

УДК 616.37-002:615.3:616-091.8

О.О.Крилова

РОЛЬ NO В РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ

ДУ «Інститут гастроентерології НАМН України»

Резюме. В експерименті на лабораторних щурах досліджено зміни підшлункової залози щурів після уведення блокатора NO-синтази N^G-нітро-L-аргініну. Доведено, що в результаті блокади NO-синтази у тканині підшлункової залози формуються морфологічні зміни,

характерні для запалення з хронізацією патологічного процесу.

Ключові слова: NO-синтази, хронічний панкреатит.

Вступ. Постійна увага до проблеми хронічного панкреатиту (ХП) зумовлена тим, що це прогресуюче захворювання підшлункової залози (ПЗ), яке характеризується появою під час загострення гострого запального процесу, поступовим заміщенням паренхіми органа сполучною тканиною, розвитком різного ступеня вираженої функціональної недостатності, що залишаються і прогресують навіть після припинення дії етіотропних факторів [1, 3, 10].

На початковій стадії патологічний процес може бути обмеженим і не поширюватися на всю залозу, на пізній – дифузним, з ураженням всього органа. ХП у фазі загострення найчастіше проявляється некрозом ацинарних клітин ПЗ у результаті їхнього самоперетравлення. У фазі згасаючого загострення і ремісії він характеризується розвитком на місці клітин, які загинули, сполучної тканини, а при прогресуванні процесу – формуванням склерозу органа. Проте при вивченні великих фрагментів оперативно видаленої залози у фазі загострення ХП у різних її відділах може бути виявлена різна морфологічна картина: на одних ділянках переважають вогнища некрозу із запальною інфільтрацією, в інших – залоза представлена вогнищами фіброзної тканини зі збільшеними панкреатичними острівцями Лангерганса. Із прогресуванням хвороби вираженість склеротичних змін збільшується. Склероз залози з кальцинозом або без нього є фіналом ХП будь-якої етіології.

В останні роки значно розширились уявлення про роль оксиду азоту (NO) і його метаболітів у різних фізіологічних і патологічних процесах, у патогенезі різних захворювань, шлунково-кишкового тракту [8, 9, 10, 11].

Доведено подвійну роль цього універсального ендогенного регулятора, здатного надавати як пошкоджуючі, так і захисні дії на слизову оболонку, які багато в чому залежать від концентрацій цієї сполуки. NO регулює моторику травного тракту, шлункову секрецію, мікроциркуляцію, стимулює секрецію слизу і у фізіологічних умовах надає цитопротективну дію [6, 7]. Вважають, що на ранніх етапах розвитку запалення в слизових оболонках відбувається підвищення продукції NO, що є компенсаторним механізмом для забезпечення кровопостачання та підтримки високого рівня метаболізму в тканинах за рахунок прямої вазо-

дилатації. При прогресі захворювання відбувається виснаження джерел синтезу NO (L-аргінін) і зниження його виділення, що призводить до підвищення агрегаційної здатності тромбоцитів, зниження фібринолітичної активності крові, порушення регуляції судинного тонуусу і розвитку мікротромбозів судинної системи. Негативна дія вмісту NO починає проявлятися, коли його сумарна концентрація або різко знижується, або зростає, що призводить до функціонального та структурного пошкодження органа [2].

Тому участь NO в розвитку патологічного процесу не викликає сумніву. Відома участь NO-синтази (NOS) в розвитку експериментального панкреатиту [4, 5]. Вона зумовлена дією високих доз L-аргініну на підшлункову залозу. Однак логічно припустити, що неспецифічне інгібування всіх ізоформ NOS спричинить ураження ПЗ, яке виникає внаслідок інгібування iNOS, eNOS і nNOS, тобто пов'язане з порушенням перфузії, нервової регуляції та антимікробного захисту ПЗ. У зв'язку з цим правомірним є створення нової моделі експериментального панкреатиту, що ґрунтується на інгібуванні неспецифічної NOS.

Мета дослідження. Вивчити вплив блокатора NO-синтази на підшлункову залозу щурів.

Матеріал і методи. Рішення поставленої задачі виконували шляхом експериментальних досліджень на 30 білих щурах-самцях лінії Вістар, масою 220-280 г, віком 20-22 тижні. За 16-20 годин до експерименту тварин піддавали харчовій депривації при вільному доступі до води. Всього проведено дві серії експериментів. Блокування NO-синтази здійснювалося за допомогою внутрішньочеревної ін'єкції N^G-нітро-L-аргініну (L-NNA, виробництва Sigma-Aldrich) (40 мг/кг маси тіла). У 1-й серії досліджень (n=10) тваринам вводили неспецифічний інгібітор NOS L-NNA протягом 6 та протягом 12 днів. У 2-й контрольній серії щурам внутрішньочеревно вводили стерильний фізіологічний розчин.

Екскреторну функцію ПЗ оцінювали за активністю амілази, ліпази та трипсину крові за відомими методами.

Після закінчення дослідження тварин декапітували після попереднього уведення етаміналу натрію (85 мг/кг) відповідно до "Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин", підшлункову залозу резекували та відра-

зу фіксували в середовищі Боуена і готували мікроскопічні зрізи тканини із забарвленням гематоксилін-еозином та за Маллорі-Слінченко.

Для уточнення ступеня макроморфологічних змін підшлункової залози, її видаляли, промивали фізіологічним розчином та фіксували в розчині Боуена.

Статистична обробка результатів досліджень здійснювалася методами варіаційної статистики, реалізованими стандартним пакетом прикладних програм SPSS for Windows 7.0. При цьому для показника визначали вибіркове середнє значення (M) та похибку середнього (m). Досліджувані співвідношення вважали достовірними при $p < 0,05$.

Дана робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи "Вивчити механізми розвитку ускладнень хронічного панкреатиту, розробити методи діагностики хірургічного лікування з використанням малоінвазивних технологій" (шифр теми ВН.25.01.001.08, номер держреєстрації 0107U012136).

Результати дослідження та їх обговорення. Моделювання недостатності NOS (на 6-й день) не супроводжувалося погіршенням загального стану тварин, тоді як у подальшому, на 12-й день спостерігалися зміни – поведінка щурів в умовах звичайного середовища перебування (у клітці)

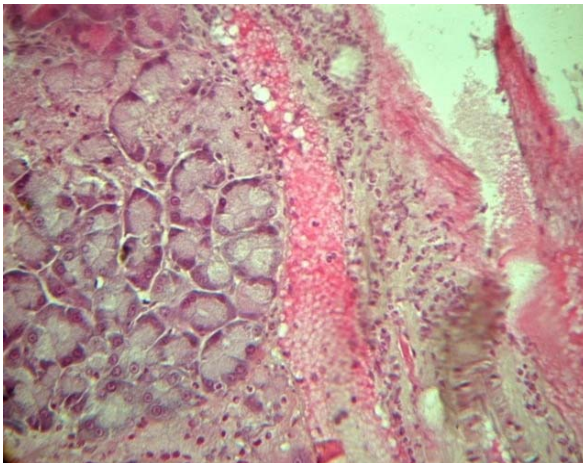


Рис. 1. Стаз у дрібних судинах, набряк стромы підшлункової залози, міжчасточкова нейтрофільна інфільтрація. Забарвлення гематоксилін-еозином x400

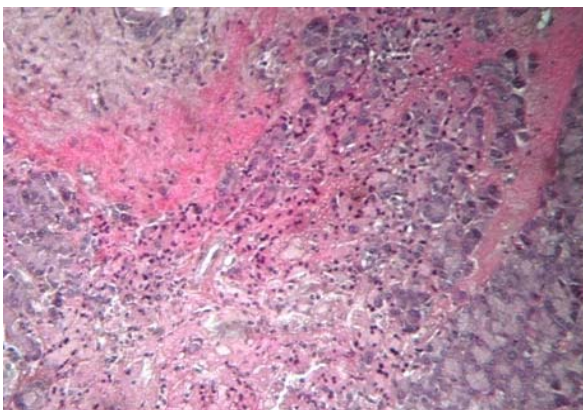


Рис. 3. Набряк підшлункової залози, деструкція ацинарної тканини, в лівому куті інтактна ендокринна тканина. Забарвлення гематоксилін-еозином x200

ставала більш пасивною стосовно будь-якого пересування; погіршувався апетит, а також відмічалася незначне зменшення (на 5,0 –9,0 грамів) маси тіла кожної тварини.

Зміна загального стану тварин супроводжувалася морфологічними змінами підшлункової залози.

На 6-у добу в ПЗ усіх щурів спостерігалися різних розмірів вогнища ушкодження ацинарної тканини: мембрани ацинарних клітин місцями не контурувались, відзначався виражений перицелюлярний набряк, помірно виражена дифузна інфільтрація стромы лімфоцитами і переважно сегментоядерними нейтрофілами (рис.1), гіперхромні ядра ацинарних клітин, місцями дещо зменшені в розмірах.

У більшості щурів, яким вводили інгібітор NO-синтаз, на 12-у добу недостатності NO-синтаз при морфологічному дослідженні ПЗ виявлено ознаки загострення панкреатиту з різним ступенем ушкодження паренхіми. Характерною була наявність повнокрів'я, стазу в дрібних судинах, вираженого набряку навколо часточок ПЗ, що свідчило про порушення кровообігу в залозі з наступним руйнуванням ацинарної тканини (рис. 2, 3).

Примітно, що біля великих проток також виявлялася помірно виражена дифузна лімфоцитозитарна інфільтрація з наявністю сегментояде-

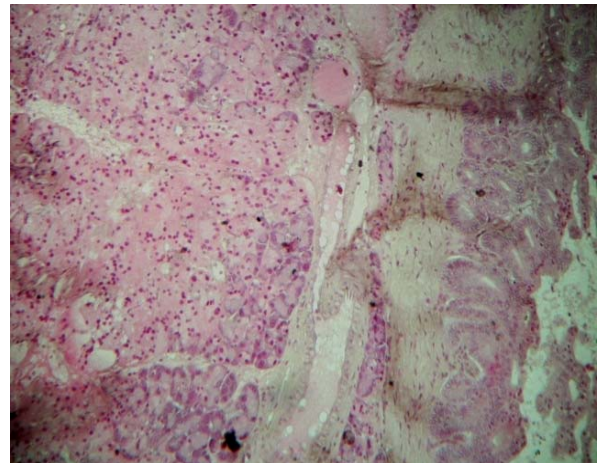


Рис. 2. Деструкція ацинарної тканини з її інфільтрацією лімфоцитами та плазмоцитами. Забарвлення гематоксилін-еозином x200

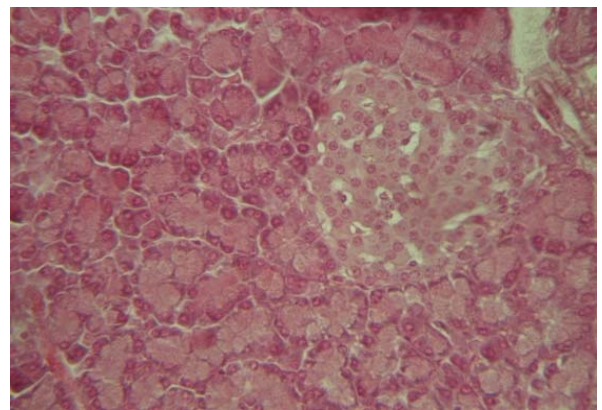


Рис. 4. Нормальна структура підшлункової залози. У правому куті острівць Лангерганса X400

Таблиця

**Ферментативна активність сироватки крові щурів
при тривалому уведенні блокатора NO-синтаз**

Показник	Контроль (n=8)	6-а доба (n=8)	12-а доба (n=6)
	M±m	M±m	M±m
а-амілаза, г/ч×мл	93,32±19,6	132,66±7,4	142,2±14,3
Ліпаза, мл нМоль/сл	2,01±0,02	2,38±0,1*	2,40±0,1*
Трипсин, мкМ/мл/хв	3,50±1,42	9,02±2,6	2,66±0,9*

Примітка. * – $p < 0,01$ - вірогідність змін між показниками груп щурів порівняно з групою контролю

рних нейтрофілів і поодиноких плазмочитів. Місцями серед пошкодженої ацинарної тканини траплялись 4-5 незмінених ацинарних клітин, які вціліли. При цьому запальна реакція в основному проявлялась перидуктулярно, особливо поблизу великих вивідних проток. Встановлено, що острівці Лангерганса не постраждали – серед патологічно зміненої тканини виявлялися звичайної форми і розмірів інтактні острівці ендокринної тканини. У групі контрольних тварин спостерігалася гістологічно незмінена ПЗ (рис. 4).

Морфологічні зміни супроводжувалися змінами зовнішньосекреторної функції ПЗ. На 6-у добу рівень ферментативної активності ПЗ зростає: достовірно збільшився рівень α -амілази та ліпази в 1,4 раза, активність трипсину – майже у 9 разів (таблиця).

У подальшому (на 12-у добу моделювання панкреатиту) активність амілази та ліпази у крові щурів неістотно зросла стосовно 6-ї доби, тоді як активність трипсину, навпаки, достовірно знизилася в 1,4 раза. Цей факт можна розглядати як захисний адаптаційно-компенсаторний механізм, спрямований проти пошкодження ПЗ.

Отже, неспецифічне пригнічення всіх ізоформ NOS спричиняє ураження ПЗ, яке виникає внаслідок пригнічення iNOS, eNOS і nNOS, тобто пов'язане на ранніх етапах як із порушенням перфузії, так і з нітроергічною ланкою регуляції, а в подальшому і антимікробним захистом ПЗ. У зв'язку з цим правомірним є створення нової моделі експериментального панкреатиту, що ґрунтується на пригніченні неспецифічної NOS.

Раніше повідомлялося, що NO є головним медіатором, який визначає розслаблення сфінктера Одді, анального сфінктера, тонкої та товстої кишок, стравоходу і шлунка [8, 9]. Виходячи з того, що NO впливає не тільки на кровообіг судин ПЗ, але і регулює сфінктер Одді, нами зроблено припущення, що тривале блокування нітроергічної ланки регуляції (уведенням неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну) створює ситуацію, що наближається до клінічних умов, а саме спазм сфінктера Одді, порушення мікроциркуляції, що веде до пошкодження паренхіми ПЗ, підсилення зовнішньосекреторної активності ПЗ. Це тільки один із можливих патоге-

нетичних механізмів розвитку патологічного процесу, який може відбуватися в ПЗ, особливо на початкових, тобто передпатологічних станах розвитку панкреатиту. Запропонована нами модель з використанням неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну як домінуючого фактора розвитку первинного гострого панкреатиту, а в подальшому прогресування цього процесу – перехід у хронічний панкреатит.

Отже, створено нову модель панкреатиту, яка індукована тривалим блокуванням нітроергічної ланки регуляції, на основі застосування неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну. Запропонована модель хронічного панкреатиту є легковідтворюваною та непрацевозатратна. Модель ХП, створена на основі застосування неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну, відноситься до моделей із порушенням кровообігу ПЗ, що призводить до пошкодження паренхіми ПЗ.

Тривале блокуванням нітроергічної ланки регуляції неспецифічним блокатором NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну супроводжується активацією зовнішньосекреторної функції ПЗ.

Висновок

За умов використання в щурів неспецифічного блокатора NO-синтаз N^G -нітро-L-аргініну в тканині підшлункової залози щурів формуються морфологічні зміни, які характерні для запалення з хронізацією патологічного процесу та відзначається активація зовнішньосекреторної функції підшлункової залози.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення ролі NO в нормі та патології підшлункової залози.

Література

1. Губергриц Н.Б. Клиническая панкреатология / Н.Б.Губергриц, Т.Н.Христинич. – Донецк: ООО «Лебедь», 2000. – 416 с.
2. Лазебник Л.Б. Роль оксида азота (NO) в патогенезе некоторых заболеваний органов пищеварения / Л.Б.Лазебник, В.Н.Дроздов, Е.Н.Барышников // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. – 2005. – № 2. – С. 4-11.

3. Маев И.В. Теории и гипотезы патогенеза хронического панкреатита / И.В.Маев, Ю.А.Кучерявый // Клин. персп. гастроэнтерол., гепатол. – 2005. – № 2. – С. 11-17.
4. Bohus E. Temporal metabolic modeling of L-arginine induced exocrine pancreatitis / E.Bohus, M.Coen, H.C. Keun // J. Proteom Res. – 2008. – № 7 (10). – P. 4435-4445.
5. Fredstrom S.B. Pancreatitis induced in rats by repetitive administration of L-arginine / S.B.Fredstrom, J.Jessurun, D.D.Gallaher // Pancreas. – 2009. – Vol. 38, № 3. – P. 344-345.
6. Laurin P. Increase in nitric oxide urinary products during gluten challenge in children with celiac disease / P.Laurin, K.Falth-Magnusson, T.Sundqvist // Scand. J. Gastroenterol. – 2003. – Vol. 38, № 1. – P. 55-60.
7. Iimuro Y. Detection of alpha-hydroxyethyl free radical adducts in the pancreas after chronic exposure to alcohol in the rat / Y.Iimuro, B.U.Bradford, W.Gao // Mol. Pharmacol. – 1996. – Vol. 50, № 3. – P. 656-661.
8. Shan V. Nitric oxide in gastrointestinal health and disease / V.Shan, G.Lyford, G.Gores // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 126. – P. 903-913.
9. Tomita R. Role of nitric oxide in the colon of patients with slow-transit constipation / R.Tomita, S.Fujisaki, T.Ikeda // Dis.Colon. Rectum. – 2002. – Vol. 45. – P. 593-600.
10. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy / H.Witt, M.V.Apte, V.Keim [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – Vol. 132, № 4. – P. 1557-1573.
11. Zafra C. Silvastatin enhances hepatic nitric oxide production and decreases the hepatic vascular tone in patients with cirrhosis / C.Zafra, J.G.Abraldes, J.Turnes // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 126. – P. 749-755.

РОЛЬ NO В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА

Е.А.Крылова

Резюме. В эксперименте на лабораторных крысах исследованы изменения поджелудочной железы крыс после введения блокатора NO-синтаз N^G-нитро-L-аргинина. Доказано, что в результате блокады NO-синтаз в ткани поджелудочной железы формируются морфологические изменения, характерные для воспаления с хронизацией патологического процесса.

Ключевые слова: NO-синтазы, хронический панкреатит.

THE ROLE OF NO IN THE DEVELOPMENT OF CHRONIC PANCREATITIS

O.O.Krylova

Abstract. Changes of the rat pancreas have been studied in an experiment on laboratory mice upon introducing the NO-synthase – N^G-nitro-L-arginine blocker. It has been corroborated that as a result of a blockade of NO-synthases morphological changes typical of an inflammation with chronicity of the pathological process are formed in the pancreatic tissue.

Key words: NO-synthases, chronic pancreatitis

SI "The Institute of Gastroenterology of Ukraine's NAMS" (Dnipropetrovs'k)

Рецензент – проф. О.І.Федів

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 2 (58). – P. 218-221

Надійшла до редакції 12.04.2011 року