

Морфологические изменения поджелудочной железы при остром экспериментальном панкреатите и при применении комплекса «сандостатин и антисыворотка к змеиному яду гадюки обыкновенной» С.И.ПРОЦЕНКО, В.Г.ВИСКУНОВ, А.П.НАДЕЕВ, В.Н.ФЕДОРЕНКО

Morphological changes of the pancreas in acute pancreatitis experimentally and the application of complex «sandostatin and antiserum to snake venom Vipera berus» S.I.PROTSENKO, V.G.VISKUNOV, A.P.NADEEV, V.N.FEDORENKO

Новосибирский государственный медицинский университет; НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН, г. Новосибирск

Исследовали морфологические изменения в поджелудочной железе крыс при остром экспериментальном панкреатите, индуцированном змеиным ядом гадюки обыкновенной и фосфолипазой А2, и при применении комплекса «сандостатин и антисыворотка к змеиному яду». Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности комплекса «сандостатин и антисыворотка к змеиному яду», проявившейся отсутствием летальности животных, панкреонекроза при использовании меньших доз сандостатина и антисыворотки к змеиному яду.

Ключевые слова: острый панкреатит, сандостатин, антисыворотка к змеиному яду, крысы

Studied the morphological changes in the pancreas of rats with acute experimental pancreatitis induced by the second Vipera berus snake venom and phospholipase A2, and if the instrument is complex sandostatin and antiserum to snake venom. These results demonstrate the high efficiency of complex «sandostatin and antiserum to snake venom» as evidenced in the absence of animals mortality, pancreatic necrosis using smaller doses of sandostatin and antiserum to snake venom.

Key words: acute pancreatitis, sandostatin, antiserum to the snake venom, rat

Во второй половине XX века количество больных острым панкреатитом во всем мире возросло в 2,5-3 раза [6]. Острый панкреатит занимает 3-е место в структуре острых хирургических заболеваний после аппендицита и холецистита, его частота достигает 16% [4]. Деструктивные формы с молниеносным течением составляют 5,2-30% от всех больных острым панкреатитом, а послеоперационная летальность – от 17,5% до 100% [5, 6].

Панкреонекроз является распространенным осложнением острого панкреатита. Выраженность панкреонекроза варьирует от выявленных микроскопически очагов некроза и интерстициального отека до макроскопически регистрируемых областей некроза поджелудочной железы (ПЖ) и забрюшинной клетчатки в сочетании с различными геморрагическими осложнениями. В зависимости от ферментного спектра ацинарного секрета развивается либо протеолиз с формированием геморрагического отека с последующим аутолизом ткани и развитием геморрагического (колликвационного) некроза, либо, вследствие активации липолитических ферментов, формируется жировой (коагуляционный) некроз. Возможно сочетание обоих типов – смешанный панкреонекроз [6, 7].

Результаты лечения острого панкреатита остаются малоутешительными [1, 6], а его эффективность зависит от целенаправленной этиотропной и патогенетической терапии [1].

Известно, что имеется сходство химического состава и основных эффектов действия сока ПЖ, трипсина и змеиного яда [2]. Впервые возможность лечения острого экспериментального панкреатита (ОЭП) с помощью антисыворотки (АС) к змеиному яду была показана достаточно давно [2]. Действующими факторами АС являются антитела к белковым компонентам яда, что практически полностью устраняет его фосфолипазную активность [12].

Сандостатин – длительно действующий (8-12 часов) синтетический октапептид, являющийся производным человеческого гормона соматостатина. Доказано, что сандостатин вызывает интенсивное торможение желудочной секреции, повышая при этом pH желудочного сока до 7,0-7,5; блокирует захват ацинарными клетками аминокислот из плазмы, что приводит к снижению аккумуляции в них ферментов, уменьшает патологическую реакцию сосудистой системы на трипсинемии, вследствие угнетения им синтеза

вазоактивных пептидов и аминов, что приводит к снижению гиперкоагуляции. Он улучшает все показатели тромбоэластограммы [1]. Сандостатин вызывает выраженное (на 50-80%) угнетение продукции желчи, что уменьшает давление в общем желчном протоке и опасность ее заброса в проток ПЖ – фактора, приводящего к развитию острого панкреатита [2].

Цель исследования – морфологическая оценка эффективности комплекса «сандостатин и антисыворотка к змеиному яду» при лечении острого экспериментального панкреатита, индуцируемого змеиным ядом и фосфолипазой А2.

Материал и методы

Исследование проведено на белых крысах-самцах линии Вистар, массой 200-250 г. Животных разделили на 8 групп, по 21 животному в каждой. Животным 1, 3, 5 и 7-й групп моделировали ОЭП путем введения по ходу общего панкреатобилиарного протока, со стороны его вхождения в двенадцатиперстную кишку, в головку и хвост ПЖ раствора яда гадюки обыкновенной (*Vipera berus*) (ООО «Сибирский серпентарий», Россия) в концентрации 0,1 мг/мл в дозе 1мг/кг. Животным 2, 4, 6 и 8-й групп вводили аналогичным образом раствор фосфолипазы А2 в 1 мл дистиллированной воды по 0,5 мл из расчета 5мг/кг. (Е.С. – 3.1.4. из яда змеи *Naja naja Oxiana*, Эстония). Животным 3 и 4-й групп с ОЭП, развившимся, соответственно, после введения змеиного яда и фосфолипазы, внутрибрюшинно вводили сандостатин («Новартис Фарма», Россия) в дозе 0,35 мг/кг. Препарат вводили вскоре после геморрагического пропитывания ткани ПЖ, через 5-7 минут после инициации панкреатита токсинами. В 5-6-й группах животным с ОЭП, индуцированным змеиным ядом и фосфолипазой А2, вводили лошадиную сыворотку против яда гадюки обыкновенной (АС) (НПО «Микроген», Россия), внутрибрюшинно, в максимальной дозе 500 АЕ/кг. Животным 7-8-й групп с ОЭП, индуцированным змеиным ядом и фосфолипазой А2, вводили комплекс «сандостатина и АС» (НПО «Микроген», Россия), внутрибрюшинно, с инъекцией сандостатина в дозе 0,15 мг/кг и АС к змеиному яду в дозе 160АЕ/кг.

В течение 3 часов следили за морфологическими изменениями ПЖ, затем брюшную полость зашивали и животных возвращали в клетку. Через 24 часа оценивали летальность животных. У выживших крыс забирали материал для морфологического исследования. Животных выводили из

эксперимента путем декапитации под эфирным наркозом. Образцы ПЖ фиксировали в 10% водном растворе формалина, обезжизивали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином [3].

Результаты и их обсуждение

У животных 1-й (введение змеиного яда) группы в течение 3 часов наблюдения геморрагии охватили ПЖ на всем ее протяжении, и к концу 3-го часа ПЖ приобретала черную окраску. Через 24 часа летальность животных при введении змеиного яда (1-я группа) составила 80,9%. При микроскопическом исследовании через 24 часа в ПЖ у животных 1-й группы наблюдали полнокровие, очаги кровоизлияния, отек, обширные некрозы ткани.

У животных 2-й группы (фосфолипаза А2) в течение первых 10-15 минут наблюдения в ПЖ развивался серозный отек в месте инъекции препарата, затем присоединился геморрагический компонент в виде очага гиперемии до 0,5 см желеобразной консистенции, а через 1 час желеобразный студенистый отек малиновой окраски занимал всю поверхность головки и хвоста ПЖ. Через 1,5 часа отметили уменьшение геморрагической имбибиции ПЖ. К концу 3-го часа ПЖ была слабо-малиновой окраски, студенистой консистенции. Через 24 часа все животные были живы. При гистологическом исследовании в ПЖ выявляли выраженный диффузный отек стромы с нейтрофильной инфильтрацией, очагами некроза ацинарной части, фокусами гнойного расплавления, расширением протоков.

Таким образом, у животных 1-й группы (ОЭП после змеиного яда) патологический процесс развивался по типу геморрагического панкреонекроза. 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, обуславливающих геморрагический эффект [8, 10], который может рассматриваться как обязательный в процессе повреждения ПЖ змеиным ядом. При этом геморрагический компонент сопутствует необратимому течению повреждения ПЖ. При развитии ОЭП, важнейшей составляющей змеиного яда, по видимому, является фосфолипаза А2 в комплексе

с цитокинами [9]. Фермент повреждает клеточные мембраны, позволяет лизосомальным катаинам атаковать зимогены и активировать патологически важные ферменты. Также известно, что чем больше активность фосфолипазы А2 в змеином яде, тем выше летальность при его действии. У животных 2-й группы с ОЭП, вызванным фосфолипазой А2, процесс развивался по типу жирового панкреонекроза с выраженной воспалительной клеточной реакцией и слабым геморрагическим компонентом. Эндогенная фосфолипаза А2, по видимому, является центральным ферментом в индукции некроза ацинарных клеток [11].

При введении сандостатина животным 3-й группы (ОЭП, индуцированный змеиным ядом) в течение 1-го часа после инъекции яда наблюдали геморрагическое пропитывание ПЖ с тенденцией к увеличению интенсивности окраски и размеров очагов гиперемии, но отсутствовали признаки некроза ПЖ. К концу 3-го часа состояние животных стабилизировалось, в сравнении с животными 1-й группы, локальная гиперемия ПЖ уменьшилась. Через 24 часа летальность животных составила 14,3%. В ПЖ, в месте введения яда, наблюдали инфильтрат дисковидной формы с наличием единичных кровоизлияний, остальная часть была бледно-серого цвета, слегка инфильтрирована. При микроскопическом исследовании отмечали сохранение архитектоники ПЖ, но при этом наблюдали полнокрое, отек стромы, участки дистрофических измененных ацинарных клеток, диффузную воспалительную инфильтрацию стромы, состоящую преимущественно из нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов. Таким образом, применение сандостатина оказывало выраженный противовоспалительный эффект в ПЖ, снижало смертность животных в 5,5 раз, устраняло некроз клеток.

При применении сандостатина у животных 4-й группы (ОЭП, индуцированный фосфолипазой), развитие изменений ПЖ происходило в той же последовательности, что и у животных 2-й группы, но значительно медленнее. В течение 75 минут наблюдали серозный отек ПЖ в области головки и хвоста, затем в месте инъекции препарата появлялось малиновое пятно желеобразной консистенции. К концу 3 часа в области головки и хвоста ПЖ наблюдали единичные стеариновые бляшки. Через 24 часа все животные были живыми. При макроскопическом исследовании через 24 часа наблюдали незначительный отек ПЖ и мелкие абсцессы в области головки ПЖ. Микроскопи-

чески в ПЖ отмечали полнокрое и отек стромы с диффузной инфильтрацией нейтрофилами с образованием абсцессов, макрофагами. Таким образом, использование сандостатина уменьшает развитие воспалительного процесса и предотвращает некроз ткани ПЖ.

У животных 5-й группы (ОЭП, вызванный змеиным ядом) введение АС существенным образом подавляло геморрагическое пропитывание ПЖ. К концу 3-го часа патологические изменения в ПЖ регрессировали. Через 24 часа все крысы были живыми и активными. В ПЖ в области инъекции яда сохранялся инфильтрат с редкими точечными кровоизлияниями. При микроскопическом исследовании в ПЖ отмечали участки дистрофически измененных клеток, интерстициальный отек, очаги некроза отсутствовали.

После введения АС животным 6-й группы (ОЭП, индуцированный фосфолипазой А2), развитие патологического процесса в ПЖ значительно медленнее, в сравнении с животными 2-й группы. Геморрагический компонент в ПЖ был слабо выражен, наблюдали единичные микроабсцессы и жировые бляшки. Через 24 часа все животные были живы. В ПЖ сохранялся серозный отек в области головки и хвоста ПЖ. Гистологически в ПЖ выявляли отек стромы с диффузной инфильтрацией нейтрофилами с примесью макрофагов, в капсуле – фибрин, инфильтрированный нейтрофилами. Таким образом, применение АС при ОЭП, индуцированного как змеиным ядом, так и фосфолипазой А2, оказывало выраженный противовоспалительный эффект с отсутствием признаков некроза ПЖ.

Изучение эффективности комплекса «сандостатин и АС» (сандостатин в дозе 0,15 мг/кг и АС к змеиному яду в дозе 160 АЕ/кг) при введении животным с ОЭП, индуцированным змеиным ядом (7-я группа) и фосфолипазой (8-я группа), показало наилучшие результаты как через 3 часа, так и через 24 часа. При морфологическом исследовании в ПЖ наблюдали незначительный отек; отсутствовали стеариновые бляшки, микроабсцессы. При гистологическом исследовании ПЖ через 24 часа отмечали отек стромы с диффузной слабовыраженной инфильтрацией нейтрофилами, мелкие очаги дистрофии ацинарных клеток. Таким образом, комплекс «сандостатин-АС» был наиболее эффективен, так как, наряду с выраженным противовоспалительным эффектом, позволял уменьшить эффективную дозу АС в 3 раза, а сандостатин – более, чем в 2 раза.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности комплекса «сандостатин и АС к змеиному яду», проявившейся отсутствием летальности животных, панкреонекроза

и уменьшением выраженности воспалительных проявлений в ПЖ при использовании в комплексе меньших доз сандостатина и антисыворотки к змеиному яду.

Список литературы

1. Брискин Б.С., Титова Г.П., Рыбаков Г.С. и др. Экспериментально-клиническое обоснование эффективности применения сандостатина (октреотида) у больных панкреонекрозом. *Анналы хирургической гепатологии* 2001; 6, 123-130.
2. Двиганинова Н.А., Вискунов В.Г. Тайна панкреатической драмы. Новосибирск «Междуречье» 2009; 196.
3. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. Микроскопическая техника М. Медицина 1996; 544.
4. Подолян С.А., Андреев О.В. Материалы IX Всероссийского хирургов. Волгоград 2000; 96-97.
5. Пугаев А.В., Волков В.С., Григорина-Рябова Т.В. и др. Материалы IX Всероссийского съезда хирургов. Волгоград 2000; 98-99.
6. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З. Материалы IX Всероссийского съезда хирургов. Волгоград 2000; 111-112.
7. Толстой А.Д., Панов В.П., Краснорогов В.В. и др. Паранекротит. СПб 2003; 255.
8. 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; 40, 1. 63-68.
9. Camey K.U., Velarde D.T., Sanchez E.F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon* 2002; 40, 5, 501-509.
10. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* 2000; 1477, 1. 146-156.
11. Mossner 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; 27, 1, 29-38.
12. Rojas E., Quesada L., Arce V. et al. Neutralization of four Peruvian Bothrops sp. Snake venoms by polyvalent antivenoms produced in Peru and Costa Rica: preclinical assessment. *Acta Trop* 2005; 93, 1, 85-95.

Поступила 11.06.10 г.

Информация об авторах

1. Проценко Светлана Ивановна – кандидат медицинских наук, врач-хирург городской поликлиники № 18 города Новосибирска, e-mail: poliklinika_18@online.sinor.ru
2. Вискунов Владимир Георгиевич – доктор медицинских наук, профессор кафедры хирургических болезней ФПК и ППВ Новосибирского государственного медицинского университета, e-mail: nadeevngma@mail.ru
3. Надеев Александр Петрович – доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета, e-mail: nadeevngma@mail.ru
4. Федоренко Виталий Никитович, врач-хирург, клинический ординатор кафедры факультетской хирургии лечебного факультета Новосибирского государственного медицинского университета, e-mail: sibbasic@gmail.com