижения жизнеспособности клеточной культуры в исследуемых сыворотках не наблюдалось.

Таким образом, уже на 1-е сутки от начала моделирования ОП у животных III группы отмечалось повышение активности α -амилазы с достоверным нарастанием

Таблица 5
Показатели изучения жизнеспособности спленоцитов в сыворотке крови животных (тыс/мл)
Table 5
Indicators of the study of the viability of splenocytes in animal blood serum (thousand/ml)

Варианты	Разведение 1:2	Разведение 1:4	Разведение 1:8	% ЖСП
Контроль клеток	430; 440; 440; 600; 330; 500 M=457			
Контроль клеток интактных крыс	730; 710; 820; 790 M=762,5			100
Животные III группы (1-е сутки)	670; 690 M=680	760; 780 M=770	800; 795 M=800	89



этой активности, и на 7-е сутки она превышала нормальные значения в 1,4 раза ($p < 0,05$). Развитие цитокинового каскада подтверждалось достоверным ($p < 0,05$) и значительным ростом концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-6) и С-реактивного белка. Выявлены выраженные признаки окислительного стресса, о чем свидетельствовало достоверное ($p < 0,05$) увеличение содержания малонового диальдегида и оксида азота в сыворотке крови животных. Снижение выживаемости спленоцитов в сыворотке крови и увеличение значений АсАТ и АлАТ ($p < 0,001$), возникшие через 1 сутки после моделирования, указывали на развитие патологических процессов в органах-мишенях. Выявленные изменения патогенетически характерны для тяжелой формы острого панкреатита, что обосновывает целесообразность выбора данной экспериментальной модели для изучения влияния биопродуктов клеточного происхождения на патологический процесс.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Модель острого панкреатита, воспроизводимая введением 0,3 мл 5% раствора неионного детергента полиэтиленгликоль-октилфенолового эфира в желудочно-селезеночную часть поджелудочной железы, позволяет создать у животных тяжелую форму заболевания, пригодную для изучения новых подходов к его системному лечению.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Savelliev V.S., Filimonov M.I., Burnevich S.Z. *Pancreonecrosis*. Moscow: M.I.A. 2008; 264 p. (in Russian)
2. Petrov M.S., Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(3):175–184. doi: 10.1038/s41575-018-0087-5
3. Banks P.A., Bollen T.L., Dervenis C., Gooszen H.G., Johnson C.D., Sarr M.G., Tsiotos G.G., Vege S.S.; Acute Pancreatitis Classification Working Group. Classification of acute pancreatitis – 2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut*. 2013;62(1):102–11. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302779
4. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2013;13(4 Suppl 2):e1–15. doi: 10.1016/j.pan.2013.07.063
5. *Regulations on the procedure for the use of experimental animals in research work and the educational process at the Belarusian State Medical University: order of the Min. health care № 309 dated 15.06.2012*. Minsk: BSMU. 2006; 6 p. (in Russian)
6. *State standard 33215-2014 Guidelines for keeping and increasing the volume of laboratory animals. Rules for equipping premises and organizing procedures*. Introduction 07.01.2016. Moscow: "Standartinform". 2016; 19 p. (in Russian)
7. *Decree of the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus dated May 21, 2010 No. 36 "On approval of the Veterinary and Sanitary Rules for the reception, care and dissection of experimental animals in vivariums of research institutes, stations, laboratories, educational institutions, as well as in nurseries"*. Rep. Belarus. Minsk. (in Russian)
8. *Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Republic of Belarus No. 131 of October 31, 2006 "On Approval of the Sanitary Rules of Norms 2.1.2-18-2006 "Arrangement, Equipment and Maintenance of Experimental Biological Clinics (Vivariums)"*. Rep. Belarus. Minsk. (in Russian)
9. *State standard 33216-2014. Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for the maintenance and care of laboratory rodents and rabbits*. Introduction 01.05.2017. Moscow: "Standartinform". 2016; 10 p. (in Russian)
10. Gulyants E.S., Lukash N.A., Tkacheva T.N., Surgutanova T.A., Kalmykova Yu.A. Pancreatitis modeling method: patent № 1027755 USSR, G 09 B23/28 /. Rostov Medical Institute. *Discoveries. Inventions*. 1987;28:211. (in Russian)
11. Koleshko S.V., Lis R.E. Modeling of pathological processes in the pancreas, as close as possible to clinical practice. *Journal of the Grodno State Medical University*. 2009;2(26):159–62. (in Russian)
12. Kudelich O.A., Kondratenko G.G., Letkovskaya T.A., Potapnev M.P., Nerovnya A.M., Stepuro O.A. Morphological substantiation of the model of severe acute pancreatitis. *Surgery. Eastern Europe*. 2022;11(4):490–502. Available at: doi.org/10.34883/Pl.2022.11.4.014. (in Russian)
13. Asakava T., Matsushita S. Colorus condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*. 1980;5(3):137–140.
14. Kudelich O.A., Kondratenko G.G., Yudina O.A., Motolyanets P.M. Multivariate analysis of factors associated with immediate causes of death in severe acute pancreatitis. *Novosti Khirurgii*. 2014;22(4):416–27. Available at: http://dx.doi.org/10.18484/2305-0047.2014.4.416. (in Russian)
15. Plekhanov A.N., Reshetnikov D.I. Porto-hepatic hemodynamics in patients with destructive pancreatitis combined with liver failure. *Acta Biomedica Scientifica*. 2016;1(4):68–71. Available at: https://doi.org/10.12737/22971. (in Russian)
16. Pădureanu V., Florescu D.N., Pădureanu R., Ghenea A.E., Gheonea D.I., Oancea C.N. Role of antioxidants and oxidative stress in the evolution of acute pancreatitis (Review). *Exp Ther Med*. 2022;23(3):197. doi: 10.3892/etm.2022.11120
17. Golikov P.P. *Nitric oxide in the clinic of emergency conditions*. Moscow: Medpraktika. 2004; 180 p. (in Russian)
18. Singh P., Garg P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J Gastroenterol*. 2016;35(3):153–66. doi: 10.1007/s12664-016-0647-y
19. Dambrauskas Z., Giese N., Gulbinas A., Giese T., Berberat P.O., Pundzius J., Barauskas G., Friess H. Different profiles of cytokine expression during mild and severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2010;16(15):1845–53. doi: 10.3748/wjg.v16.i15.1845