

УДК 616.37-002:577,152.344:615.919:57.084

СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ ОРГАНОВ ГЕПАТОПАНКРЕАТОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ ПРИ ЖИРОВОМ И СМЕШАННОМ ПАНКРЕОНЕКРОЗЕ

Бакарев М.А., Непомнящих Л.М., Васильев А.В., Лапий Г.А., Проценко С.И.

*НИИ региональной патологии и патоморфологии СО РАМН,
Новосибирск, e-mail: pathol@soramn.ru*

Экспериментальные патологические процессы, полученные при воспроизведении ведущих патогенетических факторов острого панкреатита (протоковой гипертензии и активации липолитических реакций), носили в различной степени смешанный характер. При перевязке общего желчного протока преобладали черты жирового панкреонекроза – распространяющиеся с периферии ацинусов некробиотические изменения ацинарных клеток с формированием демаркационного вала, очаги некроза междольковой и перипанкреатической жировой ткани. При введении фосфолипазы А2 в ткань поджелудочной железы развивались характерные признаки как жирового, так и геморрагического панкреонекроза – тотальный некроз и расплавление отдельных ацинусов, массивные кровоизлияния в междольковую и внутридольковую интерстициальную ткань. Терапевтический эффект сандостатина при его раннем применении в условиях моделирования острого панкреатита введением фосфолипазы проявлялся в значительном уменьшении распространенности очагов панкреонекроза, снижении гемодинамических расстройств, уменьшении повреждения перипанкреатических органов и тканей, отсутствии летальных исходов.

Ключевые слова: острый панкреатит, поджелудочная железа, перевязка общего желчного протока, фосфолипаза А2, сандостатин (октреотид)

STRUCTURAL REORGANIZATION OF HEPATOPANCREATODUODENAL ZONE IN CHRONIC PANCREATITIS

Bakarev M.A., Nepomnyashchikh L.M., Vasilyev A.V., Lapii G.A., Protsenko S.I.

*Research Institute of Regional Pathology and Pathomorphology SD RAMS,
Novosibirsk, e-mail: pathol@soramn.ru*

Experimental pathological processes induced by simulating pathogenetic factors of acute pancreatitis (ductal hypertension and activation of lipolytic reactions) expressed various amounts of mixed quality in their phenotypes. Common bile duct ligation resulted in the considerable prevalence of the fat pancreonecrotic pattern – necrobiotic changes of acinar cells with demarcation bank spreading from the periphery toward the center of acini, interstitial and peripancreatic foci of fat necrosis. Phospholipase A2 injection produced characteristic features of both fat and hemorrhagic pancreonecrosis – total necrosis and dissolution of isolated acini, massive hemorrhages into the interlobular and intralobular tissue. Sandostatin administration in the early phase of experimental pancreatitis induced by phospholipase injection was followed by substantial reduction of pancreonecrotic foci and hemodynamic disturbances, decreased damage to per pancreatic organs and tissues, absence of lethal outcomes

Keywords: acute pancreatitis, pancreas, common bile duct ligation, phospholipase A2, octreotide

Сложность лечения деструктивного панкреатита связана с тем, что существует несколько этиопатогенетических и клинико-морфологических форм заболевания, определяющих различные, не до конца изученные механизмы его развития [2, 5, 7]. Несмотря на то, что вопрос выделения отдельных клинико-морфологических вариантов до сих пор является дискуссионным [5], патоморфогенетические особенности жирового и геморрагического панкреонекроза, по мнению ряда исследователей, дают основания рассматривать их как самостоятельные морфофункциональные единицы [1, 2, 4]. Классический вариант жирового панкреонекроза связывают с преимущественной активацией ферментов липолиза, под действием которых развивается коагуляционный некроз ацинарной и жировой ткани. Характерные черты геморрагического панкреонекроза (массивные геморрагии, сливающиеся очаги аутолиза ацинарных клеток) ассоциируются с распространенной активацией

трипсина и нарушениями внутриорганный кровообращения [4].

Понимание особенностей некробиотического процесса в поджелудочной железе (ПЖ) необходимо для разработки эффективных методов лечения. В этом отношении большое значение имеет поиск биологически активных агентов, способствующих уменьшению выраженности деструктивных процессов в ПЖ. К числу таких агентов относится сандостатин (октреотид), который эмпирически используется для профилактики и лечения острого панкреатита (ОП), однако отсутствие четких представлений о его влиянии на характер морфологических изменений в ПЖ, а также противоречивые данные клинических исследований [8] сдерживают более широкое применение препарата. Значительным препятствием в изучении патоморфогенетических особенностей деструктивных форм ОП и оценке эффективности новых режимов терапии является трудность получения моделей пан-

креонекроза, которые бы воспроизводили различные формы этого заболевания [11].

Цель исследования – изучить особенности морфогенеза экспериментального панкреонекроза, индуцированного протоковой гипертензией и введением фосфолипазы А₂, и оценить органопротекторный эффект раннего применения сандостатина.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использованы 70 крыс линии Вистар обоего пола, массой тела от 200 до 250 г. Манипуляции с животными проводили с соблюдением требований Европейской конвенции по защите животных (Страсбург, 1986). Во всех экспериментальных группах животным под эфирным наркозом в стерильных условиях производили лапаротомию, выводили в операционную рану двенадцатиперстную кишку (ДПК).

В *1-й серии экспериментов* (20 животных) ОП моделировали путем перевязки шелковой лигатурой общего желчного протока в месте его впадения в просвет ДПК (воспроизводили протоковую гипертензию) [3]; проводили 3-часовое наблюдение при открытом животе, затем живот ушивали и животное помещали в клетку с обычным режимом. Через 24 ч под наркозом выполняли релапаротомию с описанием изменений висцеральных органов и забором материала для патоморфологического исследования.

Во *2-й серии экспериментов* (30 животных) ОП моделировали путем введения в ПЖ раствора фосфолипазы А₂ (Е.С.3.1.4. из яда змеи – *Naja naja oxiana*, Эстония) из расчета 5 мг/кг в 1 мл дистиллированной воды. Фосфолипазу вводили по ходу общего желчного протока со стороны его вхождения в ДПК, а также в хвост ПЖ (по 0,5 мл в каждую зону) [1].

По срокам наблюдения были сформированы 2 подгруппы по 15 крыс в каждой. В 1-й подгруппе в течение 3 ч проводили наблюдение за макроскопическими изменениями при открытой брюшной полости, затем животных выводили из эксперимента путем углубления эфирного наркоза. Во 2-й подгруппе после этапа индукции живот ушивали, животное помещали в клетку с обычным режимом. Через 24 ч у 12 выживших животных (80%) выполняли релапаротомию с забором материала для патоморфологического исследования.

В *3-й серии экспериментов* (20 животных) изучали влияние сандостатина (октреотида) на течение ОП, индуцированного фосфолипазой. Сандостатин («Новаartis Фарма», Россия) вводили из расчета 0,25 мг/кг под брюшину передней брюшной стенки одновременно с введением фосфолипазы; после 3-часового наблюдения живот ушивали. Материал для патоморфологического исследования забирали через сутки.

Образцы ПЖ, ДПК и печени экспериментальных животных фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином в комбинации с реакцией Перлса, по ван Гизону с окраской эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта, ставили ШИК-реакцию. Исследование проводили в универсальном микроскопе LeicaDM 4000B (Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры LeicaDFC 320 (Германия) и компьютерной программы LeicaQWin V3.0.

Образцы ПЖ, предназначенные для изготовления полутонких срезов, фиксировали в 4% растворе параформальдегида, постфиксировали в 1% растворе OsO₄, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, проводили через ацетон и заливали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие срезы окрашивали 1% раствором азура II и реактивом Шиффа.

Результаты исследования и их обсуждение

У животных *1-й серии экспериментов* после перевязки общего желчного протока через 30 мин наблюдения за брюшной полостью развивался незначительный серозный отек ПЖ, который в дальнейшем нарастал, отмечалась умеренная гиперемия и расширение ДПК; печень приобретала темно-вишневый оттенок. Через 24 ч все животные были живы, внешне выглядели активными, но «неряшливыми». При релапаротомии в ряде случаев обнаруживался парапанкреатический инфильтрат, спаечный процесс, затрагивающий ПЖ, большой сальник, поперечно-ободочную кишку. Выпот в брюшной полости носил слабо-геморрагический характер. Большой сальник инфильтрирован, в нем выявлялись многочисленные точечные фолликулы, жировые бляшки.

При патоморфологическом исследовании наблюдался выраженный отек ПЖ со значительным расширением междольковых пространств и субкапсулярной зоны, в которых регистрировались неравномерное полнокровие сосудов, отложения фибрина, плевморрагии, интенсивная воспалительно-клеточная инфильтрация.

Характерной чертой морфологической картины была мозаичность повреждения экзокринного компартмента – очаги некроза и дискомплекса цииацинусов чередовались с зонами их нормального строения. В головке ПЖ архитектура большинства ацинусов сохранялась, очаги некрозов были небольшими, в то время как в хвостовой части некротические изменения носили более обширный характер, в отдельных участках формировались абсцессы. Некроз ацинарных клеток всегда начинался с периферии ацинусов и распространялся к их центру с образованием демаркационного вала из нейтрофилов, при этом некробиотические изменения самих ацинарных клеток по данным полутонких срезов начинались с базальной зоны, где отмечалось появление очагов парциального некроза в виде крупных вакуолей. Важной характеристикой патологического процесса были очаги некроза междольковой жировой клетчатки.

В малоизмененных ацинусах экзокриноциты содержали большое количество секреторных гранул, которые распространя-

лись в том числе и на базальную зону, что могло отражать нарушение их секреции при повышении давления в протоковой системе. Среди переполненных секретом клеток встречались мелкие, более плотные клетки, не содержавшие гранул, а также двуядерные ацинарные клетки, что может свидетельствовать о сохранении регенераторных реакций в экзокринном отделе ПЖ.

Морфологические изменения ДПК заключались в умеренном отеке слизистой оболочки и ее воспалительноклеточной инфильтрации. В составе инфильтрата преобладали мононуклеары, но присутствовали также и нейтрофилы. В печени отмечались неравномерное полнокровие, дистрофические изменения и, в ряде случаев, очаговые некрозы гепатоцитов (преимущественно в субкапсулярных областях печеночных долей, прилежащих к поджелудочной железе). В почках – полнокровие, дистрофические и некробиотические изменения эпителиоцитов почечных канальцев.

Характерной чертой ОП, индуцированного перевязкой общего желчного протока, было развитие тотального или субтотального некроза перипанкреатической жировой клетчатки. Подобные изменения жировой ткани наблюдались и в большом сальнике.

Во 2-й серии экспериментов через 5 мин после введения фосфолипазы А2 наблюдался выраженный серозный отек в области головки и хвоста ПЖ, а также серозный отек и гиперемия начального отдела ДПК циркулярного характера. Через 40 мин желеобразный отек малинового цвета распространялся на весь объем головки и хвоста ПЖ. Диффузный отек ДПК нарастал в дистальном направлении с выраженным парезом начального отдела. Через 1 ч студенисто-розовый отек ПЖ на ограниченном участке приобретал характер геморрагической имбиции. ДПК и тонкая кишка на протяжении 10–12 см диффузно гиперемированы; отмечалось выраженное полнокровие печени и почек. В брюшной полости появлялся умеренный серозный выпот, который в последующем приобретал серозно-геморрагический характер.

Через 3 ч наблюдения макроскопическая картина без выраженной динамики. При микроскопическом исследовании в ПЖ на фоне умеренного междолькового и внутридолькового отека выявлялись мелкоочаговые некрозы ацинусов с демаркационной воспалительноклеточной инфильтрацией. В ДПК слизистая оболочка инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и макрофагами с примесью нейтрофилов. В печени и почках отмечалось полнокровие.

Через 24 ч все выжившие животные (80%) были заторможенными, «неряшливыми», пищу и воду не принимали. При лапаротомии наблюдалась картина ограниченного перитонита по типу парапанкреатического инфильтрата. Большой сальник «подпаян» к ПЖ, передней и боковой стенке живота, покрыт множеством жировых бляшек с наличием фибриновых пленок. Макроскопически ПЖ малиново-розового цвета с участками геморрагической имбиции. ДПК и тонкая кишка на протяжении до 20 см резко гиперемированы, отечны. Поперечно-ободочная кишка на отдельных участках некротизирована. Сохранялось выраженное полнокровие печени и почек.

При патоморфологическом исследовании ПЖ выявлены обширные очаги некроза ацинусов с формированием мелко- и крупноочаговых абсцессов – диффузно-очаговый панкреонекроз. Эти изменения ацинарного компартмента сопровождались значительным отеком междольковой и внутридольковой стромы, отложениями фибрина и диффузной инфильтрацией нейтрофилами с примесью макрофагов. Во многих случаях регистрировались массивные кровоизлияния по типу геморрагической имбиции междольковой и внутридольковой стромы, а также значительные субкапсулярные кровоизлияния.

Некротические изменения ацинарного компартмента были представлены двумя типами очагов. В головке и хвостовой части ПЖ развивался коагуляционный некроз ацинарных клеток, который начинался с периферии ацинусов и распространялся к их центру с формированием демаркационного вала из нейтрофилов. В других участках доминировали процессы аутолиза – ацинарные клетки, подвергавшиеся протеолитическим изменениям, замещались гомогенной массой, в которой охранялись фрагменты нелизированной цитоплазмы, «тени» ядер. Небольшие скопления нейтрофилов, макрофагов и лимфоцитов вокруг таких очагов не носили отчетливого демаркационного характера.

При значительной степени полиморфизма экзокриноциты сохранившихся ацинусов были, как правило, уменьшены в размерах, содержали небольшое количество секреторных гранул в апикальной зоне. Среди мелких ацинарных клеток с оптически плотной цитоплазмой часто встречались двуядерные клетки. Вблизи крупных сосудов и очагов некроза отмечалась дисконфлексация ацинарных клеток, которые не образовывали характерные «розетки», отмечалась их выраженная атрофия и резорбция мононуклеарами.

В двенадцатиперстной кишке сохранялся умеренный отек собственной пластинки и ее умеренная воспалительноклеточная инфильтрация; в печени – неравномерное полнокровие, дистрофические изменения; в почках – некробиотические изменения сосудистых клубочков, эпителиоцитов дистальных и проксимальных канальцев. К существенным характеристикам патологического процесса в данной модели следует отнести развитие гнойного оментита.

В 3-й серии экспериментов через 7–8 мин после введения в ПЖ фосфолипазы А2 и одновременно под брюшину передней брюшной стенки сандостатина отмечали серозный отек ПЖ и ДПК. Через 10 мин появлялась умеренная циркулярная гиперемия ДПК (на протяжении 0,5–1 см). Через 20–25 мин в месте введения фосфолипазы развивался локальный студенистый отек малинового цвета, который через 40 мин распространялся по всей поверхности головки ПЖ и ее хвоста, не приобретая, однако, характера геморрагической имбибии. Отек и гиперемия ДПК нарастали. Выпота в брюшной полости не было. Эти изменения сохранялись на протяжении 3 ч, затем отмечался регресс патологических изменений во всех органах.

Через 24 ч все животные были живы и активны. При релапаротомии в брюшной полости не обнаружено выпота. Патологические изменения в области ПЖ и других органов брюшной полости были менее выражены по сравнению со 2-й серией экспериментов. Выявлено незначительное количество фолликулов в брюшине в области головки и хвоста ПЖ, в области большого сальника фолликулы отсутствовали. Изменения других органов заключались в умеренном отеке.

При микроскопическом исследовании в ПЖ отмечались преимущественно умеренный отек междольковой стромы и очаговые плазморрагии. Междольковая интерстициальная ткань диффузно инфильтрирована макрофагами и нейтрофилами. У некоторых животных в головке и хвосте ПЖ встречались небольшие очаги гнойного расплавления ацинусов, обильно инфильтрированные нейтрофилами. Большинство ацинусов сохраняли свою архитектуру, отличаясь выраженной гетерогенностью экзокриноцитов, среди которых преобладали мелкие «темные» клетки с небольшим количеством секреторных гранул или их полным отсутствием.

В печени при микроскопическом исследовании отмечались неравномерное полнокровие вен и синусоидов, дистрофические изменения гепатоцитов, наиболее выра-

женные под капсулой. Морфологические изменения ДПК заключались в воспалительноклеточной инфильтрации слизистой оболочки и мышечного слоя и фибринозном пропитывании серозной оболочки.

Таким образом, экспериментальные патологические процессы, полученные при воспроизведении ведущих патогенетических факторов ОП (протоковой гипертензии и активации липолитических реакций), носят в различной степени смешанный характер. При перевязке общего желчного протока наряду с преобладающими чертами жирового панкреонекроза (распространяющиеся с периферии ацинусов некробиотические изменения ацинарных клеток с формированием демаркационного вала, очаги некроза междольковой и перипанкреатической жировой ткани) [3, 4] наблюдаются полнокровие сосудов и выраженные экссуудативные явления. При введении фосфолипазы в ткань ПЖ у животных развиваются характерные признаки как жирового, так и геморрагического панкреонекроза – тотальный некроз и расплавление отдельных ацинусов, массивные кровоизлияния в междольковую и внутридольковую интерстициальную ткань [1, 4].

Сочетанный характер изменений, вероятно, связан с тем, что повреждающие воздействия определяют лишь самые первые этапы каскадного патологического процесса. В число первичных эффекторных механизмов может входить солокализация зимогенов с лизосомальными ферментами в крупных вакуолях (обнаруживаемых в базальной зоне ацинарных клеток при моделировании протоковой гипертензии) с последующей активацией трипсиногена катепсином В [6], а также повреждение клеточных мембран фосфолипазой А2 [9] с высвобождением липо- и протеолитических ферментов, в том числе трипсина. Последний наряду с активацией других проферментов способен индуцировать пусковые реакции в калликреин-кининовой, тромбиновой и плазминовой системах [4], что может приводить к углублению нарушений микроциркуляции, нарастанию геморрагических явлений и формированию картины смешанного панкреонекроза. Такое развитие событий сопровождается более выраженными признаками панкреатогенной токсемии и полиорганной недостаточности, а также увеличением показателей летальности, не достигающей, однако, уровня, зарегистрированного ранее на модели геморрагического панкреонекроза [1].

Использование аналогов соматостатина (в частности, сандостатина) для коррекции патологических изменений ПЖ при

развитии ОП основано на его органопротекторных и цитопротекторных свойствах, ингибировании секреции панкреатических ферментов, коррекции аномального метаболизма эйкозаноидов и способности снижать интенсивность кровотока в ПЖ[8]. Однако в отношении данного препарата существуют противоречивые данные – анализ, проведенный в некоторых исследованиях, не выявил существенных различий между группами в летальности и частоте осложнений [8]. В то же время продемонстрирована эффективность сандостатина в профилактике панкреатита [10]. Это наводит на мысль о вероятной роли временного фактора в механизмах его положительного эффекта.

По данным настоящего исследования, терапевтический эффект сандостатина при его раннем применении в условиях моделирования ОП введением фосфолипазы A₂ проявляется в значительном уменьшении распространенности очагов панкреонекроза, снижении гемодинамических расстройств (отсутствии массивных кровоизлияний), уменьшении повреждения перипанкреатических органов и тканей, отсутствии летальных исходов. Несмотря на то, что моделирование панкреонекроза у животных не позволяет воспроизвести все патогенетические механизмы данного патологического процесса, полученные данные могут служить дополнительными аргументами для применения сандостатина при лечении панкреонекрозов в клинике.

Список литературы

1. Бакарев М.А., Васильев А.В., Проценко С.И. Жировой и геморрагический панкреонекроз как особые морфофункциональные единицы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 12. – С. 775–780.
2. Вискунов В.Г. Панкреонекрозы. – Новосибирск: «Экор», 1995. – 256 с.
3. Ультраструктурные особенности повреждения ацинозных клеток при моделировании острого панкреатита путем перевязки общего желчного протока / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, В.Г. Вискунов, С.И. Проценко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150, № 12. – С. 694–700.
4. Нестеренко Ю.А., Лаптев В.В., Михайлузов С.В. Диагностика и лечение деструктивного панкреатита. – М.: Бином-пресс, 2004. – 304 с.
5. Савельев В.С., Филимонов М.И., Бурневич С.З. Панкреонекрозы. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 264 с.
6. Halangk W., Lerch M.M. Early events in acute pancreatitis // *Gastroenterol. Clin. N. Am.* – 2004. – Vol. 33. – P. 717–731.
7. Jha R.K., Ma Q., Sha H., Palikhe M. Acute pancreatitis: a literature review // *Med. Sci. Monit.* – 2009. – Vol. 15, № 7. – P. RA147–RA156.

8. Li J., Wang R., Tang C. Somatostatin and octreotide on the treatment of acute pancreatitis – basic and clinical studies for three decades // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17. – P. 1594–1601.

9. Nevalainen T.J. Phospholipase A2 in acute pancreatitis: review // *Am. J. Surg.* – 2007. – Vol. 194, № 4, Suppl. – P. S28–S32.

10. Omata F., Deshpande G., Tokuda Y., Takahashi O., Ohde S., Carr-Locke D.L., Jacobs J.L., Mine T., Fukui T. Meta-analysis: somatostatin or its long-acting analogue, octreotide, for prophylaxis against post-ERCP pancreatitis // *J. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 45, № 8. – P. 885–895.

11. Su K.H., Cuthbertson C., Christophi C. Review of experimental animal models of acute pancreatitis // *HPB.* – 2006. – Vol. 8. – P. 264–286.

References

1. Bakarev M.A., Vasilyev A.V., Protsenko S.I. // *Byulleten experimentalnoy biologii i meditsiny.* 2012. Vol. 154. no 12. pp. 775 – 780.
2. Viskunov V.G. *Pankreonekrozy.* Novosibirsk: «Ekor», 1995. 256 p.
3. Nepomnyashchikh L.M., Lushnikova E.L., Viskunov V.G., Protsenko S.I. // *Byulleten experimentalnoy biologii i meditsiny.* 2010. Vol. 150, no 12. pp. 694–700.
4. Nesterenko Y.A., Laptev V.V., Mikhaylusov S.V. *Diagnostika i lecheniye destruktivnogo pankreatita.* Moscow: Binompress, 2004. 304 p.
5. Savelyev V.S., Filimonov M.I., Burnivich S.Z. *Pankreonekrozy.* Moscow: «Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo», 2008. 264 p.
6. Halangk W., Lerch M.M. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 2004. Vol. 33. pp. 717–731.
7. Jha R.K., Ma Q., Sha H., Palikhe M. *Med. Sci. Monit.* Vol. 15, no 7. pp. RA147–RA156.
8. Li J., Wang R., Tang C. *Curr. Pharm. Des.* 2011. Vol. 17. pp. 1594–1601.
9. Nevalainen T.J. *Am. J. Surg.* 2007. Vol. 194, no 4, Suppl. pp. S28–S32.
10. Omata F., Deshpande G., Tokuda Y., Takahashi O., Ohde S., Carr-Locke D.L., Jacobs J.L., Mine T., Fukui T. *J. Gastroenterol.* 2010. Vol. 45, no. 8. pp. 885–895.
11. Su K.H., Cuthbertson C., Christophi C. *HPB.* 2006. Vol. 8. pp. 264–286.

Рецензенты:

Поляков Л.М., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии и заместитель директора по научной работе ФГБУ «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения РАНН, г. Новосибирск;

Любарский М.С., д.м.н., профессор, член-корреспондент РАНН, заведующий отделом клинической лимфологии и заместитель директора по научной и лечебной работе ФГБУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии» Сибирского отделения РАНН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 28.01.2013.