

ФАКТОР НЕКРОЗА ОПУХОЛИ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ КАРПРОФЕНА

Лазаренко Л.В.

ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России, Пермь, e-mail: lazarenko.mila2012@yandex.ru

Исследована роль провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли α (TNF α) – в развитии панкреатопатии, модель которой получили путем применения карпрофена (группа селективных НПВП) в течение 21 дня. Опыт проводился на экспериментальных животных (крысах), опытные группы получали разные дозировки препарата: 4 мг/кг (рекомендована производителем), 8 мг/кг, 20 мг/кг, 40 мг/кг. Изучали экспрессию рецепторов TNF α на мембранах клеток поджелудочной железы животных иммуногистохимическим методом. Полученные результаты сравнивали с материалом, полученным от интактных животных контрольной группы. Выявлено, что экспрессия рецепторов TNF α (TNF α R1) выявляется в эндокринной части поджелудочной железы и имеет локальный характер. Было обнаружено проявление экспрессии TNF α R1 у интактных животных. Анализ результатов показал, что у животных опытных групп размер площади экспрессии TNF α R1 зависит от дозировки препарата. Максимальная площадь экспрессии наблюдалась в группе, получавшей дозу карпрофена, рекомендованную производителем. У животных, которым применяли пятикратную и десятикратную дозы препарата, размер площади экспрессии был меньше по сравнению с контрольной группой. Обнаруженные при проведении эксперимента изменения обусловлены действием карпрофена на поджелудочную железу.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли- α , экспрессия рецепторов, карпрофен.

TUMOR NECROSIS FACTOR IN THE PANCREAS IN THE EXPERIMENTAL USE OF CARPROFEN

Lazarenko L.V.

Perm Institute of the Federal Penal Service, Perm, e-mail: lazarenko.mila2012@yandex.ru

The role of a pro-inflammatory cytokine, tumor necrosis factor α (TNF α), in the development of pancreatopathy, a model of which was obtained by using carprofen (a group of selective NSAIDs) for 21 days, was investigated. The experiment was carried out on experimental animals (rats), the experimental groups received different dosages of the drug: 4 mg/kg (recommended by the manufacturer), 8 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg. Studied the expression of TNF α receptors on the membranes of pancreatic cells of animals by immunohistochemical method. The results obtained were compared with the material obtained from intact animals of the control group. It was revealed that the expression of TNF α receptors (TNF α R1) is detected in the endocrine pancreas and has a local character. The expression of TNF α R1 expression was found in intact animals. Analysis of the results showed that in animals of the experimental groups, the size of the area of TNF α R1 expression depends on the dosage of the drug. The maximum area of expression was observed in the group receiving the manufacturer's recommended dose of carprofen. In animals that received five and ten times doses of the drug, the size of the expression area was smaller compared to the control group. The changes found during the experiment are due to the action of carprofen on the pancreas.

Keywords: tumor necrosis factor- α , receptor expression, carprofen.

Назначение нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП) длительным курсом достаточно часто сопровождается побочными реакциями в органах пищеварительной системы. Тем не менее НПВП, как традиционные, так и селективные ингибиторы фермента циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), до настоящего времени являются главными средствами выбора при лечении воспаления и боли [1], в том числе у животных. Животным НПВП назначают при травмах, сопровождающихся болевым синдромом, болезнях костной и мышечной систем, после оперативного вмешательства [2].

По имеющейся статистике, препараты, в состав которых включен карпрофен, назначаются животным чаще по сравнению с другими аналогами [2]. Карпрофен является селективным НПВП – влияет преимущественно на ЦОГ-2, которая индуцируется в ответ на развитие воспаления [3]. По данным авторов, этот препарат чаще всего вызывает побочные эффекты. При использовании карпрофена в терапевтических дозировках формирование нежелательных реакций у животных наблюдается в 17,7% случаев, в том числе – развитие токсического гепатита [2]. Чаще всего гепатопатия развивается в первые три недели приема препаратов, продолжение приема может привести к прогрессированию поражения печени [4].

В современных научных источниках содержится мало информации о том, что НПВП могут провоцировать патологические изменения поджелудочной железы и быть причиной острого панкреатита [5]. Эта проблема представляет бесспорный интерес, так как препараты данной группы назначают как средство для снятия боли при панкреатите.

По настоящее время механизм развития панкреатопатии, вызванной применением НПВП, до конца не изучен. Работы, посвященные изучению патогенеза панкреатитов, обнаруживают, что развитие воспаления происходит при участии цитокинов. Под влиянием различных факторов в панкреатитах активируются ферменты, приводящие к высвобождению провоспалительных цитокинов (в том числе фактора некроза опухоли, TNF α), а затем формируется местная воспалительная реакция [6, 7].

Первоначально TNF α был описан как фактор, который может вызывать некроз опухолей, в дальнейшем он определяется как основной регулятор воспалительной реакции. Многочисленные исследования, направленные на изучение биологических функций TNF α , установили, что данный цитокин играет основную роль в иммунопатогенезе многих заболеваний [8, 9]. Несмотря на сведения, накопленные в области изучения различных функций TNF α , исследования этого цитокина являются актуальными.

Цель исследований. В условиях эксперимента с использованием иммуногистохимических методов исследовать роль фактора некроза опухоли альфа (TNF α) в развитии панкреатопатии, модель которой была получена в результате длительного применения карпрофена лабораторным крысам.

Материалы и методы исследования. Для моделирования патологии поджелудочной железы использовали препарат ветеринарного назначения «Римадил Р» (некоммерческое название – карпрофен) производства «Pfizer Animal Health» (США) курсом 21 день. Опытные группы формировали из взрослых нелинейных (гетерозиготных) белых крыс. Для изучения полной картины патогенеза экспериментальным животным вводили разные дозировки

препарата – терапевтическую и дозы, превышающие ее в два, пять и десять раз. Представлена схема эксперимента (рис. 1).

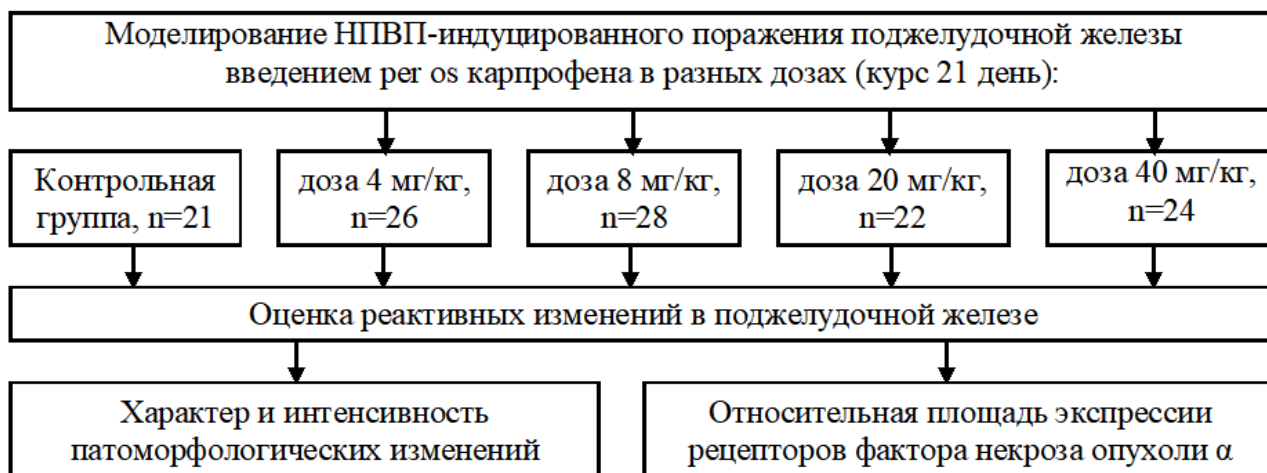


Рис. 1. Схема эксперимента

Эвтаназию экспериментальных животных проводили на 22-й день опыта путем перерезки спинного мозга с применением эфирного наркоза. После эвтаназии для гистологических исследований отбирали кусочки поджелудочной железы, которые фиксировали в 10%-ном забуференном растворе формалина (pH 7,2), затем обезвоживали и обезжировали в соответствии со стандартными гистологическими методиками, после чего осуществляли их заливку в парафин (HISTOMIX®). Для оценки патоморфологических изменений паренхимы органа использовали метод окрашивания депарафинированных срезов гематоксилином и эозином.

Проведение иммуногистохимических исследований. Участие TNF α в развитии панкреатопатии изучали по проявлению экспрессии рецепторов цитокина – TNF α R1, локализующихся на клеточной мембране. Применяли непрямой иммуногистохимический метод. Для выявления рецепторов использовали антитела TNFR1 (poly) RabbitAnti-TNF Receptor I PolyclonalAntibody (Bioss) производства компании «Santa Cruz Biotechnology» (США). Для обнаружения антител применяли системы детекции UnoVue detection system.

Гистологические препараты изготавливали на стеклах с адгезивным покрытием Menzel (Германия). Гистологические срезы получали из ранее исследованных фрагментов поджелудочной железы, в которых находили характерные патоморфологические нарушения. Для восстановления антигенных детерминант после формалиновой фиксации тканей железы использовали способ теплового демаскирования антигенов. После экспозиции с антителами гистологические срезы окрашивали DAB (3,3'-диаминобензидином) и докрасивали гематоксилином Майера.

Экспрессию рецепторов на мембране клеток выявляли по коричневой окраске при просмотре препаратов. При изучении гистологических препаратов выявили, что

антигенпозитивные окрашенные клетки распределялись только в эндокринной части поджелудочной железы, при этом экспрессия TNF α R1 имела локализованный характер (преимущественно по краям эндокринных островков). По этой причине для количественной оценки экспрессии определяли относительную площадь (в процентах), которую занимали окрашенные клетки, по отношению к площади островка. Для измерения площади экспрессии рецепторов использовали программное обеспечение «измерение произвольной площади» (программа ImageJ, Bio Vision 4.0, Австрия) (рис. 2).

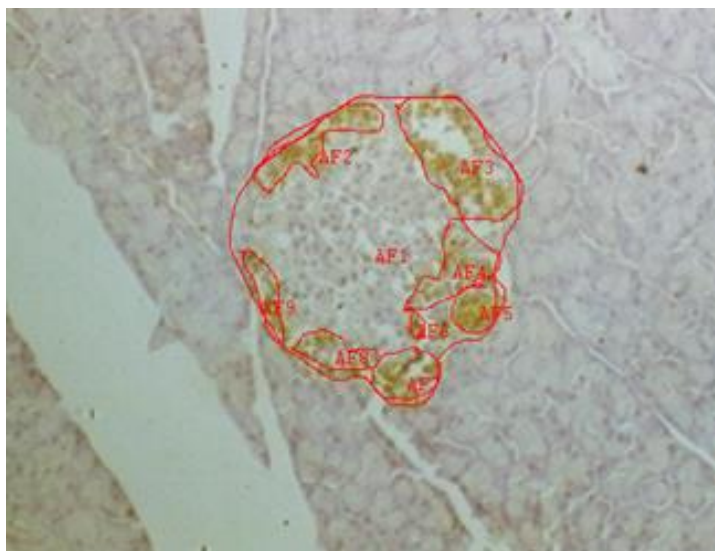


Рис. 2. Измерение произвольной площади экспрессии рецепторов (программное обеспечение Bio Vision), x 150

Для фотосъемки использовали светооптический микроскоп Micros и программу ScorePhoto (CamV 200, Австрия). Для статистической обработки результатов исследования применяли критерий Стьюдента.

Эксперименты проводили в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23 августа 2010 г.) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г.

Результаты исследования и их обсуждение. Гистологические исследования. В соответствии с целью исследования, вначале изучали характер и интенсивность патоморфологических изменений паренхимы поджелудочной железы у животных опытных групп. В результате обнаружили, что длительное применение карпрофена приводит к развитию повреждений в тканях железы, характерных для токсического поражения. В экзокринной части железы наблюдали патоморфологические изменения, такие как отеки межацинарной и междольковой соединительной ткани, белковая и жировая дистрофия, некрозы, появление двуядерных клеток. Нарушения выявляли у животных всех четырех опытных групп, получавших различные дозировки карпрофена (в том числе терапевтическую

дозу). Выявили, что при повышении дозы препарата степень нарушений возрастала, таким образом, мы наблюдали дозозависимый эффект. Со стороны эндокринных островков видимых нарушений морфологической структуры при просмотре препаратов не выявлялось [10].

Иммуногистохимические исследования. Изучение гистологических препаратов показало, что проявления экспрессии рецепторов TNF α R1 в эндокринных островках поджелудочной железы наблюдались у животных всех экспериментальных групп, в том числе у интактных (контроль). При этом у животных контрольной группы относительная площадь экспрессии TNF α R1 составляла $8,49 \pm 2,23\%$. Обнаружение экспрессии TNF α R1 у интактных животных можно объяснить тем, что TNF α рассматривается не только как медиатор воспалительных процессов при различных заболеваниях, но и как цитокин, играющий важную роль в регуляции физиологической дифференцировки, роста и метаболизма различных клеток [8]. Научная информация о действии TNF α в эндокринной части поджелудочной железы крайне немногочисленна. Например, имеется предположение, что в границах физиологической нормы инсулин образуется путем активации ядерного фактора NF-kB (NF-kB контролирует различные клеточные реакции, в том числе экспрессию генов апоптоза). Активация ядерного фактора NF-kB выполняется через рецепторы TNF α [11].

Представлены результаты измерения относительной площади экспрессии TNF α R1 у животных опытных групп, которым применяли карпрофен в разных дозах, по сравнению с группой контроля (рис. 3).

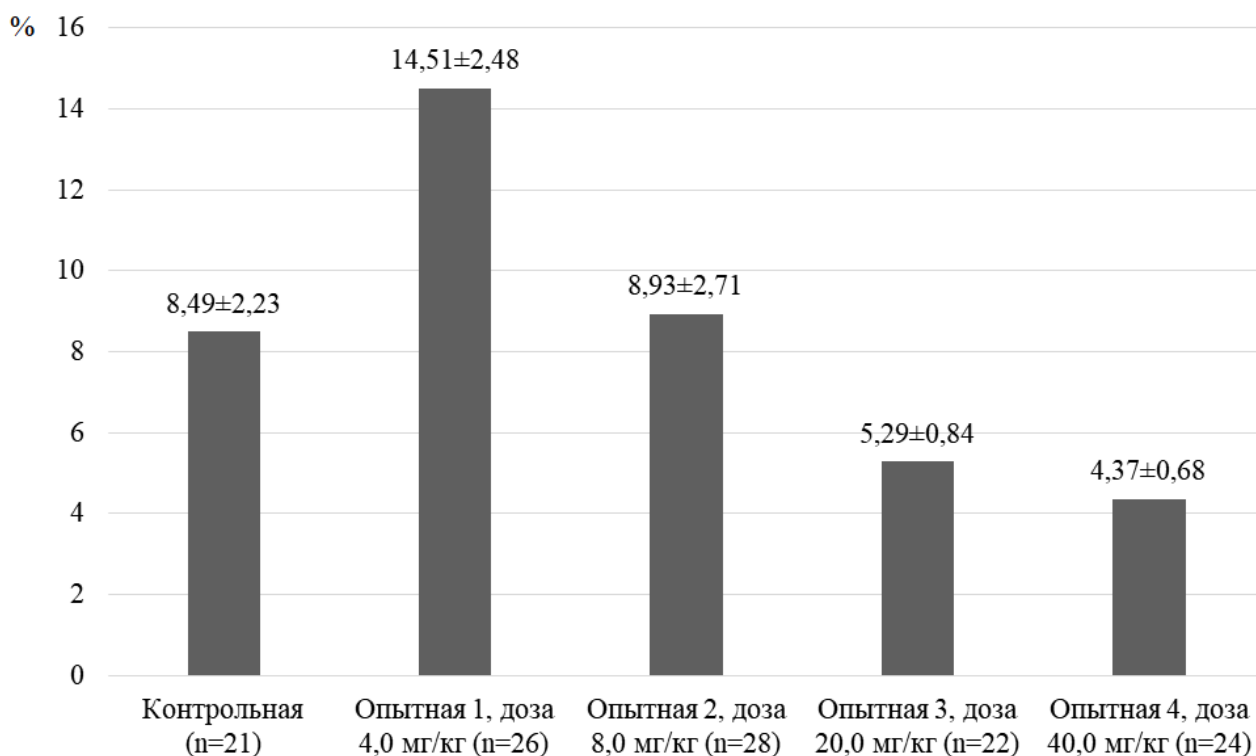


Рис. 3. Относительная площадь экспрессии TNF α R1 (в % от площади островка).

Примечания: p – по отношению к результатам контрольной группы: опытная 1 – p=0,084; опытная 2 – p=0,905; опытная 3 – p=0,179; опытная 4 – p=0,069

Оценка размеров экспрессии рецепторов выявила определенную зависимость от дозировки препарата. Из полученных результатов видно, что максимальная площадь экспрессии – $14,51 \pm 2,48\%$ – наблюдалась у крыс, получавших 4,0 мг/кг карпрофена, то есть минимальную дозу. В опытных группах, получавших высокие дозы препарата (20,0 и 40 мг/кг), относительная площадь экспрессии была меньше, чем в контроле.

Приведены примеры проявления экспрессии TNF α R1 у животных, получавших терапевтическую (рис. 4) и пятикратную (рис. 5) дозировки карпрофена.

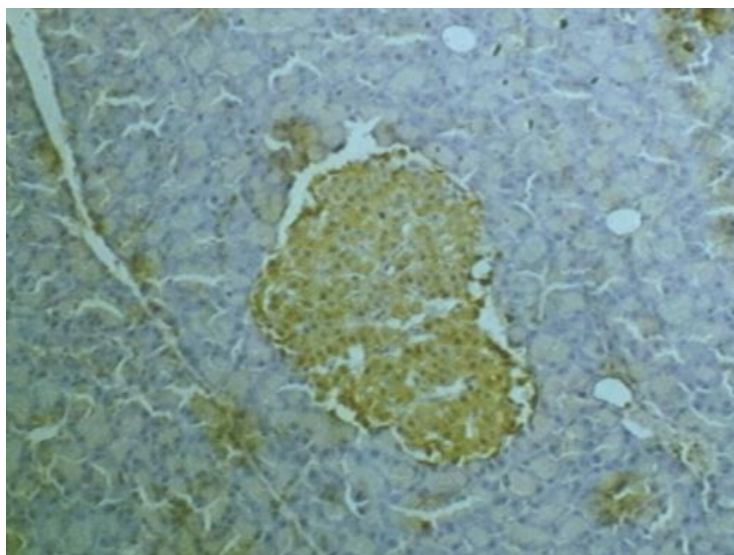


Рис. 4. Экспрессия TNF α R1 в эндокринных островках (поджелудочная железа). Крыса, опытная группа (карпрофен в дозе 4,0 мг/кг, в течение 21 дня). Окраска 3,3'-диаминобензидином и гематоксилином Майера. Увеличение x150

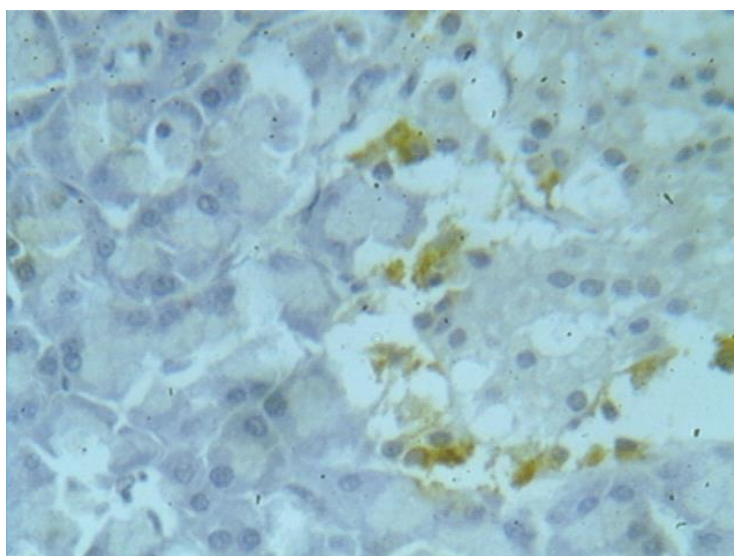


Рис. 5. Экспрессия TNF α R1 в эндокринных островках (поджелудочная железа). Крысы, опытная группа (карпрофен в дозе 20,0 мг/кг, в течение 21 дня). Окраска 3,3'-диаминобензидином и гематоксилином Майера. Увеличение $\times 600$

По нашему мнению, изменения площади экспрессии TNF α R1 в эндокринных островках железы у животных опытных групп связаны с действием препарата. В своей работе G.D. Kalliolias, L.B. Ivashkiv (2016) указывают, что сигнальные пути и биологические клеточные эффекты TNF α осуществляются через рецепторы, которые экспрессируются на клетках и обеспечивают различные пути передачи сигналов. Воздействие TNF α на клетку запускает разнообразные сигнальные каскады, которые приводят к целому ряду клеточных реакций, они включают апоптоз клеток, их дифференцировку или пролиферацию [12]. Экспериментально выявленное нами увеличение площади экспрессии TNF α R1 у животных, которым применяли терапевтическую (минимальную) дозу препарата, вероятно, вызвано готовностью эндокринных клеток к апоптозу.

Можно допустить, что уменьшение площади экспрессии рецепторов в островках железы у животных, которым применяли высокие дозы, связано как со снижением количества рецепторов TNF α R1 на мембране клеток, так и с изменением их структуры вследствие развития дистрофических и воспалительных процессов в паренхиме железы. Этот факт подтверждается тем, что деструкция и формирование фиброза ткани поджелудочной железы приводят к поражениям ее островковой части [13].

Представленные результаты эксперимента, целью которого было изучить влияние карпрофена на экспрессию рецепторов TNF α в поджелудочной железе, согласуются с результатами, полученными в экспериментальной серии, проведенной нами ранее, где в аналогичных условиях изучали побочное действие нимесулида [14]. Согласованность результатов, полученных в двух сериях опытов, обнаруживает определенную закономерность, которая проявляется влиянием TNF α на патогенез панкреатопатии, индуцированной длительным приемом НПВП.

Заключение. В результате исследований установлено, что экспрессия рецепторов TNF α (TNF α R1) обнаруживается только лишь в эндокринных островках и имеет ограниченный характер. Проявления экспрессии TNF α R1 были обнаружены у животных всех экспериментальных групп, в том числе у интактных. Установлено, что у животных опытных групп размер площади экспрессии рецепторов в эндокринных островках зависел от дозировки препарата. Максимальная площадь экспрессии отмечалась у животных, которым давали карпрофен в терапевтической дозе 4,0 мг/кг. У животных, которым давали

увеличенные дозировки препарата (пятикратную и десятикратную), площадь экспрессии была меньше по сравнению с контрольной группой.

Список литературы

1. Лесная О.А., Русанова Е.И., Прокофьева Е.Б., Фрейре да Сильва Т. Рациональное применение НПВП в свете клинических рекомендаций и данных новых исследований // Трудный пациент. 2019. Т. 17. № 10. С. 31-34.
2. Ельцова А.А., Бойко Т.В. Результаты анализа факторов, определяющих рациональное назначение нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов для животных // Вестник КрасГАУ. 2019. № 1 (142). С. 107-111.
3. Римадил Р инструкция по применению. Vidal. Справочник лекарственных средств. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.vidal.ru/veterinar/rimadyl-28016> (дата обращения: 12.11.2022).
4. Калашникова О.В. Отравление НПВП // Ветеринарный Петербург. 2021. № 2. [Электронный ресурс]. URL: <https://spbvet.info/zhurnaly/2-2021/otravlenie-npvp/> (дата обращения: 12.11.2022).
5. Hussain N., Akram Z., Okachi Oparanma C., Sheheryar S. Role of NSAIDs in the Prevention of Post-ERCP Pancreatitis: A Narrative Review. Arch Intern Med Res. 2021. no. 4 (2). P. 134-141. DOI: 10.26502 / aimr.0064.
6. Тарасенко В.С., Кубышкин В.А., Демин Д.Б., Волков Д.В., Смолягин А.И., Чукина О.В. Иммунологические нарушения при панкреонекрозе и их коррекция // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2013. № 1. С. 88-95.
7. Подолужный В.И. Острый панкреатит: современные представления об этиологии, патогенезе, диагностике и лечении // Фундаментальная и клиническая медицина . 2017. № 4. С. 62-71.
8. Bradley J.R. TNF-mediated inflammatory disease. J. Pathol. 2008. vol. 214. no. 2. P. 149-160. DOI: 10.1002/path.2287.
9. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. Роль фактора некроза опухолей-альфа в иммунопатогенезе заболеваний различной этиологии и его значимость в развитии антицитокиновой терапии моноклональными антителами // Медицинская иммунология. 2018. № 6. С. 797-806.
10. Лазаренко Л.В., Косарева П.В. Изменения ткани поджелудочной железы, индуцированные приемом карпрофена у экспериментальных животных // Современные

проблемы науки и образования. 2017. № 6. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27329> (дата обращения: 12.11.2022)..

11. Stendahl J.C., Kaufman D.B., Stupp S.I. Extracellular Matrix in Pancreatic Islets: Relevance to Scaffold Design and Transplantation. *Cell Transplant.* 2009. no. 18 (1). P. 1-12. DOI: 10.3727/096368909788237195.

12. Kalliolias G.D., Ivashkiv L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016. vol. 12. no. 1. P. 49-62. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.169.

13. Винокурова Л.В., Дроздов В.Н., Березина О.И., Шулятьев И.С., Варванина Г.Г., Немежинский В.И. Особенности течения сахарного диабета при хроническом панкреатите // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. № 7. С. 59-63.

14. Лазаренко Л.В., Косарева П.В. Оценка экспрессии рецептора фактора некроза опухоли в ткани поджелудочной железы у животных при НПВП-ассоциированной панкреатопатии // Вестник Пермского университета. Серия Биология. 2017. № 4. С. 262-267.