

УДК 616.37-006.2:616-092.9

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПСЕВДОКИСТЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.В. Дорошкевич¹, П.Г. Пивченко², Е.Ю. Дорошкевич¹

1 – УО «Гомельский государственный медицинский университет»

2 – УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Авторами представлена оригинальная модель псевдокисты поджелудочной железы*. Способ основан на локальном холодом воздействии на поджелудочную железу белой крысы с помощью криохирургического комплекса КСН 3А/В. Охлаждение выполнялось интраоперационно, путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника с тканью железы.

Предложенная модель отличается стабильностью воспроизведения, высокой специфичностью и пригодна для применения на мелких лабораторных животных. Представленные морфометрические параметры могут быть использованы как банк данных для разработки рациональных методов лечения и оценки их эффективности.

Ключевые слова: псевдокиста, поджелудочная железа, экспериментальная модель.

The authors have introduced an original model of the pseudocyst. The method is based on local cold influence on the pancreas of white rat, with the help of cryosurgical complex КСН 3А/В. Cooling was carried out intraoperatively by the direct contact of the cryosurgical tip with the tissue of the pancreas.

The offered model is characterized by stability of reproduction, high specificity and it is suitable for the application on small-sized laboratory animals. Introduced morphometrical parameters can be used as the data bank for working out of rational methods of treatment and estimation of their efficiency.

Key words: pseudocyst, pancreas, experimental model.

Введение

Число больных с кистами поджелудочной железы в последние десятилетия неуклонно возрастает. Это обусловлено прогрессирующим увеличением количества пациентов с деструктивными формами панкреатита [1, 7]. Другая причина связана с широким внедрением в клиническую практику компьютерной томографии и ультразвукового исследования, позволивших выявлять псевдокисты поджелудочной железы у 50 % больных средне-тяжелым и тяжелым панкреатитом [2].

В процессе формирования кисты часто возникают опасные осложнения: перфорации, кровотечения, нагноение, механическая желтуха, непроходимость желудочно-кишечного тракта, частота которых может составлять 20-50 %, летальность при этом достигает 40-60 % [4, 6].

Исследование преобразований, происходящих в псевдокистах поджелудочной железы, в клинических условиях затруднено. Данные литературы в основном освещают клинику, диагностику и лечение. Сведения, характеризующие морфогенез псевдокист поджелудочной железы, недостаточны и фрагментарны.

Цель исследования: установить морфометрические параметры псевдокисты поджелудочной железы в эксперименте.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 70 нелинейных белых крысах весом 160-180 грамм. Использовались самцы, что позволило исключить гормональное влияние, связанное с эстральным циклом, на течение патологического процесса. Питание осуществлялось по обычной диете в условиях вивария. Крысам был обеспечен свободный доступ к пище и воде, их содержали в стандартных условиях с естественной 12-часовой сменой света и темноты. Работу проводили с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов.

В течение 18-24 часов до воспроизведения эксперимента животные не получали пищу, вода давалась в неограниченном количестве. Крыс выдерживали на голодном режиме с целью стандартизировать условия опыта, вызвать синхронизацию секреторного цикла в клетках поджелудочной железы.

Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Под эфирным наркозом производили срединную лапаротомию, отступая на 1 см от мечевидного отростка по белой линии живота длиной 3 см. Для расширения раны во время операции на лабораторных животных использовали ранорасширитель собственной конструкции (Патент РБ № 3641).

Для локальной гипотермии поджелудочной железы использовали криохирургический комплекс КСН 3А/В, применяемый для местного замораживания тканей.

Охлаждение железы осуществляли интраоперационно, путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника собственной конструкции, с определенными параметрами его рабочей части, позволяющей осуществить точечные воздействия (Патент РБ № 3979).

Воздействие низких температур осуществлялось в течение 60 секунд. Применение указанного наконечника позволяет осуществить стандартизацию криовоздействия на поджелудочную железу. Выбор времени воздействия обусловлен, с одной стороны, теплопроводностью криохирургического наконечника, а с другой – анатомическими параметрами поджелудочной железы крысы. Использовали температурный режим -100°C. Охлажденный участок железы оттаивал в течение 30 секунд, после чего селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой погружали в брюшную полость. Для манипуляций на поджелудочной железе использовали пинцет собственной конструкции (Патент РБ № 4891).

Операционную рану ушивали послойно наглухо. Для наложения швов применяли иглодержатель собственной

*Способ моделирования псевдокист поджелудочной железы. Приоритетная справка Национального центра интеллектуальной собственности РБ № а 20070428 от 2007. 04.18.

конструкции, использование которого позволило существенно оптимизировать проведение оперативного вмешательства (Патент РБ № 4451). Сразу после операции животные получали пищу и питье в неограниченных количествах.

Забой животных проводился путем декапитации на 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 и 90 сутки после локальной гипотермии поджелудочной железы, в промежутке от 10 до 12 часов утра, что давало возможность стандартизировать данные патоморфологических исследований.

Для гистологических исследований брали поджелудочную железу с псевдокистой. Фиксацию проводили в 10% нейтральном формалине. После промывки в проточной воде проводили через спирты возрастающей концентрации, заливали в парафин с воском. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5 мкм. В работе использована гистологическая методика окраски – гематоксилин-эозин.

Для количественной оценки и получения достоверных данных, характеризующих морфогенез псевдокисты поджелудочной железы, использовали морфометрию, которая проводилась с помощью окулярных сеток, окуляр – микрометра, микроскопа МБС-10.

Проводилось измерение наружного диаметра псевдокисты поджелудочной железы. Определялись размеры ее внутренней полости. Измерялась ширина наружного и внутреннего слоев, а также толщина стенки кисты в целом.

Исследование на наличие сообщения с протоковой системой поджелудочной железы проводили путем пункционного заполнения под давлением коллоидного раствора угля (туши).

После идентификации в стенке кисты клеточных элементов (нейтрофильные лейкоциты, лимфоциты, макрофаги и фибробласты) проводили их подсчет на 1 мм² площади, определяли общее количество клеток.

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакета компьютерных программ статистического анализа «Microsoft Excel 2003» и «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение

На 7 сутки в свободной брюшной полости содержится скудное количество фибринозного выпота. Серозные оболочки умеренно отечны. В парапанкреатической клетчатке определяются поля жировых некрозов, содержащие дистрофичные палочкоядерные лейкоциты. Вокруг вовлеченной в патологический процесс парапанкреатической жировой клетчатки выявляется лейкоцитарная инфильтрация с примесью макрофагов и лимфоцитов. Обнаруживаются скопления фибробластов.

Зона замораживания поджелудочной железы приобретает грязно-серый цвет. При гистологическом исследовании в ней в очагах некроза обнаруживаются лейкоцитарные инфильтраты. Группы соединительнотканых клеток, исходящих из сохранившихся участков железы, в виде тяжелой проникают в зону мертвой ткани.

После криовоздействия поджелудочной железы на 14 сутки в брюшной полости экссудата не обнаружено. Отмечается незначительный отек серозных оболочек. В парапанкреатической клетчатке определяется подвижное, округлой формы образование, не спаянное с прилегающими органами с гладкой поверхностью, белесого цвета, плотной консистенции, диаметром 8,50±0,03 мм, на разрезе образование имеет плотную стенку толщиной 0,79±0,02 мм. Его полость округлой формы диаметром 6,93±0,03 мм заполнена жидким содержимым желтовато-белого цвета.

Гистологически стенка образования состоит из двух слоев: наружного – более плотного, состоящего из оформленной соединительной ткани, шириной 0,39±0,03 мм; и внутреннего – более рыхлого, образованного грануляционной тканью, шириной 0,40±0,01 мм.

В наружном слое преобладают концентрически ориентированные волокнистые структуры. Выявляются различной степени зрелости фибробласты и фиброциты. Внутренний слой богат клеточными элементами, преобладают палочкоядерные нейтрофилы, макрофаги и фибробласты. В стенке кисты определяются кровеносные сосуды, наибольшее их число во внутреннем слое. Содержимое полости представляет собой тканевый детрит, включающий дистрофичные нейтрофильные лейкоциты. Сообщение полости с выводной системой поджелудочной железы не выявлено. Морфологическая картина указывает на наличие псевдокисты поджелудочной железы.

После идентификации и подсчета клеточных элементов стенки кисты на 1 мм² площади число нейтрофильных лейкоцитов 921±4; макрофагов – 560±3; фибробластов – 400±5; лимфоцитов – 119±2, их общее количество равно 1999±7.

Поврежденный участок поджелудочной железы серого цвета, без четких границ. Гистологически в зоне замораживания определяется лейкоцитарная инфильтрация, проникающая вглубь омертвевшей ткани органа, выявляются макрофаги.

На 21 сутки эксперимента на секции в брюшной полости свободной жидкости не содержится. Отек серозных оболочек не выявляется. В парапанкреатической клетчатке наблюдается округлое, подвижное образование с гладкой поверхностью, плотной консистенции, белесоватого цвета диаметром 9,01±0,03 мм. На разрезе толщина стенки равна 0,93±0,01 мм. Определяется округлая полость диаметром 7,15±0,04 мм, заполненная вязкой светло-желтой жидкостью. Стенка кисты при гистологическом исследовании представляет собой соединительнотканную капсулу, состоящую из двух слоев, как и в предыдущем сроке. Наружный слой шириной 0,64±0,01 мм образован волокнистой соединительной тканью, коллагеновые волокна которой складываются в пучки и имеют концентрическое направление. Внутренний слой шириной 0,30±0,02 мм, представлен грануляционной тканью, содержащей большое количество расширенных капилляров. Клеточные элементы локализируются преимущественно во внутреннем слое. Полость кисты заполнена тканевым детритом, содержащим нейтрофилы в стадии распада. Сообщения полости с протоковой системой поджелудочной железы не установлено.

При подсчете клеток в стенке кисты на 1 мм² определено: нейтрофильных лейкоцитов – 630±4; макрофагов – 486±5; фибробластов – 451±5; лимфоцитов – 143±3, их общее количество составляет 1709±8.

Селезеночный сегмент поджелудочной железы приобретает вид сероватой массы. Микроскопически в зоне замораживания наблюдается лейкоцитарная инфильтрация и рассасывание некротических масс. Очаги некроза разделены рыхлыми прослойками соединительной ткани.

Спустя 30 дней и в последующем в брюшной полости экссудата не обнаруживается. В парапанкреатической клетчатке определяется подвижное, плотное, округлой формы с гладкой поверхностью образование молочно-белого цвета диаметром 9,03±0,01 мм. На разрезе толщина стенки составляет 0,95±0,01 мм, полость кисты диаметром 7,14±0,02 мм заполнена белесой казеозной массой. Гистологически по-прежнему в стенке кисты выяв-

ляются два слоя. Внутренний слой шириной $0,28 \pm 0,02$ мм, представлен грануляционной тканью, богатой новообразованными сосудами. Эндотелий сосудов набухший, выступает в просвет. Грануляционная ткань по направлению к наружному отделам приобретает волокнистый характер. Ширина наружного слоя составляет $0,67 \pm 0,02$ мм, он образован грубоволокнистой соединительной тканью. Определяются концентрически расположенные пучки толстых, плотных соединительнотканых волокон, выявляется небольшое количество фибробластов. Основное количество клеточных элементов локализовано во внутреннем слое. Образование не сообщается с протоковой системой поджелудочной железы.

На 1 мм^2 площади стенки кисты установлено: нейтрофильных лейкоцитов – 429 ± 3 ; макрофагов – 561 ± 4 ; фибробластов – 494 ± 7 ; лимфоцитов – 158 ± 5 . Общее количество клеток указанных популяций составляет 1641 ± 12 .

Селезеночный отдел поджелудочной железы имеет серую окраску, которую сохраняет до конца исследования. В зоне замораживания гистологически отмечается пролиферация соединительной ткани.

На 45 сутки эксперимента в парапанкреатической клетчатке сохраняется плотноэластическое округлое, подвижное образование с гладкой, белого цвета поверхностью. Его диаметр составляет $9,03 \pm 0,01$ мм. На разрезе стенка кисты представлена плотной фиброзной тканью, ее толщина увеличивается в сравнении с предыдущим сроком и составляет $1,01 \pm 0,01$ мм, на разрезе полость округлой формы, диаметром $7,02 \pm 0,03$ мм, заполненная казеозной массой белесого цвета. При гистологическом исследовании в стенке кисты по-прежнему сохраняется два слоя. Наружный слой шириной $0,76 \pm 0,01$ мм беден клеточными элементами и представлен зрелой соединительной тканью, ее волокна имеют концентрическую ориентацию местами с признаками гиалинизации. Внутренний слой шириной $0,25 \pm 0,01$ мм образован грануляционной тканью и содержит палочкоядерные нейтрофилы, макрофаги, фибробласты, лимфоциты, выявляются многоядерные клетки инородных тел. Внутренняя поверхность кисты лишена эпителиальной выстилки, ее полость изолирована.

Содержание в стенке кисты на 1 мм^2 площади нейтрофильных лейкоцитов – 362 ± 4 ; макрофагов – 434 ± 5 ; фибробластов – 541 ± 5 ; лимфоцитов – 166 ± 3 . Их общее количество равно 1502 ± 11 .

При гистологическом исследовании в зоне замораживания поджелудочной железы обнаруживается разрастание соединительной ткани. Среди пролиферирующей соединительной ткани выявляются расширенные внутридольковые выводные протоки с уплощенным и гиперплазированным эпителием.

На протяжении с 60 по 90 сутки эксперимента в верхнем этаже брюшной полости сохраняется подвижное, плотное образование, исходящее из парапанкреатической клетчатки округлой формы, с гладкой, белесого цвета поверхностью. Диаметр псевдокисты на 60, 75 и 90 сутки составляет, соответственно, $9,03 \pm 0,01$ мм; $9,02 \pm 0,01$ мм и $9,01 \pm 0,01$ мм. Размер внутренней, округлой формы полости равен $6,95 \pm 0,02$ мм; $6,65 \pm 0,01$ мм и $6,62 \pm 0,01$ мм. Полость заполнена творожистой массой желтовато-белого цвета с крупинками кальцификатов. Толщина стенки соответственно составляет: $1,04 \pm 0,01$ мм; $1,04 \pm 0,01$ мм и $1,05 \pm 0,01$ мм. Гистологическое строение стенки кисты на протяжении указанного периода почти не претерпело изменений. По-прежнему различимы два слоя. На-

ружный слой шириной $0,79 \pm 0,01$ мм; $0,82 \pm 0,01$ мм и $0,84 \pm 0,01$ мм сформирован зрелой соединительной тканью с очаговыми отложениями гиалина. Гиалинизация наиболее выражена на 90 сутки эксперимента. Внутренний слой образован грануляционной тканью. Ее ширина равна $0,25 \pm 0,01$ мм; $0,22 \pm 0,01$ мм и $0,21 \pm 0,01$ мм. Сохраняется изоляция полости кисты от протоковой системы поджелудочной железы. По-прежнему выявляются клетки всех исследованных популяций.

На 60 сутки эксперимента содержание в стенке кисты на 1 мм^2 площади нейтрофильных лейкоцитов – 299 ± 10 ; макрофагов – 389 ± 7 ; фибробластов – 589 ± 4 ; лимфоцитов – 173 ± 4 . Общее количество клеток составляет 1448 ± 9 .

К 75 суткам 1 мм^2 стенки кисты содержит нейтрофильных лейкоцитов – 255 ± 6 ; макрофагов – 352 ± 4 ; фибробластов – 616 ± 5 ; лимфоцитов – 182 ± 2 . Общее число указанных популяций клеток равно 1404 ± 12 .

На 90 сутки в 1 мм^2 стенки кисты содержится нейтрофильных лейкоцитов – 240 ± 4 ; макрофагов – 323 ± 4 ; фибробластов – 604 ± 7 ; лимфоцитов – 175 ± 4 . Их общее количество – 1341 ± 10 .

Гистологическая картина очага криовоздействия в поджелудочной железе с 60 по 90 сутки эксперимента не претерпела значимых изменений.

В зоне замораживания обнаруживаются широкие поля соединительной ткани. Выявляются расширенные выводные протоки, в просвете которых содержится бесструктурная масса.

Таким образом, анализируя полученные данные, можно заключить, что локальная гипотермия в течение 60 секунд в температурном режиме -100°C приводит к формированию псевдокисты поджелудочной железы на 14 сутки эксперимента. Течение патологического процесса соответствует имеющимся в литературе взглядам клиницистов [3, 5]. Предлагаемая модель позволяет уточнить основные закономерности развития псевдокисты и выделить стадии быстрой (14-21 сутки) и медленной (21-90 сутки) трансформации.

Заключение

Модель псевдокисты, основанная на локальном криовоздействии, отличается стабильностью воспроизведения и высокой специфичностью. Полученные морфометрические параметры могут служить банком данных, необходимых для разработки рациональных методов лечения и оценки их эффективности.

Литература

1. Дмитриев, А.В. Этиология, патогенез и лечение панкреатита / А.В. Дмитриев, В.А. Юдин, Н.А. Арапов // Клиническая медицина. – 1989. – Т. 67, № 7. – С. 66-69.
2. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы / Р.В. Васько [и др.]. – СПб: Из-во Питер, 2000. – С. 22-174.
3. Струков, А.И. Механизмы иммунного воспаления / А.И. Струков // Вестник АМН СССР. – 1979. – № 11. – С. 76-84.
4. Филлин, В.И. Острый панкреатит и его осложнения / В.И. Филлин, Г.П. Гидирим. – Кишинев: Штиинца, 1982. – С. 64-75.
5. Цыбиков, Н.Н. Мононуклеарные фагоциты – связующее звено между иммуногенезом и фибринолизом / Н.Н. Цыбиков // Успехи физиологической науки. – 1983. – Вып. 4. – С. 114-123.
6. Bradley, E.L. A clinical based classification system of acute pancreatitis / E.L. Bradley // Arch. Surg. – 1993. – Vol. 128. – P. 586-590.
7. Surgical results for severe acute pancreatitis – comparison of the different surgical procedures / T.L. Hwang [et al.] // Hepatogastroenterology. – 1995. – Vol. 42. – P. 1026-1029.

Поступила 05.02.09