

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА У КРЫС ВВЕДЕНИЕМ ТРИПСИНА И ЗМЕИНОГО ЯДА

Владимир Георгиевич ВИСКУНОВ^{1,2}, Александр Борисович ПУПЫШЕВ¹, Светлана Ивановна ПРОЦЕНКО¹, Александр Петрович НАДЕЕВ¹, Марина Александровна СИНИЦЫНА², Александр Михайлович ФЕЩЕНКО³, Заза Юзаевич ЧУБЕНИДЗЕ³

¹ ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Росздрава
630091, Новосибирск, Красный проспект, 52

² ГУ НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН
630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2

³ Городская клиническая больница № 25
630075, Новосибирск, ул. А. Невского, 1а

Внутрипанкреатические инъекции крысам трипсина (50 мг/кг массы тела) или змеиного яда гадюки обыкновенной (*Vipera berus* L.) (1 мг/кг) вызывают сходные картины острого геморрагического панкреатита, близкую динамику поражения других органов брюшной полости и в обеих сериях смертность 70–80 % животных (24 ч). Вероятным механизмом развития острого панкреатита может быть наличие у трипсина и змеиного яда геморрагической активности, возможность активации экзогенным трипсином панкреатической фосфолипазы А2 и в обоих случаях предполагаемая мембранолитическая атака ацинарных клеток фосфолипазой А2.

Ключевые слова: острый геморрагический панкреатит, трипсин, змеиный яд, крысы Вистар.

Острый панкреатит является многофакторной патологией, формирующейся с участием ранней активации секреторных ферментов (включая трипсин, амилазу, фосфолипазу А2), ишемизации органа, лабильности лизосом, стимуляции образования свободных радикалов, локальным повышением уровня провоспалительных цитокинов и т.д. [1, 2]. Экспериментальное моделирование панкреатита на животных достигается разнообразными методами: окклюзией панкреодуоденального протока, внутривенным введением высоких доз церулеина (аналога холецистокинина), фосфолипазы (ФЛ), локальным введением таурохолат натрия, трипсина и другими воздействиями [3].

«Трипсиновая» модель панкреатита достаточно хорошо отработана и воспроизводима. Сам фермент является сериновой протеиназой со свойствами эстеропротеазы. При локальном введении в поджелудочную железу (ПЖ) он вызывает геморрагический панкреонекроз [4]. Кроме того, он способен активировать реакции, являющиеся пусковыми в протеолитических каскадных системах крови [5]. В целом введение трипсина обуславливает развитие необратимого гемодинамического шока, геморрагиче-

ский панкреонекроз, формирование синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (ДВС-синдром) и полиорганной недостаточности с возможным летальным исходом [6].

Подобные процессы, в частности, протеолитическая атака трипсиноподобными протеиназами, геморрагическое повреждение, ДВС-синдром вызываются и змеиным ядом. В змеином яде содержатся цитотоксины, ФЛ, геморрагины и др. патогенетически важные компоненты [7]. В нем обнаружены группы белков, обладающих свертывающей (факторы свертывания крови II, V, X), антисвертывающей (активаторы протеина С, ингибиторы образования протромбинового комплекса, фибриногеназы) и геморрагической (тромбиноподобные ферменты, факторы агрегации тромбоцитов и повреждения сосудистой стенки) активностями [8]. Высока также активность ФЛ А2, способной вызывать повреждение мембран, в том числе и в клетках ПЖ [2].

Сходные биологические эффекты трипсина и змеиного яда способствовали созданию моделей поражения висцеральных органов трипсином и змеиным ядом и проведению сравнительной оценки таких поражений с осо-

Вискунов В.Г. — д.м.н., профессор, главн.н.с. лаборатории патофизиологии, общей патологии и патоморфологии НИИРППМ, профессор кафедры госпитальной хирургии Новосибирского ГМУ, e-mail: ariyushev@mail.ru

Пупышев А.Б. — канд.б.н., старш.н.с., e-mail: ariyushev@mail.ru

Проценко С.И. — канд.м.н., ассистент кафедры поликлинической хирургии

Надеев А.П. — д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической анатомии

Синицына М.А. — н.с. лаборатории патофизиологии, общей патологии и патоморфологии

Фещенко А.М. — канд.м.н., зам. главного врача

Чубенидзе З.Ю. — хирург-ординатор

бым вниманием к состоянию ПЖ и гемодинамическим нарушениям.

Возможность экспериментального лечения острого панкреатита с помощью антисыворотки к змеиному яду описана достаточно давно, однако не получила дальнейшего развития. Наши исследования показывают, что антисыворотка к змеиному яду обладает терапевтической эффективностью, выходящей за рамки ее прямого назначения при укусах змей [9]. Принимая во внимание спектр действия антисыворотки, можно ожидать, что она способна ингибировать белковые геморрагические факторы змеиного яда, включая его трипсиноподобную активность, металлопротеиназы [10] и, таким образом, препятствовать системному действию змеиного яда. Кроме того, показано, что ингибирование ФЛ А2 резко снижает смертность от острого панкреатита [11], а высокий уровень фермента в змеином яде увеличивает летальный эффект. Вероятно, в антисыворотке имеется достаточно высокое содержание антител к протеиназам, геморрагинам, ФЛ А2 и другим патогенетически активным факторам, что делает перспективным ее использование в терапии панкреатита и других патологий.

Цель исследования — разработка экспериментальной модели острого панкреатита и других поражений органной брюшной полости патологий для дальнейшего сравнительного анализа эффективности лекарственных средств.

Материал и методы исследования

В работе использованы крысы линии Вистар массой 200–250 г. Животным под эфирным наркозом вскрывали брюшную полость и в ПЖ по ходу общего панкреобилиарного протока со стороны его вхождения в двенадцатиперстную кишку вводили раствор трипсина (ООО «Самсон-Мед», Россия) в концентрации 10 мг/мл в дозе 50 мг/кг массы тела. Аналогичным образом вводили раствор яда гадюки обыкновенной (*Vipera berus L.*) (ООО «Сибирский серпентарий», Россия) в концентрации 0,1 мг/мл в дозе 1 мг/кг массы тела. В каждую группу входило по 21 животному.

За морфологическими изменениями органов брюшной полости следили в течение 3,5 ч, в ряде случаев забирали выпот для анализа на амилазную активность. Затем брюшную полость зашивали с применением асептики, животных возвращали в клетки. На следующий день оценивали смертность; у выживших

крыс забирали материал на морфологическое исследование. Образцы органов фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование проводили в универсальном микроскопе Leica DM 4000B (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 320 (Германия) и компьютерной программы Leica QWin V3.0.

Результаты исследования

При использовании предложенных нами способов моделирования острого панкреатита у 100% животных при макроскопическом и микроскопическом исследовании выявлялись признаки данного заболевания. Летальность при введении трипсина составила 71,4% (15 летальных исходов), при введении змеиного яда — 80,9% (17 случаев гибели). Внешние эффекты действия трипсина и змеиного яда на ПЖ, прилежащие органы брюшной полости были очень сходными (табл.).

В обоих случаях в месте инъекции развивался серозный отек ПЖ, далее через 2–3 мин появлялась геморрагическая имбиция ПЖ с постепенным распространением на весь орган. Одновременно с появлением геморрагий в ПЖ на фоне диффузного отека стенки двенадцатиперстной кишки возникали и участки очаговой геморрагической имбиции ее стенки. Позднее развивалась гиперемия, возникали участки точечных кровоизлияний в области брыжейки и стенки толстой кишки. Через 12–15 мин в брюшной полости развивался серозный отек, прогрессивно нарастал геморрагический выпот с амилазной активностью до 1400–2000 ед. Видимые изменения печени проявлялись через 20–30 мин после инъекции токсинов и заключались в изменении ее цвета от вишневого до темно-фиолетового, иногда с наличием точечных желтоватых вкраплений по поверхности печени. В конце 2-го — начале 3-го часа отмечали многочисленные локальные изменения тонкой кишки на всем протяжении, а ПЖ приобретала черную окраску.

При последующем наблюдении с 2,5 до 3,5 ч нарастали некробиотические изменения в кишечнике, печени; в большинстве случаев наступала гибель животного. Гистологическое исследование выявило сходные изменения ПЖ при ее повреждении трипсином (рис. а)

Таблица

Поражения внутренних органов под действием трипсина и змеиного яда

Вещество	Время наблюдения	Поджелудочная железа	Двенадцатиперстная кишка	Толстая кишка	Печень	Тонкая кишка
Трипсин (50 мг/кг)	1–2 мин	Формирование бесцветного «ползучего» инфильтрата (до 0,8 см в диаметре)	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	2–3 мин	Равномерный серозный отек в области инъекции, гиперемия, точечные кровоизлияния	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	4–6 мин	На фоне легкой гиперемии геморрагическое пропитывание в виде прожилок звездчатого характера	Гиперемия и отек привратника на участке длиной 1–2 см, увеличивающиеся в дистальном направлении	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	10–15 мин	Равномерный серозный отек, формирование рыхлой гематомы ярко-красного цвета бархатистого вида размером до 2 см	Появление белесоватого оттенка на фоне увеличивающегося участка гиперемии	Гиперемия, точечные кровоизлияния брыжейки и стенки поперечно-ободочной кишки	Изменение окраски паренхимы от ярко-красной до вишневой с переходом к темно-фиолетовой	Изменения отсутствуют
	30–40 мин	Прогрессивный рост гематомы почти на большую часть поверхности органа, появление черного окрашивания	Увеличивающийся участок гиперемии размером до 2–2,5 см, приобретающий черный оттенок	Постепенное потемнение гиперемизированных участков поперечно-ободочной и слепой кишок	Прогрессирующее потемнение паренхимы печени	Возникновение множественных участков гиперемии, с быстрым потемнением
	60–90 мин	Темно-серое окрашивание органа	Увеличение участка гиперемии и некроза в дистальном направлении	Увеличение количества участков некроза	Отдельные участки приобретают черный цвет	Увеличение количества участков гиперемии с прогрессирующим потемнением
Змеиный яд (1 мг/кг)	1–2 мин	Формирование бесцветного инфильтрата размером 1-1,2 см	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	2–3 мин	Равномерный прогрессирующий отек в этих же пределах	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	4–6 мин	Точечные кровоизлияния с постепенным формированием гематомы размером 1-1,2 см	Тот же эффект, что для трипсина	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
	10–15 мин	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Изменения отсутствуют
	30–40 мин	Увеличение размера гематомы до 2 см, появление черного окрашивания	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина
	60–90 мин	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина	Тот же эффект, что для трипсина

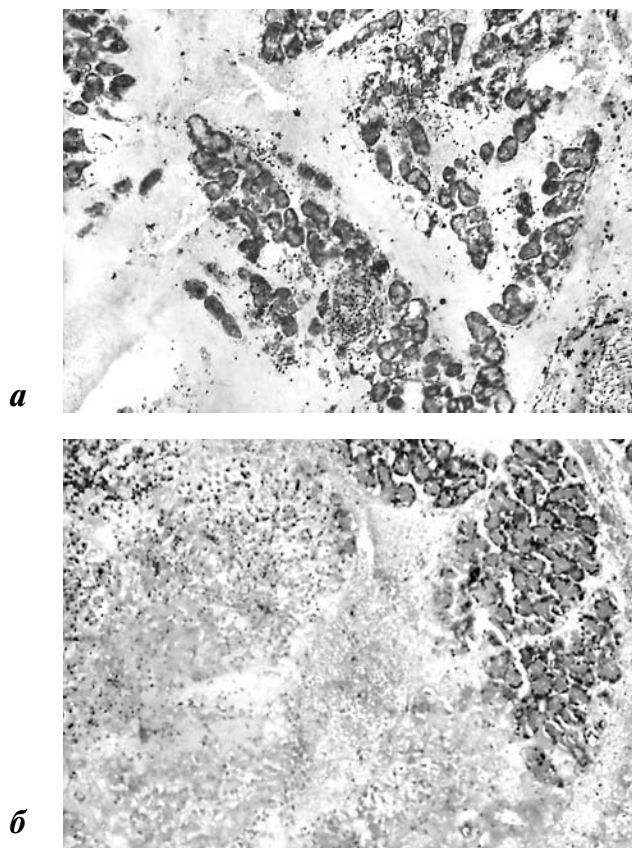


Рис. Морфологические изменения поджелудочной железы крыс через 24 ч после введения трипсина и змеиного яда. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 100.
 а — геморрагический панкреонекроз при введении трипсина;
 б — обширные очаги некроза поджелудочной железы при введении змеиного яда.

и змеиным ядом (**рис. б**): полнокровие, очаги кровоизлияния, отек, обширные некрозы ткани. Во внутренних органах наблюдали морфологические изменения с превалированием внутрисосудистого стаза, тромбоза, отека ткани с дистрофическими изменениями и некрозами клеток, множественными кровоизлияниями.

В целом картины повреждения ПЖ и других висцеральных органов при действии исследованных агентов практически совпадали, поэтому понимание возможных механизмов, обеспечивающих такое сходство, представляет не только теоретический, но и практический интерес. Трипсин как сериновая протеиназа вызывает в крови каскад протеолитических реакций, приводящих к антикоагуляционным и геморрагическим эффектам. В механизмах его повреждающего действия на клетки ПЖ отмечается локальная активация зимогенных ферментов, находящихся в неактивном состоянии, таких как эластаза, химотрипсин, ФЛ [12], и далее

именно активируемые трипсином ферменты оказывают деструктивное действие на ацинарные клетки. Эндогенная ФЛ А2, по-видимому, является центральным ферментом в индукции некроза ацинарных клеток [13].

Среди компонентов змеиного яда (цитотоксины, ФЛ, геморрагины и др.) большое значение имеют гемостатически активные компоненты, включающие 11 видов активности [7]. В змеином яде найдено свыше 150 протеиназ, среди которых можно выделить сериновые тромбиноподобные протеиназы и металлопротеиназы, характеризующиеся антикоагуляционной и фибринолитической активностью, а также способностью вызывать деструкцию сосудистого эндотелия и внеклеточного матрикса, обуславливающей геморрагический эффект [14]. Представляет интерес тот факт, что индукция острого панкреатита хорошо моделируется под действием яда скорпиона, но лишь змеиный яд вызывает геморрагический панкреонекроз, поэтому геморрагический компонент вряд ли может рассматриваться как необходимый в процессе повреждения ПЖ змеиным ядом. Вместе с тем отмечено, что геморрагический компонент сопутствует необратимому течению повреждения ПЖ. В плане формирования панкреатита важнейшей составляющей змеиного яда, по-видимому, является ФЛ А2 в комплексе с цитотоксинами [15]. Фермент повреждает клеточные мембраны, позволяет лизосомным катепсинам атаковать зимогены и активировать патогенетически важные ферменты. Также известно, что чем больше активность ФЛ в змеином яде, тем выше летальность его действия.

Таким образом, нами обнаружено сходство трипсина и змеиного яда в действии на гемостатические свойства крови (геморрагический эффект), в характере и динамике повреждения клеток ПЖ и ряда висцеральных органов. При этом инициирующие механизмы повреждения ПЖ представляются несколько различными. В случае трипсина это, вероятно, протеолитическая атака фермента на клетки ПЖ, связанная с проникновением трипсина в интерстиций и внутрь клеток с последующей активацией зимогенных проэнзимов (включая ФЛ) и индукцией каскада гидролитических реакций [1]. А для змеиного яда это также протеолитическая атака трипсиноподобными ферментами геморрагического действия и, особенно, мембранолитическое действие ФЛ А2 и цитотоксинов с последующей активацией зимогенов [15].

Литература

1. Frossard J.L., Pastor C.M. Experimental acute pancreatitis: new insights into the pathophysiology // Front. Biosci. 2002. V.7. 275-287.
2. Hietaranta A.J., Peuravuori H.J., Nevalainen T.J. Phospholipase A2 in sodium taurocholate-induced experimental hemorrhagic pancreatitis in the rat // J. Surg. Res. 1995. V.59. № 2. 271-278.
3. Sakaguchi Y., Inaba M., Kusafuka K. et al. Establishment of animal models for three types of pancreatitis and analyses of regeneration mechanisms // Pancreas. 2006. V. 33. № 4. 371-381.
4. Odaira C., Berger Z., Iovanna J.L., Sarles H. Localized necrohemorrhagic pancreatitis in the rat after pancreatic interstitial trypsin injection. Regressive pseudochronic lesions // Digestion. 1986. V. 34. № 2. 68-77.
5. Локушина Л.А. Протеолитические ферменты в регуляции биологических процессов // Биоорг. химия. 1994. Т. 20. № 2. 134-142.
6. Lokshina L.A. Proteolytic enzymes in regulation of biological processes // Bioorg. khimiya. 1994. V. 20. № 2. 134-142.
7. Chan Y.C., Leung P.S. Acute pancreatitis: Animal models and recent advances in basic research // Pancreas. 2007. V. 34. № 1. 1-14.
8. Markland F.S. Snake venoms and the hemostatic system // Toxicon. 1998. V. 36. № 12. 1749-1800.
9. Marsh N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism — a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance // Blood Coagul. Fibrinolysis. 1994. V. 5. № 3. 399-410.
10. Вискунов В.Г., Фещенко А.М., Проценко С.И., Бородач А.В. // Анналы хирург. гепатологии. 2007. Т. 12. № 3. 171.
11. Viskunov V.G., Feschenko A.M., Protsenko S.I., Borodach A.V. // Annaly khirurg. gepatologii. 2007. V. 12. № 3. 171.
12. Anai K., Sugiki M., Yoshida E., Maruyama M. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of Bothrops jara-raca venom in rats // Toxicon. 2002. V. 40. № 1. 63-68.
13. Yoshikawa T., Naruse S., Kitagawa M. et al. Effect of a new inhibitor of type II phospholipase A2 on experimental acute pancreatitis in rats // Pancreas. 1999. V. 19. № 2. 193-198.
14. Niederau C., Lüthen R. Current aspects in the pathogenesis of acute pancreatitis // Schweiz. Rundsch. Med. Prax. 1997. Bd 86. № 10. Z. 385-391.
15. Mössner J., Wessig C., Ogami Y., Keim V. Role of various phospholipases A2 and inhibitors in the pathogenesis and prevention of pancreatic acinar cell necrosis: studies with isolated rat pancreatic acini // Int. J. Pancreatol. 2000. V. 27. № 1. 29-38.
16. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1477. № 1 — 2. 146-156.
17. Gasanov S.E., Alsarraj M.A., Gasanov N.E., Rael E.D. Cobra venom cytotoxin free of phospholipase A2 and its effect on model membranes and T leukemia cells // J. Membr. Biol. 1997. V. 155. № 2. 133-142.

MODEL OF ACUTE PANCREATITIS IN RATS AFTER TREATMENT WITH TRYPSIN AND SNAKE VENOM

Vladimir Georgievich VISKUNOV^{1,2}, Aleksander Borisovich PUPYSHEV¹, Svetlana Ivanovna PROTSENKO¹, Aleksander Petrovich NADEYEV¹, Marina Aleksandrovna SINITSYNA², Aleksander Mikhailovich FESHCHENKO³, Zaza Yuzaevich CHUBENIDZE³

¹ Novosibirsk State Medical University of Roszdrav,
52, Krasnyi prospekt, Novosibirsk, 630091

² SI RI for regional pathology and pathomorphology of SB RAMS
2, Ac. Timakov str., Novosibirsk, 630117

³ Municipal clinical hospital
1a, A. Nevski str., Novosibirsk, 630075

Intrapancreatic injection of trypsin (50 mg/kg of body weight) or snake venom of the viper common (*Vipera berus* L.) (1 mg/kg) to rats caused the cognate pictures of acute hemorrhagic pancreatitis, similar dynamics of damage of other abdominal cavity organs and in both series death of 70 — 80% animal (24 h). Probably, the similarity is due to presence of hemorrhagic activity both in trypsin and snake venom, possible activation of pancreatic phospholipase A2 by exogenous trypsin, and in both cases putative membranolytic attack of acinar cells by phospholipase A2.

Key words: acute hemorrhagic pancreatitis, trypsin, snake venom, Wistar rats.

Viskunov V.G. — doctor of Medical Sciences, professor, senior researcher of laboratory of pathophysiology, general pathology and pathomorphology of SI RI for regional pathology and pathomorphology, professor of chair of hospital surgery of Novosibirsk State Medical University, e-mail: apupyshev@mail.ru

Pupyshev A.B. — candidate of Biological Sciences, senior researcher, e-mail: apupyshev@mail.ru

Protsenko S.I. — candidate of Medical Sciences, assistant of chair of polyclinic surgery

Nadeev A.P. — doctor of Medical Sciences, professor, professor of chair of pathologic anatomy

Sinitsyna M.A. — researcher of laboratory of pathophysiology, general pathology and pathomorphology

Feschenko A.M. — candidate of Medical Sciences, deputy senior physician

Chubenidze Z.Y. — surgeon