

Патоморфогенез органов панкреатодуоденальной зоны при экспериментальном панкреонекрозе, индуцированном введением трипсина

С.И.ПРОЦЕНКО, А.А.АСАТРЯН, В.Г.ВИСКУНОВ

Pathomorphogenesis of pancreas-duodenum area while experimental pancreonecrosis induced by injectine of trypsin

S.I.PROTSENKO, A.A.ASATRYAN, V.G.VISKUNOV

Новосибирский государственный медицинский университет
НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН

Исследовали морфологические изменения в поджелудочной железе и двенадцатиперстной кишке при остром экспериментальном панкреатите, индуцированном трипсином у 141 крысы линии «Вистар». Полученные результаты свидетельствуют о тотальном некрозе поджелудочной железы, массивном кровоизлиянии в междольковую и внутридольковую интерстициальную ткань, развитии дуоденита с выраженными дистрофическими изменениями эпителиальных структур и желез, высокой летальностью экспериментальных животных.

Ключевые слова: панкреонекроз, двенадцатиперстная кишка, трипсин, крысы линии «Вистар»

Morphological changes in the pancreas and duodenum while acute experimental pancreatitis induced by trypsin in 141 white Wistar rats were studied. The received results show the total necrosis of pancreas, massive hemorrhage into interlobular and intralobular interstitial tissue and development of duodenitis with expressed dystrophic changes of epithelial structures and glands and with high mortality of experimental animals.

Key words: pancreonecrosis, trypsin, duodenum, white Wistar Rat

Актуальность исследуемой проблемы обусловлена высокой частотой встречаемости и тяжестью течения геморрагического панкреонекроза. Летальность сохраняется на уровне 10-15%, достигая при деструктивных формах 30-40% [1-3, 9]. Острый панкреатит (ОП) является полиэтиологическим заболеванием. В зависимости от ферментативного спектра ацинарного секрета развивается протеолиз с формированием геморрагического панкреонекроза (при активации протеолитического фермента – трипсина), либо вследствие активации липолитических ферментов (липазы, фосфолипазы) формируется жировой панкреонекроз. Возможно сочетание обоих типов некротического процесса – смешанный панкреонекроз [6-8]. Трипсину, одному из главных ферментов поджелудочной железы (ПЖ), отводят роль стартера всей эстеропротеазной системы [4]. Среди факторов, которые вызывают данный патологический процесс, лидирующее положение занимает нарушение микроциркуляции, блокады печеночно-поджелудочной ампулы и главного панкреатического протока. В развитии ОП существенное значение отводится токсико-аллергическим воздействиям и инфекциям.

Основной эффект повреждения ПЖ при введении трипсина достигается за счет повышенной активации зимогенных гидролаз или дезинтеграции мембран фосфолипазой и активации зимогенов под действием лизосомальных ферментов [12].

Одной из важнейших характеристик ОП является то, что он протекает не только с характерными поражениями ПЖ, но и комплексом местных и системных поражений, особенно органов гепатопанкреатодуоденальной зоны [5]. Варианты морфогенеза варьируют от выявленных микроскопически очагов некроза и интерстициального отека до макроскопически регистрируемых областей некроза ПЖ и забрюшинной клетчатки с различными геморрагическими осложнениями [10, 11]. Имеются лишь единичные исследования, в которых анализируются морфофункциональные нарушения органов панкреатодуоденальной зоны при ОП. Значительно меньше внимания уделяется оценке репаративных и компенсаторно-приспособительных реакций разных структурно-функциональных компарментов ПЖ при развитии выраженных деструктивных поражений. Одной из причин этого является отсутствие хорошо воспроизводимых моделей панкреонекроза, которые моделировали бы наиболее распространенные формы этого заболевания у людей.

Цель исследования – изучить особенности морфогенеза органов панкреатодуоденальной зоны при экспериментальном ОП, индуцированном введением трипсина.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 141 крысе линии «Вистар» массой 200-250 г. Содержание и обращение

с животными выполнялось с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации.

Создавалась модель острого экспериментального панкреатита путем введения раствора активного кристаллического трипсина (100 мг/кг), растворенного в 1 мл дистиллированной воды, в ткань ПЖ по ходу общего желчного протока и область хвоста ПЖ. Проводили наблюдение при открытом животе. Летальность составила 97,8% (погибло 138 из 141). Создание модели проводилось с учетом трех основных патогенетических факторов (нарушение микроциркуляции, протоковой гипертензии и активации трипсина). Этапы развития ОП оценивали по данным осмотра и морфологическим исследованиям. Всем животным выполняли релапаротомию для регистрации характера изменений в органах панкреатодуоденальной зоны.

Образцы ПЖ, двенадцатиперстной кишки (ДПК), печени фиксировали в 10% нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином с постановкой реакции Перлса. Для получения полутонких и ультратонких срезов образцы ткани фиксировали в 4% параформальдегиде, постфиксировали в четырехокиси осмия, заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали азуром 2. Исследования проводили в универсальном микроскопе «Leica DM 4000B».

Результаты и их обсуждение

При проведении эксперимента отмечено, что через 1-1,5 мин. после инъекции препарата развился местный серозный отек ткани ПЖ, затем, еще через 1,5 мин. наблюдалась геморрагическая имбибиция. Одновременно с этими изменениями в ПЖ развивалась очаговая гиперемия (до 1 см в диаметре) стенки ДПК, в дальнейшем, через 8-10 мин. – гиперемия с участками кровоизлияний в области брыжейки и стенок поперечно-ободочной и слепой кишок. Через 15-20 мин. в брюшной полости появлялся и прогрессивно нарастал геморрагический выпот с активностью α -амилазы до 1400-2000 ЕД (при норме 22 ЕД). Видимые изменения в печени появлялись через 15-20 мин. от начала эксперимента и заключались в изменении цвета органа до темно-фиолетового. Через 30 мин. после инъекции трипсина в ткань ПЖ регистрировались множественные локальные кровоизлияния (1-2 см в диаметре) в стенке тонкой кишки на всем протяжении. ПЖ к этому времени изменяла цвет от ярко-красного (вследствие геморрагической имбибиции ткани) до черного, а отдельные участки печени принимали черно-фиолетовую окраску. Значительно усиливались некробиотические процессы как в стенке ДПК, так и в стенках толстой и тонкой кишок, приобретая характер некроза. Страдало общее состояние животных: вначале нарастала одышка, а затем дыхание становилось все

более редким. Через 3-4 часа от начала эксперимента констатировали первые случаи гибели животных. При вскрытии в плевральных полостях отмечено небольшое количество жидкости серозно-геморрагического характера. На плевре, особенно слева, определяли точечные кровоизлияния, паренхима легких была пропитана кровью. Перикард был темно-серого цвета, тусклый, ткань мышцы сердца выглядела темнее, чем в норме.

При светооптическом изучении препаратов ПЖ через 1 час развития ОП определялось расширение выводящих протоков и переполнение их гранулами зимогена. В стенках протоков были деструктивные изменения, клетки эпителиальной выстилки уплощались и дегенерировали (рис. 1). В мелких протоках встречались дивертикулы с некрозом стенки. Процесс распространялся по ходу перегородок и захватывал дольки вокруг крупных протоков. Некоторые ацинусы были переполнены гранулами зимогена, ядра клеток смещены к базальной части, которая постепенно утрачивала базофильную окраску. В разрушающихся ацинусах было мало гранул и отчетливо выявлялась базальная часть клеток. Ядра в этих клетках фрагментировались, лизировались и превращались в базофильно окрашенные тени. Под капсулой и в интерстициональной ткани скапливались фибрин и лейкоциты. Отмечались значительные нарушения кровообращения, что выражалось полнокровием железы, стазом и тромбозом в мелких сосудах. Около сосудов скапливались полиморфно-ядерные лейкоциты, наблюдался выраженный лимфостаз. В патологический процесс вовлекались панкреатические островки, что выражалось в их резком полнокровии и отеке. Отмечался также сильный отек миелиновых нервных волокон, проходящих в ткани ПЖ (рис. 2).

Через 2 часа указанные изменения усиливались. В паренхиме ПЖ встречались небольшие скопления лейкоцитов. Наблюдалась очаги некрозов ацинусов.

Через 3 часа протоки расширялись и были заполнены зимогеном. Их эпителий уплощался. Все дольки были разделены экссудатом и содержали фибрин и лейкоциты. Ацинусы были почти лишены гранул зимогена. Встречалось много полей некроза с массивными кровоизлияниями. Резко преобладал геморрагический компонент. В сосудах отмечались явления стаза с гемолизом эритроцитов.

Через 4-6 часов протоки оставались расширенными, но иногда встречалось их частичное запустевание. Вокруг протоков отмечался отек, кровоизлияния и очаги некроза. Клетки эпителия протоков дегенерировали и нарушалась непрерывность эпителиального пласта стенок протоков. Более мелкие из них через дефект в стенке соединялись с очагами некроза (рис. 3). Встречался некроз всех слоев стенки, просвет протоков выполнен белковыми пробками. Базальная часть сохранившихся клеток плохо выявлялась. Панкреатические островки отечные, часть из них дегенери-



Рис. 1. Поджелудочная железа. Деструкция выводного протока, полиморфно-ядерные лейкоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

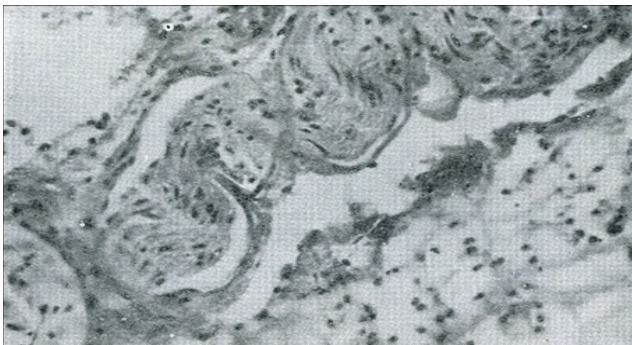


Рис. 2. Поджелудочная железа через 1 час от начала заболевания. Отек миелинового нервного волокна. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

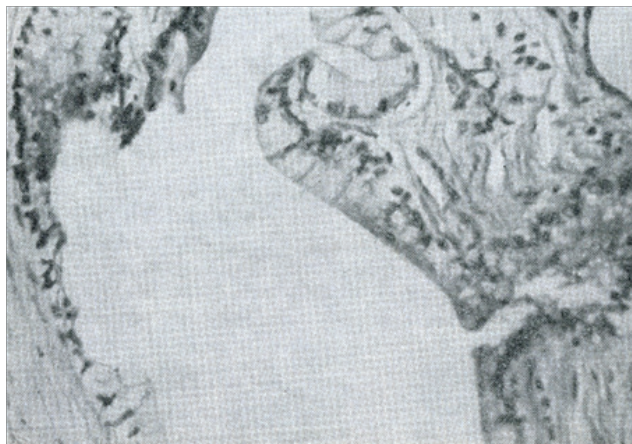


Рис. 3. Поджелудочная железа через 6 часов от начала заболевания. Дефект в стенке протока, очаги некроза вокруг протока. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

рованы. Спустя 9-12 часов структура протоков плохо выявлялась. В интерстициальной ткани видны кровоизлияния, лейкоцитарная инфильтрация, фибрин.

Повсеместно определялись очаги некроза паренхимы. Многие ацинусы запустевали и не продуцировали секрет. Сосуды расширены, в капиллярах стаз крови и венозное полнокровие железистой ткани с обширными кровоизлияниями. Встречались участки

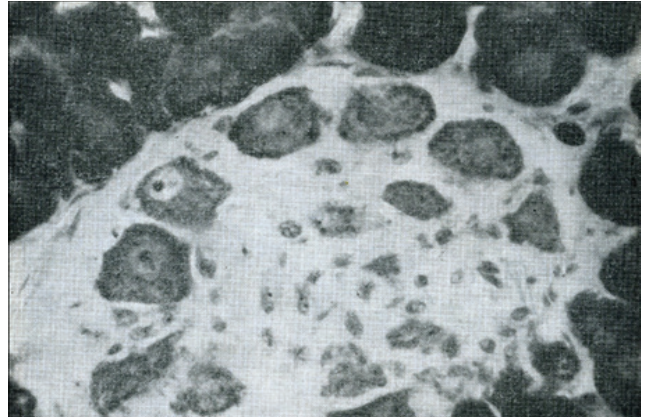


Рис. 4. Поджелудочная железа через 18 часов от начала заболевания. Отек и полнокровие нервного узла. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

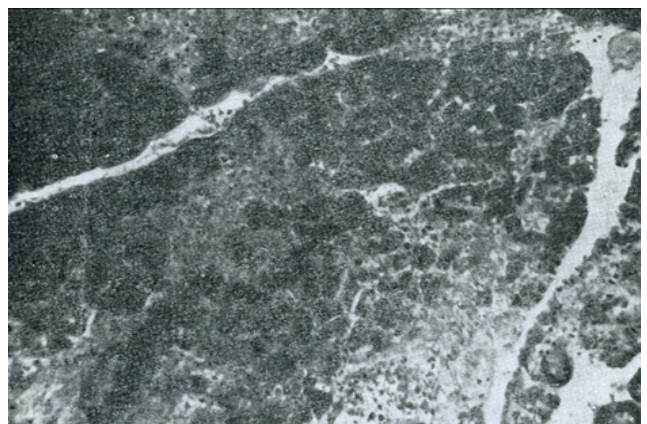


Рис. 5. Поджелудочная железа через 24 часа от начала заболевания. Обширные очаги некроза. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 200.

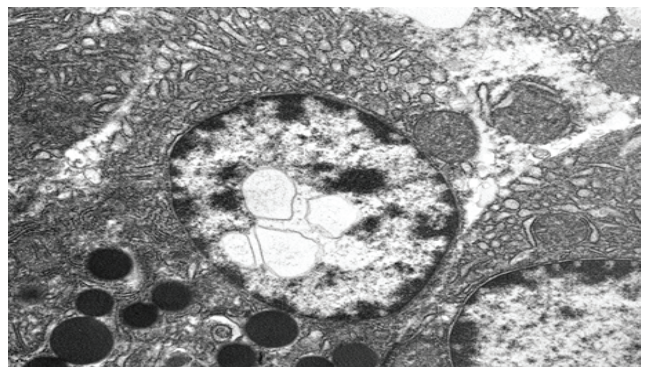


Рис. 6. Поджелудочная железа. 1-е сутки от начала эксперимента. Появление вакуолей в нуклеоплазме. Повреждение цитоплазматической мембраны. Электронограмма. Ув. 15000.

венозного тромбоза. Панкреатические островки резко полнокровны, отечны; происходил пикноз ядер и разрушение клеток.

Через 18-21 час отек резко нарастал, наблюдалось очаговое гнойное пропитывание ПЖ. Вокруг ацинусов виден выраженный лейкоцитарный вал. В процесс вовлекалась нервная ткань: нервные узлы и волокна отечны и резко полнокровны (рис. 4).

Через 1 сутки от начала развития ОП вся интерстициальная ткань пропитана кровью. Экссудат содержал фибрин и полиморфно-ядерные лейкоциты, иногда встречались микроабсцессы. В паренхиме обширные очаги некроза (рис. 5). Многие клетки имели резко пикнотические ядра, в них практически отсутствовала пиронифилия базальной части цитоплазмы. Внутриорганный циркуляция крови резко нарушена. Отмечались значительные поражения сосудистой стенки. Сохранившиеся ацинусы окружены расширенными капиллярами.

Результаты морфологических исследований свидетельствовали о том, что процесс в органе начинался с поражения стенок протоков. Развивался отек стромы, под капсулой и в межацинарных соединительнотканых прослойках появлялся фибрин. В процесс вовлекались ацинусы, клеточные мембраны которых разрушались. Одновременно поражались сосуды ПЖ, в первую очередь, вены. Отмечалась лейкоцитарная инфильтрация и обширные кровоизлияния. Следовательно, прослеживались все фазы патологического процесса: отек, геморрагия и некроз. ОП развивается настолько быстро, что уже через 1 час встречались мелкоочаговые некрозы паренхимы. В органе снижалась секреция пищеварительных ферментов, что выражалось в уменьшении содержания гранул зимогена в ацинусах. Дальнейшее снижение биосинтетической функции обусловлено некрозом и некробиозом ПЖ.

При ультраструктурном исследовании ацинозных клеток ПЖ, проведенное на ранних этапах развития ОП, показало, что в первую очередь повреждаются мембранные структуры. Происходит разрыхление базальной мембраны, исчезают рибосомы на обширных участках эндоплазматической сети. Изменяется соотношение свободных и связанных с мембранами рибосом, обусловленное уменьшением количества последних, появление вакуолей в нуклеоплазме (рис. 6). Это свидетельствует о снижении белоксинтезирующей функции ацинозной клетки уже на ранних этапах развития ОП. Отмечаются фрагментация мембран эндоплазматической сети, набухание митохондрий. Ультраструктурные изменения секреторных клеток ПЖ подтверждают раннее вовлечение энергопродуцирующих и белоксинтезирующих систем клетки в развитие патологического процесса.

Слизистая оболочка ДПК через сутки после начала эксперимента выглядела неоднородной. Встречались участки неизменной слизистой оболочки с сохранившимися ворсинками или же ворсинки были деформированы и распределялись по поверхности слизистой неравномерно. Эпителиальная выстилка сохраняла дифференцировку, каемчатый эпителий и бокаловидные клетки выглядели несколько уплощенными. В других наблюдениях отмечались дистрофические изменения эпителиоцитов, часть клеток имела признаки деструкции вплоть до некроза. В цитоплазме эпителиоцитов отмечалось появление липидных

капель различных размеров с преимущественной локализацией в базальной части клетки, а также скопление липидов в собственной пластинке слизистой оболочки. На отдельных участках эпителиальный слой отслаивался, при этом рядом, как правило, наблюдался активный трансэпителиальный диapedез лимфоцитов и эозинофилов. Просветы крипт неравномерно расширены, деформированы. В крипах скапливалось слизистое отделяемое и клеточный детрит.

Собственная пластинка слизистой оболочки была инфильтрирована полиморфноядерными клетками с преобладанием лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток и эозинофилов. При накоплении мелких липидных капель происходило их слияние между собой. Здесь же встречались небольшие диapedезные кровоизлияния, локализовавшиеся чаще всего в апикальной части ворсинок.

На других участках среди патологических изменений преобладал некроз, а некротически измененные ткани иногда достигали мышечной оболочки. Часто на этом фоне встречалось небольшое количество крипт с деформированными просветами, сохранялись участки интенсивной воспалительно-клеточной инфильтрации, иногда скопления лимфоидных клеток, соответствующие лимфоидным образованиям стенки ДПК. Лимфоидные образования подслизистой оболочки выглядели опустошенными за счет формирования расширенных герминативных центров и уменьшения общего количества лимфоцитов. Просветы сосудов подслизистой оболочки расширены, оптически прозрачны или содержат небольшое количество эритроцитов, в некоторых из них формировались эритроцитарные тромбы. Просветы единичных вен переполнены эритроцитами. Прослеживался периваскулярный отек.

Слизистая оболочка ДПК на 2-е сутки от начала эксперимента характеризовалась неравномерным распределением ворсинок, изменением их формы и упорядоченного расположения. Клетки выстилающего каемчатого эпителия сохранены, только на апикальной поверхности ворсинок прослеживалась их десква-

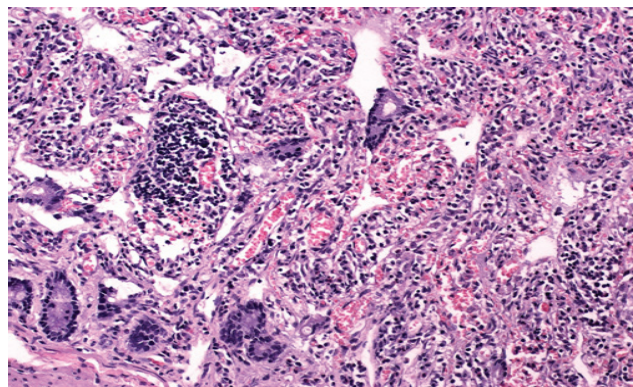


Рис. 7. Двенадцатиперстная кишка. 1-е сутки от начала эксперимента. Некроз, кровоизлияния и воспалительно-клеточная инфильтрация слизистой оболочки. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100.

мация. Интенсивный транэпителиальный диapedез мононуклеаров встречался на протяжении всего эпителиального слоя. Собственная пластинка слизистой оболочки отечна, интенсивно инфильтрирована лимфоцитами, макрофагами, плазматическими клетками и эозинофилами. Капилляры переполнены эритроцитами, встречались диapedезные кровоизлияния. В отдельных криптах прослеживались дистрофические изменения эпителиоцитов, а также некроз части клеток. Подслизистая оболочка полнокровна, отечна. Артериальные сосуды спазмированы, выражен периваскулярный отек.

При ультраструктурном исследовании слизистой оболочки ДПК ворсинки каемчатого эпителия сохранялись на значительном протяжении, при этом в цитоплазме клеток изменения были неоднородными. В отдельных клетках уменьшалась осмиофильность цитоплазматического матрикса за счет внутриклеточного отека. Ядра клеток также выглядели просветленными, контуры ядерной мембраны прослеживались нечетко. В единичных клетках ядра становились мелкими, уплощенными, темными. Митохондрии крупные, удлинённые с гиперхромным матриксом и упорядоченным расположением крипт, много рибосом и канальцев эндоплазматического ретикулима (рис. 8). Встречались интраплазматические вакуоли с фрагментами органелл и миелиновыми фигурами.

Межклеточные контакты сохранялись. В бокаловидных клетках секреторные гранулы были неоднородными и различались по своим размерам.

Наибольшие деструктивные изменения энтероцитов обнаружены в непосредственной близости от базальной мембраны. Часть энтероцитов характеризовалась формированием в цитоплазме крупных вакуолей с мелкозернистым содержимым, располагавшимся неравномерно. Здесь же встречались крупные миелиновые фигуры, набухшие осмиофильные митохондрии с деструкцией крист. Базальная мембрана выглядела неравномерно уплощенной, отечной. Среди клеток инфильтрата собственной пластинки слизистой оболочки дифференцировались эозинофилы и лимфоциты.

Таким образом, при введении трипсина в ткань ПЖ возникает гемодинамический шок с развитием сосудистого коллапса. Некробиотический процесс развивается не только в ПЖ и ДПК, печени, но и в других органах. На данной модели показана динамика развития прогрессирующего геморрагического панкреонекроза с вовлечением всех висцеральных органов и высокой летальностью при проведении светооптического и электронно-микроскопического исследования.

Список литературы

1. Афанасьев А.Н., Кириллин А.В., Шалыгин А.Б., Смыслов И.Н. Оценка результатов хирургического лечения острого деструктивного панкреатита. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2010; III: 4: 308-316.
2. Байчоров Э.Х., Макушкин Р.З., Байрамуков Р.Р., Оганесян А.В. Этапность оказания хирургической помощи при остром деструктивном панкреатите. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2010; III: 4: 323-326.

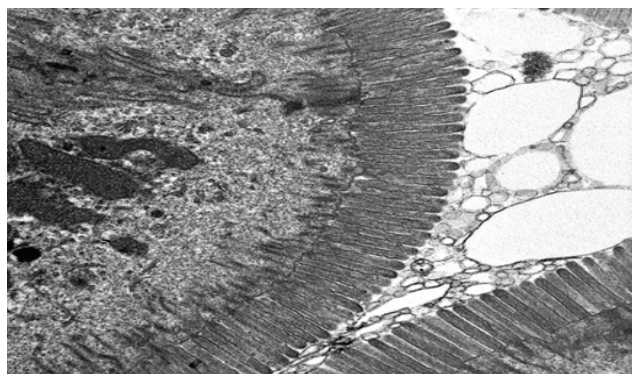


Рис. 8. Двенадцатиперстная кишка. 1-е сутки от начала эксперимента. Апоикальная часть каемчатых эпителиоцитов не изменена. В цитоплазме много канальцев эндоплазматической сети и митохондрий. Электронограмма. Ув. 20000.

Можно считать доказанным, что главным фактором полиорганного поражения является первичная аутоферментная агрессия с повреждением ПЖ и последующим развитием неуправляемого протеолиза, в котором трипсин играет одну из главных ролей.

Выводы

1. Патоморфогенез экспериментального панкреонекроза после введения трипсина сопровождается возникновением некроза части ацинусов, дистрофией, некрозом ацинарных клеток, сопровождавшихся утратой полярности ацинарных клеток и их функциональной недостаточностью.
2. Ультраструктурные изменения секреторных клеток ПЖ подтверждают раннее вовлечение энергопродуцирующих и белоксинтезирующих систем клетки в развитии патологического процесса.
3. Исследование ДПК показало наличие воспалительного процесса, сопровождающегося развитием воспалительно-клеточной инфильтрации, нарушения кровообращения с развитием геморрагического синдрома и выраженными изменениями органелл клетки.
4. Проведенные экспериментальные исследования позволяют рассматривать острый геморрагический панкреатит как синдром панкреатогенной агрессии, обуславливающий множественные поражения висцеральных органов и кровеносных сосудов, изменяющих реологические свойства и свертывающую систему крови. В связи с этим, основные усилия при лечении геморрагического панкреатита должны быть направлены на купирование энзимной токсемии и прерывание лавинообразного протеолиза.

3. Вискунов В.Г. Панкреонекрозы. Новосибирск 2000; 136.
4. Вискунов В.Г., Пупышев А.Б., Проценко С.И. и др. Бюл. СО РАМН 2008; 6:17-21.
5. Луцевич Э.В., Челленко Г.В. Поджелудочная железа как одна из мишеней «аутоферментного взрыва» при панкреатите. Хирургия 2001; 9: 57-60.
6. Мешалкин Е.Н., Сергиевский С.С., Сувернев А.В. и др. Трипсинемия в реакциях организма на повреждение. Новосибирск: Наука 1982; 232.
7. Нестеренко Ю.А., Шаповольянец С.Г., Лаптев В.В. Панкреонекроз. М. 1994; 194.
8. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Панкреонекрозы. М. 2008; 196.
9. Чернов В.Н., Бойко А.А. Тактика лечения больных острым панкреатитом в зависимости от степени выраженности эндотоксикоза. Вестник экспериментальной и клинической хирургии 2009; 2: 4: 272-276.
10. Chan Y.C., Leunl P.S. Acute pancreatitis: Animal models and recent advances in basic research. Pancreas 2007; 34; 1: 1-14.
11. Frossard J.L., Pastor C.M. Experimental acute pancreatitis: new insights into the pathophysiology. Front. Biosci 2002; 7: 275-287.
12. Van Acker G.J., Perides G., Steer M.L. Colocalization hypothesis: a mechanism for the intrapancreatic activation of digestive enzymes during the early phases of acute pancreatitis. World J. Gastroenterol. 2006; 12(13): 1985-1990.

Поступила 04.10.2010 г.

Информация об авторах

1. Проценко Светлана Ивановна – к.м.н., врач-хирург городской поликлиники №18 г. Новосибирска; e-mail: svetlana-procenko@mail.ru
2. Вискунов Владимир Георгиевич – д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней ФПК и ППВ Новосибирского государственного медицинского университета; e-mail: Vladimir.Viskunov@yadex.ru
3. Асатрян Аршак Арутюнович – аспирант НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН; e-mail: Arshak 198282@mail.ru