

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ПАНКРЕАТОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ И В УСЛОВИЯХ ЕГО КОРРЕКЦИИ

Виталий Никитович ФЕДОРЕНКО, Александр Петрович НАДЕЕВ,
Мария Геннадьевна ПУСТОВЕТОВА

ГБОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России
630091, Новосибирск, Красный пр., 52

Раскрытие патогенеза развития острого панкреатита возможно только при проведении экспериментальных исследований, что дает возможность изучить патологический процесс и достоверно оценить эффект от проводимого лечения. В данной работе воспроизведена экспериментальная модель острого панкреатита у белых крыс породы Вистар путем введения по ходу главного протока поджелудочной железы трипсина и змеиного яда гадюки обыкновенной, а также выполнена его коррекция с применением октреотида и сыворотки против яда гадюки обыкновенной. Проведена оценка летальности животных и морфометрическое исследование патоморфологических изменений поджелудочной железы, печени и двенадцатиперстной кишки. Введение трипсина и змеиного яда приводило к развитию изменений, характерных для геморрагического панкреонекроза. Применение октреотида и сыворотки против яда гадюки обыкновенной снижало летальность экспериментальных животных и выраженность патоморфологических изменений в органах панкреатодуоденальной зоны.

Ключевые слова: острый панкреатит, трипсин, змеиный яд, октреотид, сыворотка против яда гадюки, поджелудочная железа, печень.

Острый панкреатит характеризуется высокой заболеваемостью, тяжелым течением, значительной летальностью и отсутствием эффективного патогенетического лечения [6]. Среди всей острой хирургической патологии органов брюшной полости он составляет 10–12 %. Число деструктивных форм острого панкреатита за последние 20 лет возросло с 15 до 25 %, геморрагические формы составили 10–16 %, жировые – до 90 % от числа деструктивных форм острого панкреатита, при этом летальность в основном обусловлена за счет геморрагических форм и достигает 51,5 % [7]. Летальность при данном заболевании в структуре смертности от острой хирургической патологии органов брюшной полости занимает первое место, в среднем составляя около 20 %, а при деструктивных формах достигая 80 % [11]. При остром панкреатите выраженные морфологические изменения возникают не только в самой поджелудочной железе (ПЖ), но и в забрюшинной клетчатке, сальниковой сумке, брюшине, печени, двенадцатиперстной кишке (ДПК) [13].

В лечении острого панкреатита предпочтение отдано консервативным методам с использованием препаратов, снижающих секреторную функцию ПЖ [12]. Одним из наиболее эффективных средств, применяемых при остром панкреатите, является октреотид (ЗАО «Фарм-Синтез», Россия) – синтетический октапептид, аналог естественного гормона соматостатина, обладающий сходными с ним фармакологическими эффектами, но значительно большей продолжительностью действия. Препарат подавляет патологически повышенную секрецию гормона роста (соматотропного гормона), а также пептидов и серотонина, продуцируемых в гастроэнтеропанкреатической эндокринной системе [8].

Клинические проявления укусов змей гадюки обыкновенной (*Vipera berus*), яды которой относятся к группе геморрагического, гемокоагулирующего и местного отечно-некротического действия, во многом напоминают клинику панкреонекроза, преимущественно геморрагического характера. Схожесть действия трипсина

Федоренко В.Н. – к.м.н., младший научный сотрудник ЦНИЛ, e-mail: sibbasic@gmail.com
Надеев А.П. – д.м.н., профессор кафедры патологической анатомии, e-mail: nadeevngma@mail.ru
Пустоветова М.Г. – д.м.н., профессор кафедры патологической физиологии, зав. ЦНИЛ, e-mail: patophysiology@mail.ru

(основного пускового фактора протеолиза) с действием змеиного яда, сходство ферментативного и химического состава панкреатического сока человека и змеиного яда [3] послужили основанием для экспериментального изучения сыворотки против яда гадюки, применяемой для лечения острого панкреатита.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на кафедре патологической анатомии и в Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета с соблюдением требований Приказа МЗ СССР № 775 от 12 августа 1977 г. и правил Европейской конвенции по защите животных (Страсбург, 1986), одобрены комитетом по этике Новосибирского государственного медицинского университета (протокол № 33 от 21 апреля 2011 г.).

Работа выполнена на 2-месячных крысах-самцах породы Вистар массой 200–250 г. Животных, находящихся под эфирным наркозом, взвешивали, фиксировали к операционному столу. По ходу общего желчного протока, определяемого визуально и пальпаторно, шприцем объемом 1 мл с иглой 25 G (0,5 × 25 мм) в ПЖ вводили 0,85 % водный раствор NaCl, трипсин, яд гадюки обыкновенной или лекарственное вещество (октреотид или сыворотка против яда гадюки) в объеме 0,5 мл в головку и 0,5 мл в хвост ПЖ.

В эксперименте было задействовано 180 животных, которые в зависимости от поставленных задач были разделены на 9 групп, по 20 животных в каждой. Животным 1-й (контрольной) группы в ПЖ вводили 1,0 мл 0,85 % изотонического водного раствора. У животных 2-й и 3-й групп вызывали острый панкреатит введением растворов соответственно трипсина (ООО «Самсон-Мед», 50 мг/кг) или яда гадюки обыкновенной (ООО «Сибирский серпентарий», 0,2 мг/мл, 1 мг/кг массы тела животного).

В последующих группах после создания модели острого панкреатита, индуцированного применением трипсина (4-я, 6-я и 8-я группы) и змеиного яда (5-я, 7-я и 9-я группы), животным в ПЖ вводили октреотид (0,35 мг/кг, 4-я и 5-я группы), сыворотку против яда гадюки (500 АЕ/кг, 6-я и 7-я группы) или комплекс (октреотид 0,35 мг/кг и сыворотка 150 АЕ/кг, 8-я и 9-я группы).

В течение 3 ч следили за состоянием животных и макроскопическими изменениями органов панкреатодуоденальной зоны, затем брюшную полость зашивали и крыс возвращали в клетку. Через 24 ч от начала эксперимента оценивали летальность. Выживших животных выводили из

эксперимента путем передозировки эфира и декапитации. Производили макроскопическую оценку изменений органов панкреатодуоденальной зоны. Образцы печени, ПЖ, ДПК фиксировали в 10 % нейтральном формалине. Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Подсчитывали с помощью окулярной сетки с 25 точками объемную плотность (V_v) зон дистрофически и некротически измененных гепатоцитов, двуядерных гепатоцитов, некрозов в ПЖ; в тестовой площади $6,4 \times 104 \text{ мкм}^2$ подсчитывали численную плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, клеток воспалительного инфильтрата ПЖ и ДПК; измеряли высоту (мкм) и количество ворсинок ДПК в тестовой площади с помощью окуляр-микрометра [1]. Исследование проводили в универсальном микроскопе AxioStar PLUS (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры Leica DFC 320 (Германия) и компьютерной программы Leica QWinV 3.0.

Все полученные данные анализировались методами вариационной статистики. Нормально распределяемые показатели приводили в их среднем значении со средней квадратичной ошибкой ($M \pm m$). Достоверность различий средних величин определяли на основании *t*-критерия Стьюдента при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 ч летальность животных 2-й и 3-й групп, у которых острый панкреатит был вызван путем введения трипсина и змеиного яда в поджелудочную железу, составила 70 и 80 % соответственно.

При гистологическом исследовании в поджелудочной железе крыс 2-й и 3-й групп отмечали полнокровие сосудов, кровоизлияния в интерстициальной ткани, дисконкомплексацию клеток и разобщение долек, обширные очаги некрозов с полной и частичной деструкцией ацинусов (рис. 1). Объемная плотность (V_v) некрозов ПЖ крыс 2-й и 3-й групп составила 47 и 52 % соответственно; численная плотность (N_{ai}) воспалительной нейтрофильной, макрофагальной и лимфоцитарной инфильтрации ПЖ превышала величины аналогичных показателей у животных 1-й (контрольной) группы более чем в 50 раз. В печени крыс 2-й и 3-й групп при микроскопическом исследовании выявляли отек, микрокровоизлияния, в печеночных дольках центральные вены были тромбированы, дисконкомплексацию гепатоцитов, мелко-, средне- и крупноволнообразную дистрофию гепатоцитов с участками микронекрозов паренхимы (рис. 2). Отмечали увеличение объемной

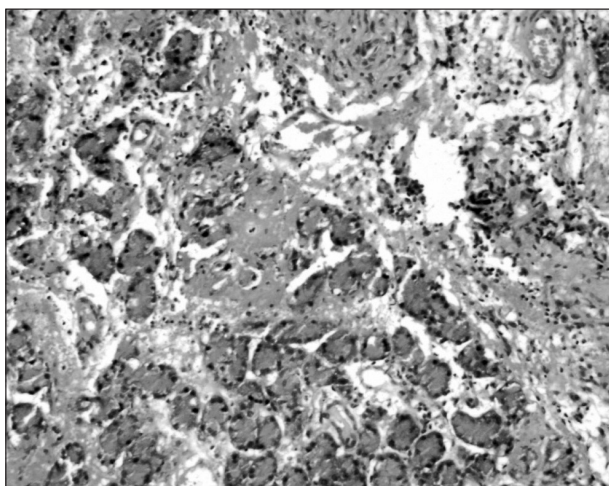


Рис. 1. Поджелудочная железа крысы через 24 ч при остром экспериментальном панкреатите, вызванном змеиным ядом. Обширные очаги некрозов с полной и частичной деструкцией ацинусов, дисконплексаия и разобцение долек. Обширные кровоизлияния. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

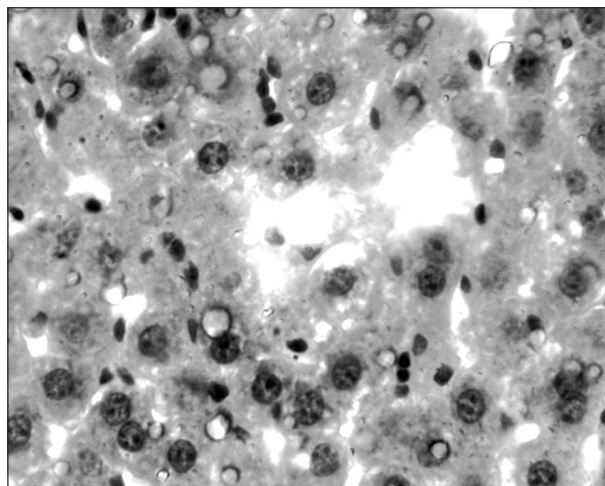


Рис. 2. Печень крысы через 24 ч при остром экспериментальном панкреатите, вызванном трипсином. Отек гепатоцитов и синусоидов, кровоизлияния, дистрофические изменения гепатоцитов с участками микронекрозов. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

плотности (Vv) зон дистрофически измененных гепатоцитов в 22 и 16 раз соответственно, объемной плотности зон некрозов гепатоцитов в 27 и 20 раз соответственно, численной плотности (Nai) двуядерных гепатоцитов в 8 и 12 раз соответственно и объемной плотности (Vv) двуядерных гепатоцитов в 7 и 11 раз соответственно. Увеличение численной и объемной плотности двуядерных гепатоцитов печени свидетельствует, что в ответ на повреждение активировались репаративные процессы [5]. В слизистой оболочке ДПК наблюдали отек, полнокровие кровеносных сосудов, внутрисосудистые стазы и тромбозы, мононуклеарную инфильтрацию, отмечали увеличение высоты ворсинок на 12 и 30 % соответственно и численной плотности (Nai) воспалительной мононуклеарной инфильтрации в 6 раз.

Таким образом, введение как трипсина, так и змеиного яда в ПЖ приводило к развитию изменений, характерных для деструктивного геморрагического панкреонекроза. Обе модели характеризовались сходными изменениями, что, вероятно, обусловлено одинаковым механизмом действия трипсина и змеиного яда. Трипсин является главным внутриацинарным активатором всех протеолитических ферментов, а также фосфолипазы А и В, что приводит к аутокаталитическому перевариванию ПЖ. Трипсин активирует не только все зимогенные ферменты ПЖ (эластазу, карбоксипептидазу, химотрипсин и т. д.), но и лизосомальные ферменты и протеиназы, что способствует протеолитическому разрушению ткани ПЖ [9]. Яд гадюки, как и трипсин, выступает в

роли активатора протеолиза. При этом происходит увеличение синтеза провоспалительных цитокинов (в частности, фактора некроза опухоли α , интерлейкина 1β), активация макрофагов, привлечение лейкоцитов в очаг некроза паренхимы ПЖ [10]. Активированные ферменты при некрозе ПЖ попадают в кровеносное русло и опосредованно через асцитическую жидкость в лимфатические сосуды, далее в грудной лимфатический проток, оказывая, таким образом, системное действие, влияя на систему микроциркуляции (расширение капилляров, стазы, тромбозы), что приводит к вторичному поражению органов панкреатодуоденальной зоны.

Деструктивные процессы в печени связаны с тем, что она является венозным коллектором органов брюшной полости, подвергается воздействию активированных ферментов (трипсин, химотрипсин, эластаза, карбоксипептидаза), провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли α , интерлейкин 1β), что приводит к нарушению микроциркуляции и непосредственному повреждению ее паренхимы. Воспалительная инфильтрация слизистой оболочки ДПК обусловлена непосредственным повреждающим действием ферментов ПЖ и опосредованно за счет гиперферментемии и привлечения в слизистую воспалительных клеток [4].

У животных 4-й, 5-й, 6-й и 7-й групп была проведена коррекция острого панкреатита, вызванного трипсином и змеиным ядом, применением октреотида и сыворотки против яда гадюки обыкновенной. Летальность крыс в данных

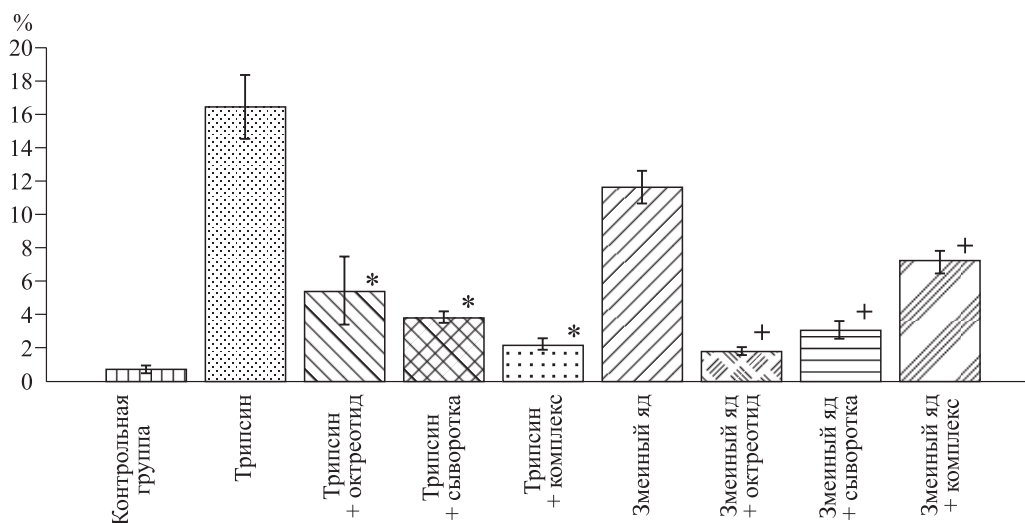


Рис. 3. Объемная плотность (V_v) дистрофии гепатоцитов при остром панкреатите, индуцированном трипсином и змеиным ядом, и лечении сывороткой против яда гадюки, октреотидом и их комплексом. Здесь и на рис. 4–6 обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей животных, которых вводили: * – только трипсин, + – только змеиный яд

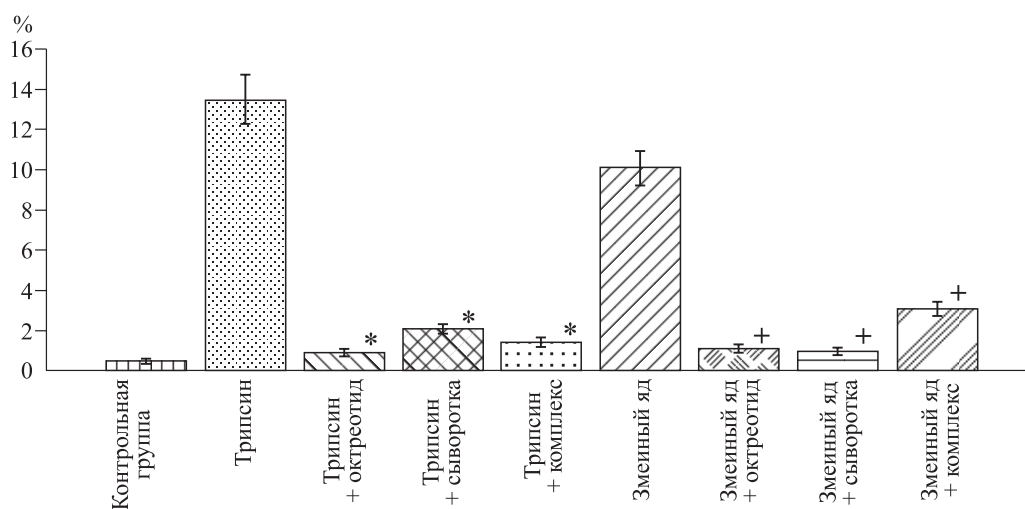


Рис. 4. Объемная плотность (V_v) некрозов гепатоцитов при остром панкреатите, индуцированном трипсином и змеиным ядом, и лечении сывороткой против яда гадюки, октреотидом и их комплексом

группах через 24 ч составила 15, 20, 15 и 15 % соответственно. В их ПЖ структура долек и ацинусов в целом была сохранена, имелись очаги дистрофических и некротических изменений ее паренхимы, диффузная преимущественно макрофагальная, лимфоцитарная и нейтрофильная воспалительная инфильтрация органа. Объемная плотность (V_v) некрозов ПЖ крыс 4–7-й групп по сравнению с величиной аналогичных показателей у животных 2-й и 3-й групп была уменьшена в 117, 83, 36, 64 раза соответственно ($p < 0,05$ во всех случаях), численная плотность (N_{ai}) воспалительного инфильтрата ПЖ – в 27, 19, 17,

58 раз соответственно ($p < 0,05$ во всех случаях). В печени отмечали умеренное полнокровие, балочная структура была сохранена, наблюдали мелковакуольную дистрофию гепатоцитов и очаги микронекрозов, значительное количество двуядерных гепатоцитов. Объемная плотность (V_v) дистрофии гепатоцитов была меньше в 3,0, 4,3, 6,0 и 3,7 раза соответственно ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 3), объемная плотность некрозов – в 15,0, 6,5, 9,0 и 10,5 раза меньше соответственно ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 4), численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов была увеличена в 2,0 ($p < 0,05$), 2,3 раза ($p < 0,05$), на 5 и

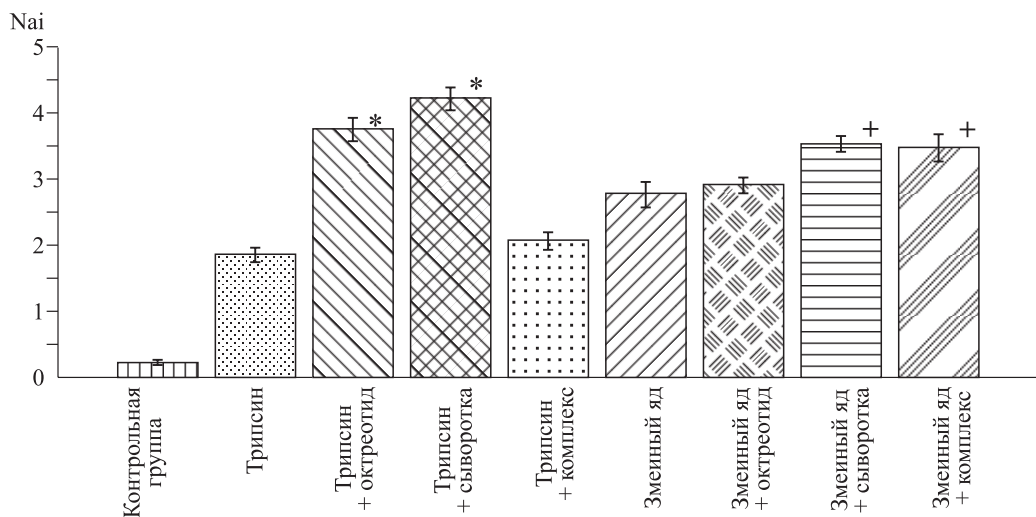


Рис. 5. Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов при остром панкреатите, индуцированном трипсином и змеиным ядом, и лечении сывороткой против яда гадюки, октреотидом и их комплексом

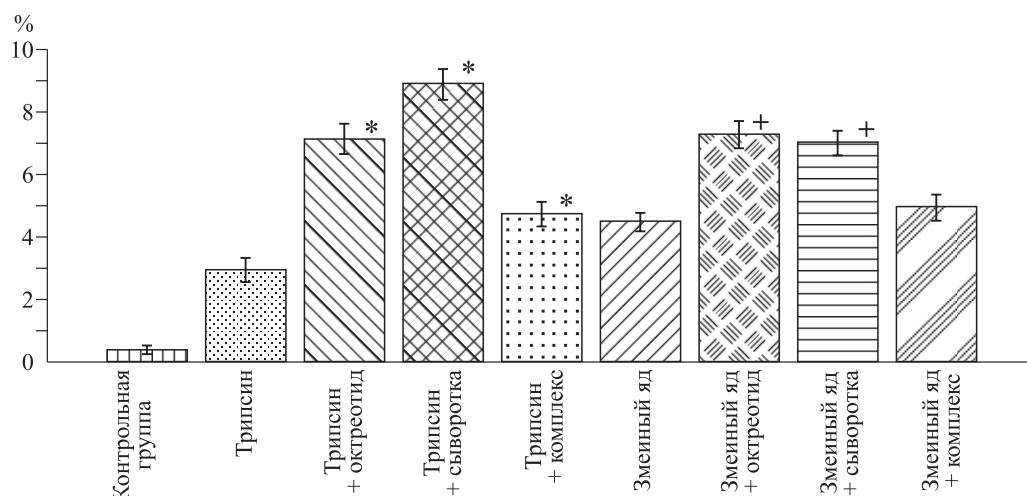


Рис. 6. Объемная плотность (V_v) двуядерных гепатоцитов при остром панкреатите, индуцированном трипсином и змеиным ядом, и лечении сывороткой против яда гадюки, октреотидом и их комплексом

30 % ($p < 0,05$) соответственно (рис. 5), объемная плотность (V_v) двуядерных гепатоцитов – в 2,4, 3,0 раза, на 60 и 60 % соответственно ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 6). В ДПК наблюдали умеренный отек слизистой оболочки и подслизистого слоя, мононуклеарная воспалительная инфильтрация была незначительной, длина ворсинок соответствовала величине показателя животных контрольной группы. Численная плотность (N_{ai}) воспалительного инфильтрата ДПК была соответственно в 2,4, 2,2, 2,3 и 3,0 раза меньше, чем у животных 2-й и 3-й групп ($p < 0,05$ во всех случаях).

У животных 8-й и 9-й групп, у которых проводили коррекцию острого панкреатита, вызванного трипсином и змеиным ядом, применением комплекса октреотида и сыворотки против яда гадюки обыкновенной, через 24 ч летальность составила 10 %. В их ПЖ структура долек и ацинусов была сохранена, дистрофические и некротические изменения паренхимы, диффузная нейтрофильная, макрофагальная и лимфоцитарная воспалительная инфильтрация органа были незначительными. Объемная плотность (V_v) некрозов по сравнению с величинами аналогичных показателей у животных 2-й и 3-й групп (без

лечения) была уменьшена в 224 и 130 раз соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях), численная плотность (N_{ai}) воспалительного инфильтрата – в 33 и 99 раз соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях). В печени балочная структура была сохранена, наблюдали незначительные дистрофические и некротические изменения гепатоцитов, значительное количество двуядерных гепатоцитов. По сравнению с показателями у животных 2-й и 3-й групп (без лечения) объемная плотность (V_v) зон дистрофически измененных гепатоцитов была меньше в 7,5 и 1,6 раза соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях) (см. рис. 3), объемная плотность (V_v) микронекротов – в 9,5 и 3,3 раза соответственно ($p < 0,05$ в обоих случаях) (см. рис. 4), численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов – больше на 11 и 26 % ($p < 0,05$) соответственно (см. рис. 5), объемная плотность (V_v) двуядерных гепатоцитов – в 1,6 раза ($p < 0,05$) и на 10 % соответственно (см. рис. 6). В ДПК наблюдали умеренный отек слизистой оболочки и подслизистого слоя, незначительную мононуклеарную воспалительную инфильтрацию, высота ворсинок соответствовала величине показателя контрольной группы, численная плотность (N_{ai}) воспалительного инфильтрата была соответственно в 2,4 и 4,3 раза меньше, чем у крыс 2-й и 3-й групп ($p < 0,05$ в обоих случаях).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение октреотида и сыворотки против яда гадюки в ПЖ на фоне острого экспериментального панкреатита, вызванного трипсином и змеиным ядом, приводило к снижению летальности крыс и выраженности патологических изменений в органах панкреатодуоденальной зоны: наблюдали достоверно значимое уменьшение объемной плотности некротов и воспалительной инфильтрации ПЖ, объемной плотности некротов и дистрофии гепатоцитов, увеличение объемной и численной плотности двуядерных гепатоцитов (что говорит об усилении репаративной регенерации), уменьшение длины ворсинок и воспалительного инфильтрата в двенадцатиперстной кишке. Наилучшие результаты были получены при применении комплекса, что обусловлено, вероятно, однонаправленностью действия октреотида и сыворотки против яда гадюки, заключающегося в блокировании ферментов ПЖ и купировании таким образом каскада патологических реакций (активация ферментов ПЖ, ее аутолиз, выход ферментов в кровь). Октреотид, сыворотка против яда гадюки и, особенно, комплекс данных препаратов были эффективными средствами лечения

острого панкреатита в эксперименте. При этом доза сыворотки при применении ее в комплексе была меньшей, чем при изолированном применении (соответственно 150 и 500 АЕ/кг массы тела животного).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую искреннюю благодарность своему учителю и наставнику д.м.н., профессору кафедры хирургических болезней ФПК и ППВ ГБОУ ВПО НГМУ Минздрава России В.Г. Вискунову, который более 20 лет посвятил изучению проблемы острого панкреатита и предложил новые подходы к его лечению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. 384 с.
2. Брискин Б.С., Рыбаков Г.С. Хирургическое лечение острого панкреатита // Рос. журн. гастроэнтерол. гепатол. колопроктол. 1999. (2). 67–74.
3. Движнянинова Н.А., Вискунов В.Г. Тайна панкреатической драмы. Новосибирск: Конкурент, 2009. 196 с.
4. Плеханов А.Н. О некоторых аспектах острого панкреатита (обзор литературы) // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2010. 6. (1). 236–240.
5. Романова Л.П., Малышев И.И. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс // Вестн. Чувашского ун-та. 2011. (3). 398–402.
6. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Соболев П.А. Оценка эффективности современных методов лечения деструктивного панкреатита // Анналы хирургич. гепатол. 1996. 1. 58–61.
7. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р. и др. Острый панкреатит. Пособие для врачей. М., 2000. 59.
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. 17. (16). 1594–1601.
9. Raraty M.G., Murphy J.A., Mcloughlin E. et al. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis // Scand. J. Surg. 2005. 94. 89–96.
10. Raraty M.G., Neoptolemos J.P. Compartments that causes the real damage in severe acute pancreatitis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003. 168. 141–142.
11. Van Acker G.J., Perides G., Weiss E.R. et al. Tumor progression locus-2 is a critical regulator of pancreatic and lung inflammation during acute pancreatitis // J. Biol. Chem. 2007. 282. (10). 22140–22149.

12. Van Santvoort H.C., Bakker O.J., Bollen T.L. *et al.* A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome // *Gastroenterology*. 2011. 141. (4). 1254–1263.

13. Zhang X.P., Tian H., Wu D.J. Pathological changes in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis treated by Baicalin and Octreotide // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 2009. 8. (1). 85–92.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES OF THE ORGANS OF PANCREATODUODENAL ZONE IN ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS AND IN TERMS OF ITS CORRECTION

**Vitaliy Nikitovich FEDORENKO, Aleksandr Petrovich NADEEV,
Maria Gennadievna PUSTOVETOVA**

*Novosibirsk State Medical University of Minzdrav of Russia
630091, Novosibirsk, Krasni av., 52*

Disclosure of pathogenesis of acute pancreatitis is possible only at carrying out of experimental researches, which gives the opportunity to explore the pathological process and reliably estimate the effect of the treatment. The experimental model of acute pancreatitis in white rat of strain Wistar through the introduction of trypsin and snake venom *Vipera berus* in the course of the general pancreatic flow was reproduced in this research, and also its correction with the usage of octreotide and serum against the poison of *Vipera berus* was made. Assessment of animals' mortality and morphometric study of pathomorphological changes of the pancreas, the liver and the duodenum was made. Introduction of trypsin and snake venom led to the development of the changes, characteristic for the destructive hemorrhagic pancreatic necrosis. The usage of octreotide and serum against the poison of *Vipera berus* reduced the lethality of experimental animals and the severity of pathomorphological changes in the organs of pancreatoduodenal zone.

Key words: acute pancreatitis, trypsin, snake venom, octreotide, serum against the poison of vipers, pancreas, liver.

*Fedorenko V.N. – candidate of medical sciences, junior researcher of central scientific-research laboratory,
e-mail: sibbasic@gmail.com*

Nadeev A.P. – doctor of medical sciences, professor of chair of pathologic anatomy, e-mail: nadeevngma@mail.ru

*Pustovetova M.G. – doctor of medical sciences, professor of chair of normal physiology, chief of central
scientific-research laboratory, e-mail: patophysiol@mail.ru*