

## Создание модели острого некротического панкреатита

В.А. ГОРСКИЙ<sup>1</sup>, М.А. АГАПОВ<sup>1</sup>, И.В. ЛЕОНЕНКО<sup>1</sup>, А.И. БАТТАЕВ<sup>2</sup>

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117997, Российская Федерация<sup>1</sup>

Главный военный клинический госпиталь ФСБ России, Петровское шоссе, д. 48, Голицыно, 143040, Российская Федерация<sup>2</sup>

**Актуальность** В патогенезе острого панкреатита остается большое количество нерешенных вопросов, в связи с этим экспериментальные исследования в указанном направлении не утратили своей актуальности.

**Цель исследования** Разработка модели острого некротического панкреатита, характеризующегося повышенным выбросом цитокинов в периферический кровоток.

**Материалы и методы** В работе использовано 60 самцов аутбредных крыс SD категории SPF в возрасте 12-14 недель. Создавали церулеиновую, алкогольную и механическую модели острого панкреатита.

**Результаты и их обсуждение** При введении церулеина некроза поджелудочной железы не получили. Данная модель не сопровождалась статистически значимым увеличением уровня цитокинов. Алкогольная модель также не привела к развитию некроза поджелудочной железы. Увеличения уровня цитокинов не наблюдали. Механическая модель морфологически характеризовалась выраженными воспалительно-некротическими изменениями ткани поджелудочной железы у всех животных.

**Выводы** Модель панкреонекроза у крыс, созданная оперативным путем посредством частичной окклюзии желчевыводящего протока, может быть рекомендована для оценки эффективности препаратов, обладающих цитокин-ингибирующей активностью.

**Ключевые слова** Панкреонекроз, экспериментальные модели, цитокины

## Creation of Model of Acute Necrotizing Pancreatitis

V.A. GORSKII<sup>1</sup>, M.A. AGAPOV<sup>1</sup>, I.V. LEONENKO<sup>1</sup>, A.I. BATTAEV<sup>2</sup>

N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova Str., Moscow, 117997, Russian Federation<sup>1</sup>

Main Military Clinical Hospital of the Russian FSS, 48 Petrovskoe Rte., Golitsyno, 143040, Russian Federation<sup>2</sup>

**Relevance** In the pathogenesis of acute pancreatitis remains a large number of unresolved issues. Therefore, experimental studies of ETA have not lost their relevance.

**The purpose of the study** Is developing of model of acute necrotizing pancreatitis (ANP) characterized by increased release of cytokines into peripheral blood.

**Materials and methods** In our research we had 60 12 to 14-week old male outbred (Sprague Dawley) SPF rats. Cerulein, alcohol and mechanical model were created.

**Results and their discussion** Cerulein injection at given doses did not induce pancreatic necrosis. This model was not associated with statistically significant elevation of cytokine levels. Alcohol model also did not cause pancreatic necrosis.

**Conclusion** Mechanical model was characterized by pronounced inflammation and necrosis of pancreatic tissue in all animals. The model of APN reproduced by creation of partial common biliary duct obstruction may be recommended for assessment of effectiveness of medications inhibiting cytokine release.

**Key words** Acute necrotizing pancreatitis, model, cytokines

Изучение патогенеза острого панкреатита (ОП) и оценка новых терапевтических стратегий являются задачами экспериментальных исследований. За более чем 150 летнюю историю работ, посвященных экспериментальному изучению ОП, накоплен достаточный опыт, позволяющий воссоздать острую, хроническую и рецидивирующую формы заболевания.

В настоящее время наиболее востребованными являются следующие модели ОП: окклюзия петли двенадцатиперстной кишки [1]; безхолиновая диета, дополненная этионином [2]; перевязка билиопанкреатического протока [3]; инъекция церулеина [4]; пер-

фузия билиопанкреатического протока [5]; введение алкоголя; перфузия билиопанкреатического протока и одномоментная гиперстимуляция церулеином [6].

Каждая из выше описанных моделей имеет свои недостатки, но и не лишена преимуществ. Все это необходимо учитывать перед планированием исследования и, тем более, при интерпретации полученных результатов. В зарубежных исследованиях наиболее часто встречается церулеиновая и алкогольная модели. Данные модели менее инвазивны, более экономичны, успешно используются при изучении ОП и для разработки методов его лечения.

Цель исследования: оценить существующие модели ОП у крыс, основанные на внутрибрюшинном введении церулеина и комбинации выпаивания алкоголя с внутрибрюшинным введением церулеина; на основании проведенного анализа создать собственную модель острого некротического панкреатита (ОНП), характеризующуюся массивным выбросом цитокинов в периферический кровоток.

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено в лаборатории биологических испытаний государственного естественно-научного института (г. Пущино Московской области). В эксперименте использовали 65 самцов аутбредных крыс CD категории SPF в возрасте 12-14 недель. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, указанным в руководстве Guide for Care and Use of Laboratory Animals. (ILAR publication, 1996, National Academy Press).

Церулеиновую модель (30 крыс) создавали путем внутрибрюшинного введения раствора церулеина в дозах 20 и 40 мкг/кг массы животного. Для получения алкогольной модели (16 крыс) производили длительное (от 14 дней до 2,5 месяцев) выпаивание животным 10% раствора этилового спирта вместо питьевой воды. Трех животным для потенцирования эффекта алкоголя вводили раствор церулеина в дозе 40 мкг/кг.

Механическую модель создавали путем формирования неполного стеноза общего желчного протока (14 крыс). Девяти крысам в качестве дополнительного фактора агрессии вводили раствор церулеина в дозе 40 мкг/кг. Пять крыс составили контрольную группу.

Эвтаназию экспериментальных животных осуществляли помещением их в CO<sub>2</sub>-камеру с последующим

обескровливанием. Кровь забирали для исследования уровней  $\alpha$ -амилазы, АСТ, АЛТ и цитокинов. Определяли провоспалительные цитокины: интерлейкин 6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли -  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и противовоспалительный – интерлейкин 10 (ИЛ-10). После этого осуществляли забор внутренних органов для морфологического исследования. Поджелудочную железу извлекали целиком и фиксировали в 10% нейтральном формалине. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином и исследовали методом световой микроскопии.

Уровень амилазы измеряли в сыворотке крови стандартными реагентами Biolabo Reagents (Франция) на биохимическом анализаторе Ellipse AMS.

Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) измеряли методом Karmenandal в модификации Henryandal.

Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) измеряли методом Wroblekskiand La Due, оптимизированному Henryand Bergmeuer.

Определение цитокинов. Кровь для получения сыворотки набирали в пробирки с активатором свертывания (SiO<sub>2</sub>). После центрифугирования и полной ретракции сгустка, сыворотку собирали и хранили в течение 2-3 месяцев при температуре -70°C.

Концентрацию цитокинов определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы e-Biosciences.

Анализ микропрепаратов проводили на микроскопе проходящего света DMLA Leica, Германия.

Статистическую обработку результатов исследований производили в программном пакете Stat Soft Statistica 6.0 с использованием непараметрических критериев. Для сравнения групп по количественным

Таблица 1

#### Сравнительные показатели уровня цитокинов у крыс после введения церулеина (20 мкг/мг)

Группа	ИЛ10	ИЛ6	ФНО $\alpha$
Животные с введением церулеина	66,56 $\pm$ 3*	117,88 $\pm$ 12	13,73 $\pm$ 7
Контроль	50,72 $\pm$ 8*	127,27 $\pm$ 14	19,80 $\pm$ 6

\*статистически значимые различия в показателях

Таблица 2

#### Индивидуальные данные значений $\alpha$ -амилазы, АЛТ, АСТ в сыворотке крови крыс CD при создании алкогольной модели

Группа	$\alpha$ -амилаза	АЛТ	АСТ
Алкоголь (2,5мес.)	831,9 $\pm$ 121	62 $\pm$ 12	153 $\pm$ 31
Нормальные значения	489,0-609,0	110,0-140,0	72,0-196,0

Таблица 3

#### Сравнительные показатели уровня секреции цитокинов у крыс после выпаивания алкоголя и введения церулеина в дозе 40 мкг/кг

Группа	ИЛ10	ИЛ6	ФНО $\alpha$
	Конц. Пг/мл	Конц. Пг/мл	Конц. Пг/мл
Алкоголь (2,5 мес.)	63,04 $\pm$ 2	146,81 $\pm$ 7	12,06 $\pm$ 2
Алкоголь (14дней)+церулеин	59,15 $\pm$ 4	142,25 $\pm$ 7	13,63 $\pm$ 5
Алкоголь (2,5мес.)+церулеин	68,13 $\pm$ 8	224,24 $\pm$ 5*	16,66 $\pm$ 7
Контроль	50,72 $\pm$ 8	127,27 $\pm$ 14*	19,8 $\pm$ 6

\*статистически значимые различия в показателях

признакам использовали U-критерий Манна-Уитни и критерий Вилкоксона. Различия показателей в группах считали статистически значимыми при  $P < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

**Церулеиновая модель ОП.** В результате однократного введения церулеина в дозировке 20 или 40 мкг/кг у крыс развивался интерстициальный отек паренхимы поджелудочной железы. При этом с увеличением дозировки препарат не усиливал степень выраженности воспаления, очаги некроза не выявляли.

При анализе биохимических показателей у крыс, получавших церулеин в дозе 20 и 40 мкг/кг, обращало на себя внимание практически двукратное превышение уровня амилазы сыворотки крови  $816,4 \pm 168$ . Показатели трансаминаз (АЛТ, АСТ) находились в пределах нормальных значений.

Введение церулеина не сопровождалось статистически значимым увеличением уровня провоспалительных цитокинов (табл. 1).

Учитывая, что употребление алкоголя является одним из ведущих этиологических факторов, было предпринято исследование по моделированию ОП путем длительного выпаивания животным 10% раствора этилового спирта вместо питьевой воды.

### Этанол-индуцированный ОП.

При выпаивании животным 10% раствора этилового спирта вместо питьевой воды наблюдали гистологическую картину острого отека панкреатита.

При анализе биохимических показателей у крыс, получавших 2,5 мес. алкоголь (таблица 2), отмечали значительное увеличение уровня амилазы сыворотки крови. Показатели трансаминаз (АЛТ, АСТ) находились в пределах нормальных значений.

Использование только алкоголя не сопровождалось увеличением секреции цитокинов (табл. 3). Повышение уровня ИЛ6 было отмечено лишь при комбинации алкоголя и церулеина.

Таким образом, при выпаивании крысам 10%-ра этилового спирта наблюдалась гистологическая



Рис. 1. Затягивание лигатуры на игле, проведенной рядом с общим желчным протоком.

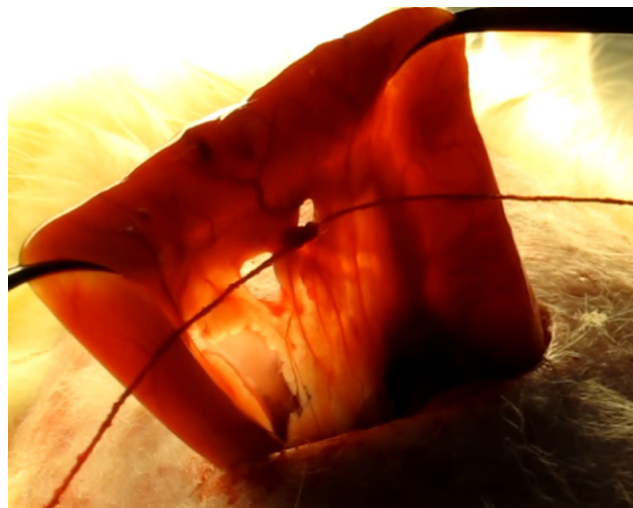


Рис. 2. Вид общего желчного протока после затягивания лигатуры.

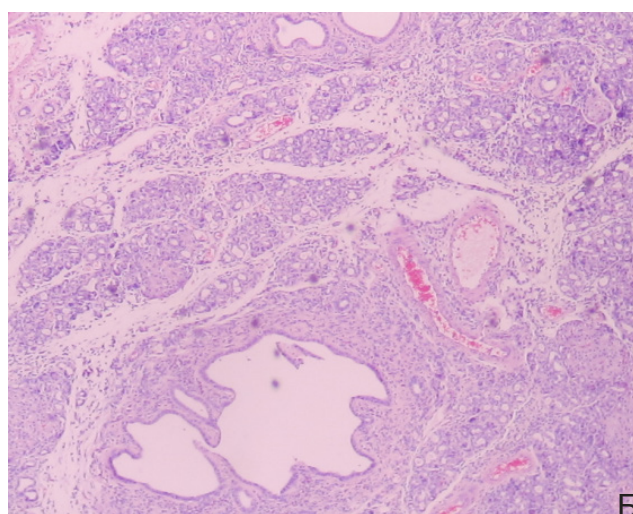
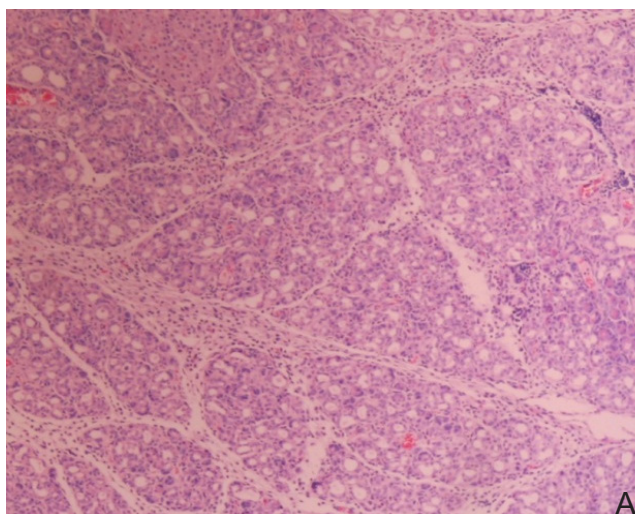


Рис. 3. Микрофотография участков поджелудочной железы крыс CD (частичный механический стеноз общего желчного протока + церулеин). А - Тотальный некроз всей железы. Массированная инфильтрация соединительной ткани лейкоцитами (x 100); Б - Тотальный некроз всей железы. Массированная инфильтрация лейкоцитами (x 400).



картина острого отечного панкреатита, не сопровождаемая повышением трансаминаз и провоспалительных цитокинов. Это указывало на невысокую интенсивность реакции воспаления и, тем более, не позволяло нам говорить о ее системном характере. Поэтому данная модель, несмотря на наличие небольших очагов некроза, не подходила для моделирования ОНП у крыс.

Учитывая вышесказанное, было принято решение попытаться создать модель ОНП оперативным путем посредством частичной обтурации общего желчного протока.

Существующая модель ОНП у крыс, основанная на полной перевязке общего желчного протока ниже впадения в него панкреатического протока, сопровождается развитием механической желтухи, что затрудняет интерпретацию полученных результатов. В связи с этим, в нашей модели рефлюкс желчи в панкреатический проток возникал, но пассаж желчи сохранялся.

#### *Методика создания собственной механической модели ПН*

Крысу наркотизировали внутримышечной инъекцией смеси 5% кетамина и 2% ксилазина, фиксировали в спинном положении. Лапаротомию проводили в области правого подреберья. Осторожно извлекали двенадцатиперстную кишку с прилегающей соединительной тканью, на просвет находили общий желчный проток и накладывали на него лигатуру непосредственно вблизи стенки двенадцатиперстной кишки. Степень затягивания узла лигатуры контролировали при помощи инъекционных игл различного диаметра (рисунок 1). Таким образом, достигался неполный механический стеноз общего желчного протока (рисунок 2), что приводило к поступлению желчи в панкреатический проток и, как следствие, развитию ОНП. При этом пассаж желчи сохранялся. Части крыс через 3 дня после частичной окклюзии общего желчного протока однократно внутрибрюшинно вводился церулеин в дозе 40 мкг/кг.

Через трое суток от момента операции выжившие животные подвергались эвтаназии с последующим гистологическим исследованием поджелудочной железы.

При анализе данных патоморфологии животных, перенесших частичную перевязку общего желчного протока видно, что в отличие от предыдущих моделей (церулеин, алкоголь) в поджелудочной железе преобладали некротические процессы (рисунок 3). Имелись признаки выраженного воспаления в ткани

поджелудочной железы - отек, инфильтрация макрофагами и лейкоцитами. Три крысы погибли. На аутопсии было выяснено, что причиной смерти у всех животных явился тотальный некроз поджелудочной железы. К сожалению, у погибших животных забор крови на биохимическое исследование и определение концентрации цитокинов произвести не удалось.

В изучаемой группе животных все биохимические показатели были выше нормальных значений. При этом статистически значимых различий с группой, где после операции церулеин не вводился, в уровнях  $\alpha$ -амилазы ( $p=0,827$ ), АЛТ ( $p=0,512$ ), АСТ ( $p=0,275$ ) нет.

При анализе секреции цитокинов обнаружили, что механическая модель, дополненная введением церулеина, характеризовалась статистически значимым увеличением секреции цитокинов по сравнению с предыдущими моделями (табл. 4).

При анализе концентрации ИЛ10 (таблица 4) у животных, перенесших операцию с введением церулеина, оказалось что уровень данного цитокина статистически значимо выше ( $p=0,0495$ ), чем у интактных животных и не отличается ( $p=0,512$ ) от уровня оперированных крыс, которым церулеин не вводили. Что касается ФНО $\alpha$ , то его уровень также статистически значимо выше ( $p=0,0495$ ) контрольных значений, и так же не отличается от показателей, которые были у животных после операции без введения церулеина.

Таким образом, в исследуемой группе наблюдается значительное повышение уровня всех цитокинов, но принципиальным являлось то, что концентрация ИЛ6 в данной группе статистически выше ( $p=0,0495$ ), чем в группе оперированных без введения церулеина, то есть, введение церулеина усиливает не только степень деструкции поджелудочной железы, но и увеличивает секрецию цитокинов, таким образом, утяжеляет течение заболевания.

#### **Выводы**

1. В результате проведенной серии экспериментальных исследований было установлено, что однократное внутрибрюшинное введение церулеина в дозах 20 и 40 мкг/кг самцам крыс CD SPF категории в возрасте 12-14 недель вызывает острый отечный панкреатит. Церулеиновая модель характеризовалась статистически значимым увеличением секреции ИЛ10, повышения секреции ИЛ6, ФНО $\alpha$  не наблюдали.

2. Выпаивание 10% раствора этилового спирта на протяжении 2,5 месяца у всех крыс приводило к развитию острого отечного панкреатита. Патоморфологи-

Таблица 4

#### *Сравнительные показатели уровня секреции цитокинов у крыс с ПН*

Группа	ИЛ10	ИЛ6	ФНО $\alpha$
Операция	67,28 $\pm$ 5*	320,28 $\pm$ 11*	32,37 $\pm$ 14*
Операция + церулеин (через 3 дня после операции)	72,39 $\pm$ 11*	457,19 $\pm$ 25*	34,62 $\pm$ 9*
Контроль	50,72 $\pm$ 8*	127,27 $\pm$ 14*	19,8 $\pm$ 6*

\*статистически значимые различия отдельных цитокинов по отношению к контролю

ческий анализ поджелудочной железы этих животных выявил интерстициальный отек различной степени, инфильтрацию долек макрофагами и некроз части паренхимы, который характеризовался (в зависимости от степени поражения) потерей гранул зимогена, деградацией части ацинусов, образованием на месте разрушенных ацинусов округлых пустот. После однократной внутрибрюшинной инъекции раствора церулеина в дозе 40 мкг/кг выраженность некротических явлений усиливалась. Алкогольная модель характеризовалась повышением уровня  $\alpha$ -амилазы и значимым увеличением секреции ИЛ-10 и ИЛ-6.

### Список литературы

1. Nevalainen T.J., Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1975; 10(5): 521–527.
2. Lombardi B. Influence of dietary factors on the pancreatotoxicity of ethionine. *Am. J. Pathol.*, 1976; 84(3): 633–648.
3. Sheen-Chen S.M., Eng H.L., Hung K.S. Altered serum transforming growth factor-beta1 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in obstructive jaundice. *World J. Surg.*, 2004; 28(10): 967–970.
4. Lampel M., Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 1977; 373(2): 97–117.
5. Armstrong C.P., Taylor T.V., Torrance H.B. Effects of bile, infection and pressure on pancreatic duct integrity. *Br. J. Surg.*, 1985; 72(10): 792–795.
6. Schmidt J., Rattner D.W., Lewandrowski K., Compton C.C., Mandavilli U., Knoefel W.T. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann. Surg.*, 1992; 215(1): 44–56.

Поступила 30.09.2013

### Информация об авторах

1. Горский Виктор Александрович – д.м.н., проф. кафедры экспериментальной и клинической хирургии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова;
2. Агапов Михаил Андреевич – д.м.н., доцент кафедры экспериментальной и клинической хирургии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова. E-mail: getinfo911@mail.ru;
3. Леоненко Игорь Валентинович – к.м.н., доцент кафедры общей патологии Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова;
4. Баттаев Алан Ильясович – врач-хирург Главного военного клинического госпиталя ФСБ России.

3. Неполный механический стеноз общего желчного протока привел к развитию ПН различной степени выраженности. Однократная внутрибрюшинная инъекция церулеина в дозе 40 мкг/кг оперированным животным увеличивала степень деструкции ткани поджелудочной железы. Данная модель характеризовалась статистически значимым усилением секреции про- и противовоспалительных цитокинов. Таким образом, механическая модель панкреонекроза у крыс может быть рекомендована для исследований новых стратегий лечения и, в частности, оценки эффективности препаратов, обладающих цитокин-ингибирующей активностью.

### References

1. Nevalainen T.J., Seppa A. Acute pancreatitis caused by closed duodenal loop in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1975; 10(5): 521–527.
2. Lombardi B. Influence of dietary factors on the pancreatotoxicity of ethionine. *Am. J. Pathol.*, 1976; 84(3): 633–648.
3. Sheen-Chen S.M., Eng H.L., Hung K.S. Altered serum transforming growth factor-beta1 and monocyte chemoattractant protein-1 levels in obstructive jaundice. *World J. Surg.*, 2004; 28(10): 967–970.
4. Lampel M., Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.*, 1977; 373(2): 97–117.
5. Armstrong C.P., Taylor T.V., Torrance H.B. Effects of bile, infection and pressure on pancreatic duct integrity. *Br. J. Surg.*, 1985; 72(10): 792–795.
6. Schmidt J., Rattner D.W., Lewandrowski K., Compton C.C., Mandavilli U., Knoefel W.T. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann. Surg.*, 1992; 215(1): 44–56.

Received 30.09.2013

### Information about the Authors

1. Gorskii V. - MD, Prof. of Department of Experimental and Clinical Surgery of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University;
2. Agapov M. - MD, associate prof. of Department of Experimental and Clinical Surgery of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University. E-mail: getinfo911@mail.ru;
3. Leonenko I. - Ph.D., associate prof. of Department of general pathology of N.I. Pirogov Russian National Research Medical University;
4. Battayev A. – surgeon in Main Military Clinical Hospital of the Russian FSS.