

А.А. Чегодаева, М.С. Фуныгин

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗМЕНЕНИЙ В ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА У МОРСКИХ СВИНОК

ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ
(Оренбург)

В работе установлено, что экспериментальный острый панкреатит у морских свинок изначально характеризуется нарушениями микроциркуляции с последующим повреждением паренхимы и стромы органа. Полученные результаты подтверждают первичность поражения сосудистого звена с развитием ишемического симптомокомплекса при ОП, что свидетельствует о необходимости дальнейших исследований по изучению эффективности применения антиоксидантов при данной патологии.

Ключевые слова: экспериментальный острый панкреатит, морские свинки, нарушения микроциркуляции

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CHANGES IN PANCREAS IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS IN GUINEA-PIGS

A.A. Chegodaeva, M.S. Funygin

Orenburg State Medical Academy, Orenburg

The article determined that experimental acute pancreatitis in guinea-pigs was initially characterized by microcirculation disorders with further damage of parenchyma and stroma of the organ. Obtained results confirm primary vascular lesions with development ischemic symptom complex at the acute pancreatitis, that testifies to the necessity of further studies on the effectiveness of use of antioxidants at this pathology.

Key words: experimental acute pancreatitis, guinea-pigs, microcirculation disorder

ВВЕДЕНИЕ

Острый панкреатит (ОП) остаётся одной из нерешённых хирургических проблем, являясь потенциально фатальным заболеванием с широкой вариацией клинических форм, разнообразием местных и системных осложнений [2, 4, 5].

Внутриклеточная активация ферментов на фоне нарастающей гипоксии в результате нарушений кровообращения в поджелудочной железе (ПЖ) на уровне микроциркуляторного звена приводит к ацинарному некрозу и некрозу жировых клеток. Возникают две тесно взаимосвязанные, «каскадно» протекающие патобиохимические и морфофункциональные реакции, в результате чего развивается комплекс тяжелых изменений как в самой железе, так и во внутренних органах [6, 9].

Интегральным моментом, определяющим прогрессирующее развитие патофизиологических нарушений в ПЖ и в организме в целом при ОП являются функциональные и структурные изменения, сопровождающиеся повышением продуктов свободно-радикального окисления [8, 10, 11].

Известно, что морские свинки, так же, как и человек, неспособны, в отличие от остальных млекопитающих, к эндогенному синтезу аскорбиновой кислоты, ведущего неферментативного антиоксиданта, осуществляющего, кроме того, рецикл ряда других антиоксидантных систем, поэтому нуждаются в её постоянном приёме извне. То есть данная экспериментальная модель, в отличие от других животных (крысы, кролики и т.д.) должна

наиболее корректно отражать патоморфологию ОП в условиях прогрессирующих окислительного стресса и антиоксидантного дефицита.

Цель работы: изучить структурно-функциональные изменения тканей поджелудочной железы при экспериментальном остром панкреатите (ЭОП) у морских свинок.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены на 30 половозрелых морских свинках самцах массой 550 – 720 г. Моделирование ЭОП осуществляли по следующей методике. В экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики морским свинкам под эфирным наркозом производили верхнесрединную лапаротомию и выделяли ПЖ. Затем в протоковую систему железы вводили 0,5 – 1,0 мл стерильной желчи (от больных, оперированных по поводу холедохолитиаза) с каплей аутокрови и механическим повреждением ее тканей: дольки органа подвергали травматизации путем сдавливания их браншами анатомического пинцета (модель Mallet Guay, 1961).

Экспериментальные животные выводились из опыта через 1, 3 и 5 суток от начала эксперимента путем ингаляции летальной дозы эфира и декапитации по 10 особей в каждой группе. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Изучение полученных участков ПЖ осуществляли на световом и электронномикроскопическом

уровнях с применением иммуноцитохимических исследований. Гистосрезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином. Дифференцировку углеводных соединений в тканях поджелудочной железы с необходимыми контролями проводили в соответствии с рекомендациями Э. Пирса (1962) [3]. Нуклеиновые кислоты выявляли метиленовым зеленым и пиронином G по Браше. Морфологические исследования соотношений жизнеспособных и некротизированных зон поджелудочной железы на гистопрепаратах проводили с использованием окулярных морфометрических приспособлений [1]. Выявление ДНК в срезах клеточных элементов проводилось по методу Фельгена – Розенбека.

Для электронномикроскопического исследования материал последовательно фиксировали в 2%, 5% растворе охлажденного (+ 4 °C) глютарового альдегида и четырехокси осмия по G. Millonig (1961). Обезжизнение проводили в ацетоне с нарастающей концентрацией и последующей заливкой кусочков в смолу ЭПОН-812. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме LKB-5. Срезы подвергли двойному контрастированию: в 2% водном растворе уранила ацетата при +37 °C в течение 2 часов и цитрате свинца [10]. Изучение объектов и фотографирование их осуществляли с помощью электронного микроскопа ЭВМ 100 АК при увеличениях $\times 7000$ – 48000.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 1 сутки от начала эксперимента развиваются локальные некротические изменения паренхимы и стромы органа на фоне резко выраженного геморрагического отека. В результате некроза тканей, кровоизлияний из разрушенных и тромбированных сосудов микроциркуляторного русла, ишемии формируются множественные очаги лизиса ацинусов и выводных протоков. Одновременно происходит дискомплексация концевых секреторных отделов в паранекротических участках железы. Ацинарные клетки, утратив органотипические межклеточные контакты, продолжают осуществлять свою повышенную секреторную деятельность, о чем свидетельствует высокая пиронинофильность их цитоплазмы, указывающая на повышенное содержание рибонуклеопротеидов, а также большое число зимогенных гранул и усиленная гистохимическая реакция на суммарный белок.

Панкреатоциты имели гипертрофированные ядра, протяженные и расширенные каналцы шероховатого эндоплазматического ретикулума, увеличенные диктиосомы комплекса Гольджи. Отмеченные ультраструктурные изменения данных клеток прогрессивно нарастают по срокам эксперимента. Несмотря на то, что в этих клетках были обнаружены набухшие митохондрии с разрушенными кристами, крупные лизосомы и аутофагосомы, дискомплексированные панкреатоциты, локализованные в паранекротических

зонах, обладают высокой способностью к синтезу ферментов, что является неблагоприятным фактором, усугубляющим течение ЭОП.

Поэтому через 3 суток эксперимента зоны геморрагического некроза имеют устойчивую тенденцию к генерализации. Описываемые изменения паренхимы ПЖ происходят и в той части органа, которая макроскопически внешне (при эвтаназии) не имела выраженных признаков воспаления и напоминала по внешнему виду картину неизмененных тканей органа.

Паралитическое расширение сосудов микроциркуляторного русла, повышенная проницаемость их стенок приводят к быстро нарастающему отеку, который был наиболее выражен через 3 суток эксперимента. Отек столь значителен, что некротизированные и пограничные с ними ткани железы, фрагментируясь, в отдельных участках органа секвестрируются и отделяются через поврежденную соединительнотканную капсулу наружу. Повышение проницаемости стенок сосудов сопровождается значительной экстравазацией не только плазмы, но и форменных элементов крови.

Уже через 1 сутки отмечаются реактивные изменения эндотелиоцитов капилляров: в их цитоплазме появляется большое количество пиноцитозных пузырьков, расширяются каналцы эндоплазматического ретикулума, набухают митохондрии, вырастает число свободных рибосом (полисом) и мелких гранул различной электронной плотности. В этот период в экссудате преобладают полиморфноядерные лейкоциты. Через 3 суток к ним присоединяются лимфоциты и макрофаги моноцитарного генеза. Последние включаются в процессы фагоцитоза некротических тканей железы, содержащих распадающиеся нейтрофильные гранулоциты (нейтрофильный детрит).

Начиная с 3-х суток эксперимента, в участках панкреонекроза начинается развитие соединительнотканного регенерата (грануляционной ткани). Он включает в себя гемокапилляры, большое количество фибробластических клеток, лимфоциты, зернистые лейкоциты (в том числе с эозинофильной зернистостью), макрофаги. Отмечается активизация сохранных ацинарных клеток и эпителиоцитов выводных протоков к клеточной репродукции. Данная пролиферативная активность приводит к формированию небольших по размерам эпителиальных трубочек, тяжей, сдавленных прослойками малодифференцированной соединительной ткани.

В некоторой части концевых отделов поджелудочной железы происходило существенное расширение их просветов, а составляющие их клетки формировали структуры, подобные выводным протокам. Этому процессу, как правило, наблюдаемому через 3 суток опыта, предшествовали ультраструктурные разрушения зимогенной части ацинозных клеток и сегрегация ядерно-цитоплазматических участков клеток. Следует заметить, что как новообразованные эпителиальные пролифераты, так и реорганизованные по типу выводных протоков

(трубочки) ацинусы поджелудочной железы не претерпевали прогрессивных изменений и через 5 суток эксперимента подвергались атрофическим и деструктивным процессам. Формирования новых ацинусов в области регенерата не обнаружено. Надо полагать, что в этих условиях реализуются лишь гистотипические потенции железистого эпителия органа, и не происходит реализация его органотипических свойств, что связано с быстрым созреванием соединительной ткани.

Васкулогенез и пролиферация фибробластов сдержаны, а очаги некротизированных тканей четко не отграничиваются соединительнотканью прослойками. Электронно-микроскопический анализ фибробластов показал, что их внутренняя структурно-функциональная перестройка не соответствует способности к коллагеногенезу. У большинства этих клеток ядра содержали конденсированный хроматин и не имели ядрышек. Митохондрии, мембранные компартменты синтеза и экстрюзии секретируемых субстратов (шероховатый эндоплазматический ретикулум, пластинчатый комплекс Гольджи) претерпевали выраженные деструктивные изменения.

Таким образом, функциональная активность фибробластов, фибриллогенез в паранекротических участках железы выражены крайне слабо (в том числе и через 5 суток эксперимента). Об этом же свидетельствуют малое содержание рибонуклеопротеидов и суммарного белка в цитоплазме фибробластов. Гистохимические исследования также показали, что эти клетки мало продуцируют несulfатированные гликозаминогликаны, являющиеся важными компонентами межклеточного вещества соединительной ткани.

Через 5 суток опыта в участках паранекроза происходит уменьшение числа микрососудов, макрофагов, малодифференцированных фибробластов. В последних еще более понижается содержание рибонуклеопротеидов, уменьшается протяженность канальцев эндоплазматического ретикула и пластин комплекса Гольджи, а также количество свободных рибосом. При этом клетки приобретают вытянутую форму, свойственную фиброцитам.

Следует особенно отметить, что процессы ткане- и органоспецифической регенерации железистого эпителия существенно ограничены. Лишь в области выводных протоков регистрируются незначительные эпителиальные пролифераты в виде кистозных полостей или трубочек, содержащих амилазоустойчивый PAS-позитивный материал.

Резюмируя результаты исследований, следует отметить, что морфофункциональные изменения паренхимы и стромы железы сводятся к выражен-

ному отеку, дистрофии, некробиозу и некрозу панкреатоцитов, а также эпителия выводных протоков. То есть ЭОП у морских свинок характеризуется изначально нарушениями микроциркуляции с последующим повреждением паренхимы и стромы органа, слабой выраженностью пролиферации и функционирования соединительнотканых элементов, лимитированием развития грануляционной ткани, а также малой репарацией эпителиальных структур органа. Полученные результаты подтверждают первичность поражения сосудистого звена с развитием ишемического симптомокомплекса при ОП, что свидетельствует о необходимости дальнейших исследований по изучению эффективности применения антиоксидантов при данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина. — 1990. — 260 с.
2. Кубышкин В.А. Лечебная тактика при панкреонекрозе // *Анналы хирургической гепатологии*. — 1996. — № 1. — С. 148.
3. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и практическая. — М.: ИЛ, 1962. — 610 с.
4. Руднов В.А., Зубарев А.С. Интенсивная терапия некротизирующего панкреатита: анализ современного состояния // *Русский медицинский журнал*. — 2005. — Т. 13, № 26. — С. 1774–1778.
5. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З. Деструктивный панкреатит: алгоритм диагностики и лечения (проект) // *Consilium Medicum*. — 2001. — Т. 3, № 6. — С. 273–279.
6. Смирнов Д.А., Ходосевич Л.С., Плащевский А.Т. Диагностика мембранных нарушений при остром панкреатите // *Хирургия*. — 1990. — № 1. — С. 49–52.
7. Bonner-Weiz S. Pancreatic stem cells // *J. Pathol.* — 2002. — Vol. 197, N 3. — P. 519–526.
8. Kim So-Yoon, Lee S.H., Bendayan M.H. Activation of nestin-positive duct stem cells in pancreas // *Dev. Dynamics*. — 2004. — Vol. 230, N 1. — P. 1–11.
9. Nonaka A., Mahabe T., Kyogoku T. et al. The role of free radical in the development of acute mild and severe pancreatitis in mice // *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. — 1990. — Vol. 87. — P. 1212–1216.
10. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy // *J. Cell. Biol.* — 1963. — Vol. 17. — P. 203–213.
11. Sunamura M., Yamauchi J., Shibuya K., Chen H.M. et al. Pancreatic microcirculation in acute pancreatitis // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* — 1998. — Vol. 5 (1). — P. 62–68.

Сведения об авторах

Фуныгин Максим Сергеевич — аспирант кафедры факультетской хирургии ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ (460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6; e-mail: fun-maksim@yandex.ru)
Чегодаева Алена Алексеевна — аспирант кафедры факультетской хирургии ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития РФ (460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6; e-mail: alenaa-med@mail.ru)