

Д.Ю.Зіненко¹
Т.В.Сухіна²

¹ Миська клінічна лікарня №16

² ОКЗ «Криворізький онкодиспансер»
м. Кривий Ріг

Ключові слова: підшлункова залоза, моделі гострого панкреатиту, щури, мікроциркуляція, гістоструктура.

Надійшла: 21.12.2009

Прийнята: 14.02.2010

УДК: 616.361-007.272:616.37:616-005

ЗМІНИ СТРУКТУРИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ

Дослідження проведено у рамках науково-дослідної роботи „Аналіз нормального й аномального гістогенезу тканинних компонентів серцево-судинної системи людини та експериментальних тварин” (номер державної реєстрації 0105U007837).

Резюме. Використано різні варіанти 2 моделей: 1) модель з інтраперитонеальним введенням L-аргініну в дозах 3 г/кг, 4 г/кг і 5 г/кг; 2) модель з введенням 50 мкл 1%-ного, 2,5%-ного і 5%-ного розчинів таурохолату натрію в протоку підшлункової залози. Гістологічне дослідження й визначення рівня амілази крові проводили через 1, 4, 8, 12, 24, 48 й 72 години після ін'єкції. Проведені дослідження на моделях з інтраперитонеальним введенням L-аргініну й внутрішньопроковим введенням таурохолату натрію виявили збіжну спрямованість у розвитку гострого панкреатиту за динамікою рівня амілази крові, патоморфологічними змінами паренхіми, строми й мікроциркуляції в органі. Для моделі із введенням таурохолату натрію в протоку підшлункової залози більш характерні геморагічні прояви поряд із запальними й некротичними змінами, які мають істотний градієнт від голівки до хвоста залози. Також після застосування таурохолата натрію спостерігається більш швидка, в порівнянні з L-аргініном, відновна динаміка концентрації амілази крові, стану мікросудин і загальної тканинної структури підшлункової залози.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 1. – С. 17-21.

© Д.Ю.Зіненко, Т.В.Сухіна, 2010

Zinenko D.Yu., Sukhina T.V. Changes of pancreatic structure in conditions of an acute pancreatitis modelling.

Summary. Used various variants of 2 models: 1) model with intraperitoneal introduction L-arginin in dozes 3; 4 and 5 g/kg; 2) model with introduction 50 mkl 1 %-s', 2,5 %-s' and 5 %-s' solutions of sodium taurocholol in a channel of a pancreas. Hystologic research and definition of an amylases level in the blood carried out in 1, 4, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after an injection. The lead researches on models with intraperitoneal introduction L-arginin and intrachannel introduction of sodium taurocholol have revealed a similar orientation in development of a sharp pancreatitis on dynamics of an amylases level in the blood and on pathomorphological changes of the parenchyma, stroma and microcirculation in the body. For model with introduction of sodium taurocholol in a channel of a pancreas are more characteristic gemorragical displays alongside with inflammatory and necrotic changes which have an essential gradient from the head to a tail of the gland. It is observed regenerative dynamics of amylase's concentration in the blood condition, of microvessels and the general tissue structure of a pancreas of comparison with L-arginin after application of sodium taurocholol.

Key words: pancreas, models of an acute pancreatitis, rat, microcirculation, histostructure.

Вступ

Після створення моделей гострого панкреатиту за допомогою різних речовин, що підсилюють секрецію залози (Lampel M., Kern H.F., 1977), чинять токсичну (Mizunuma T et al., 1984) або місцеву активуючу дію (Aho H.J. et al., 1980), дослідники показали їх дозозалежний ефект. Однією з легко відтворюваних моделей є інтраперитонеальне введення L-аргініну. У дослідженнях різних авторів (Tani S.et al., 1990; Sakagami J. et al., 1996; Tashiro M. et al., 2001) встановлено, що використання цієї речовини в дозі 2,5 г/кг викликає запальні й некротичні зміни, що є частково оборотними через 3 доби. Більш суттєві

зміни відбуваються при застосуванні доз 4,5 г/кг і 5 г/кг. В експериментах іншого типу в протоку підшлункової залози щурів вводять розчин таурохолата натрію. При цьому також спостерігається розвиток запальних та дегенеративних змін (Aho H.J. et al., 1980; Aho H.J., Nevalainen T.J., 1980). Першими в цій моделі відбуваються дегенеративні зміни з боку епітелію протоки та паренхіми, що пояснюють детергентною дією введеного розчину (Aho H.J., Nevalainen T.J., 1980). Комплекс порушень, що при цьому розвиваються, відносять до геморагічного панкреатиту (Aho H.J. et al., 1980). Останнім часом ці моделі були розроблені й для мишей (Laukkarinen J.M. et al.,

2007). При цьому був встановлений градієнт виразності патологічних змін від голівки підшлункової залози до хвоста, де порушення були мінімальними. У деяких дослідженнях також проводилося вимірювання активності амілази крові (Kubisch С.Н. et al., 2006; Laukkarinen J.M. et al., 2007). Також проведено функціональне вивчення мікрогемодинаміки підшлункової залози за допомогою флуометрії (Винник Ю.С. и соавт., 1997) після моделювання гострого панкреатиту у собак за рекомендаціями В.М.Буянова із співавторами (1989), проте дотепер не було здійснено комплексного морфологічного дослідження різних моделей панкреатиту з урахуванням патоморфологічних змін у залозі й стану мікроциркуляції в органі.

Мета дослідження – виявити ранні мікроциркуляторні та гістоструктурні зміни в тканині підшлункової залози з використанням різних моделей експериментального гострого панкреатиту.

Матеріали та методи

Статевозрілі щури-самці лінії Wistar (вага 150–200 г) утримувалися при звичайних умовах (вільний доступ до їжі й води, температура повітря 22–24°C). У кожній експериментальній групі нараховувалось 5 тварин. Використовували дві моделі: L-аргінінову модель панкреатиту, що дає найбільш швидкий і стабільний результат, та модель із введенням 50 мкл розчину таурохолату натрію в протоку підшлункової залози.

У першій моделі після нічного голодування щурам одноразово інтраперитонеально вводили розчин L-аргініну в дозах 3 г/кг 4 г/кг і 5 г/кг у 0,2 мл фізіологічного розчину в ліву нижню частину черевної порожнини. Для контрольних тварин використовували відповідний об'єм фізіологічного розчину. Експеримент виконувався згідно з С.Н.Кубіш з співавторами (2006). Тварин мертвили за допомогою ефірного наркозу через 1, 4, 8, 12, 24, 48 та 72 години після ін'єкції. Після цього виконували декапітацію для взяття крові з метою визначення активності амілази крові. Експеримент відповідав вимогам Закону України №3447-І від 21.02.06 р. „Про захист тварин від жорстокого поводження.” Тканину залози використовували для гістологічного дослідження голівки, тіла та хвоста підшлункової залози. Також розраховували відносну кількість некротизованих ацинарних епітеліоцитів. Активність амілази крові визначали фотометрично стандартним лабораторним способом (Колб В.Г., Камышников В.С., 1982).

Для реалізації другої моделі гострого панкреатиту проводили загальне знеболювання за допомогою ін'єкції розчину кетаміна в дозі 100 мг/кг. Після серединної лапаротомії здійснювали фіксацію дванадцятипалої кишки й накладали лігатуру на загальну жовчну протоку. Ін'єкцією через антимезентеричний край дванадцятипалої кишки в панкреатичну протоку вводили 50 мкл 1%-ного, 2,5%-ного й 5%-ного розчину таурохо-

лату натрію. Контрольним тваринам було виконано внутрішньопротокове введення 50 мкл фізіологічного розчину. Після операції проводили ушивання рани передньої черевної стінки. Забір матеріалу й крові здійснювали за попередньою схемою. Статистичний аналіз проводили із використанням рангового критерію Ван-дер-Вардена (Лакин Г.Ф., 1990).

Результати та їх обговорення

При гістологічному аналізі після введення L-аргініну в дозах 4 г/кг і 5 г/кг в підшлунковій залозі експериментальних тварин спостерігалися ознаки інтерстиційного набряку, а також нагромадження значної кількості вакуолеподібних структур у цитоплазмі панкреатоцитів вже через 4 години експерименту. На початкових стадіях розвитку панкреатиту спостерігався виразний міжклітинний набряк, міжацинарний простір розширювався (рис. 1А, Б).

Серед ацинусів з нормальною будовою виявлялися групи клітин з деструктивними змінами різного типу. Найбільш характерною була втрата еозинофілії та базальної базофілії цитоплазми, ущільнення ядра, розширення перинуклеарного простору, полярність клітини порушена, ядро займало центральне положення, межі екзокринних клітин ставали нечіткими. Кількість гранул у панкреоцитах різко зменшувалась. Хроматин конденсувався у вигляді великих глибок близько ядерної оболонки або зміщувався до полюсів ядра у вигляді напівмісяців. Виявлялися ознаки розпаду ядра на фрагменти. Також виявлялися некротичні ознаки, включаючи деструкцію ядерної та плазматичної мембран. Через 4 години після ініціації панкреатиту виявлялися групи слабо зафарбованих без'ядерних клітин і їхні фрагменти, між якими розташовувалися окремі кулясті скупчення конденсованого хроматину. У тварин всіх експериментальних груп, незалежно від ступеня тяжкості ушкодження, відзначалася наявність нейтрофільних лейкоцитів у зонах деструкції ацинусів. У тварин, що отримували 3 г/кг L-аргініну, ці зміни виявлялися мінімальними у порівнянні з більшими дозами (рис. 1В, Г).

Некротичні зміни були відзначені через 8 годин експерименту у всіх досліджуваних групах. За даними М.Ташіро зі співавторами (2001), початок некрозу приходить на 7 годину й раніше. Ми також спостерігали зростання вакуолізації після 8 годин експерименту. Максимальна виразність цих змін була властива тваринам у групах, що отримали 4 г/кг і 5 г/кг L-аргініну.

Інфільтрація лімфоїдними елементами була особливо суттєвою в сполучнотканинних структурах, що оточують панкреатичні часточки. Периваскулярний набряк і пошкодження судинної стінки найбільшою мірою відзначалися у складі артеріолярної і капілярної ланок мікроциркуляторного русла. Структура залози підлягала меншим змінам у групі тварин, що одержали L-аргінін у дозі 3 г/кг.

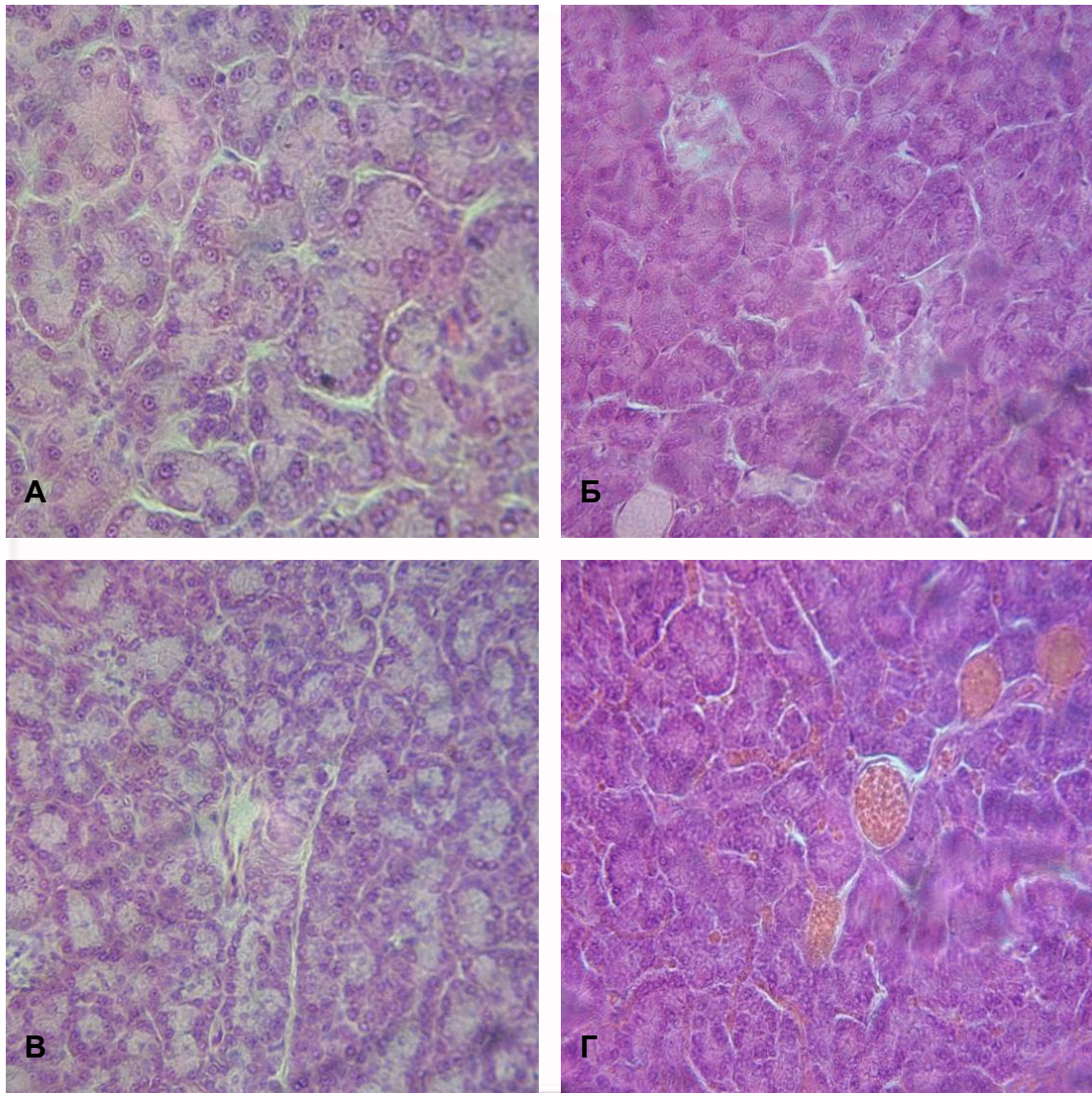


Рис. 1. Стан підшлункової залози щурів при моделюванні гострого панкреатиту після інтраперитонеального введення L-аргініну: А – через 1 годину, доза L-аргініну 3 г/кг; Б – через 1 годину, доза L-аргініну 5 г/кг; В – через 4 години, доза L-аргініну 3 г/кг; Г – через 4 години, доза L-аргініну 5 г/кг. Забарвлення гематоксилином-еозином. $\times 100$.

Після 48 годин патоморфологічні зміни наростали, а деяке поліпшення морфологічної картини ми спостерігали наприкінці 3-ї доби у тварин, що отримували L-аргінін у дозах 3 г/кг і 4 г/кг. При цьому в групі із введенням 4 г/кг стан поодиноких екзокриних елементів підшлункової залози наближався до контролю, а в групі із введенням 3 г/кг їх було значно більше. Більшість ацинусів у групах з введенням 4 г/кг і 5 г/кг демонстрували порушення тканинної архітектури і лише деякі зберігали характерний для нормальної будови трубчастий вигляд на поперечних зрізах. Зберігалися й лейкоцитарні елементи, що були результатом інфільтративних процесів у сполучнотканинних прошарках навколо ацинусів, також з'являлися фібробласти, що свідчило про початок фіброзних змін. Також у стінці артеріол спостерігалися ознаки склерозування. Порушення загальної тканинної структури було

характерним для екзокринних компонентів підшлункової залози, в той час як цитоархітектоніка острівців Лангерганса залишалася без істотних світлооптичних змін.

Патоморфологічні зміни в залозі також мали характер інтерстиційного набряку, лімфоїдної інфільтрації, некротичних та мікросудинних змін з перевагою останніх. Максимальна виразність цих порушень була в моделях із застосуванням 2,5%-ного й 5%-ного розчинів таурохолату натрію й більшою мірою виявлялася в голівці й правій третині тіла залози, тоді як в інших частинах залози вони були помірно виражені.

Геморагічні зміни в голівці залози були представлені порушенням цілісності стінки судин дрібного калібру й капілярів з формуванням внутрішньо- й субкапсулярних крововиливів. Це відзначалося вже через 1 годину після введення

таурохолату натрію. У подальшому зони з найбільшими мікросудинними ушкодженнями демонстрували максимальну виразність некротичних проявів, хронологічна динаміка яких була подібною до такої в моделі панкреатиту із застосуванням L-аргініну. Апоптотичні зміни у вигляді

конденсації хроматину під нуклеолою та переміщення його до полюсів, деформації й фрагментації ядра зустрічалися набагато рідше, ніж це спостерігалось в попередній моделі панкреатиту. Порушення ендокринних структур підшлункової залози були обмеженими або відсутні.

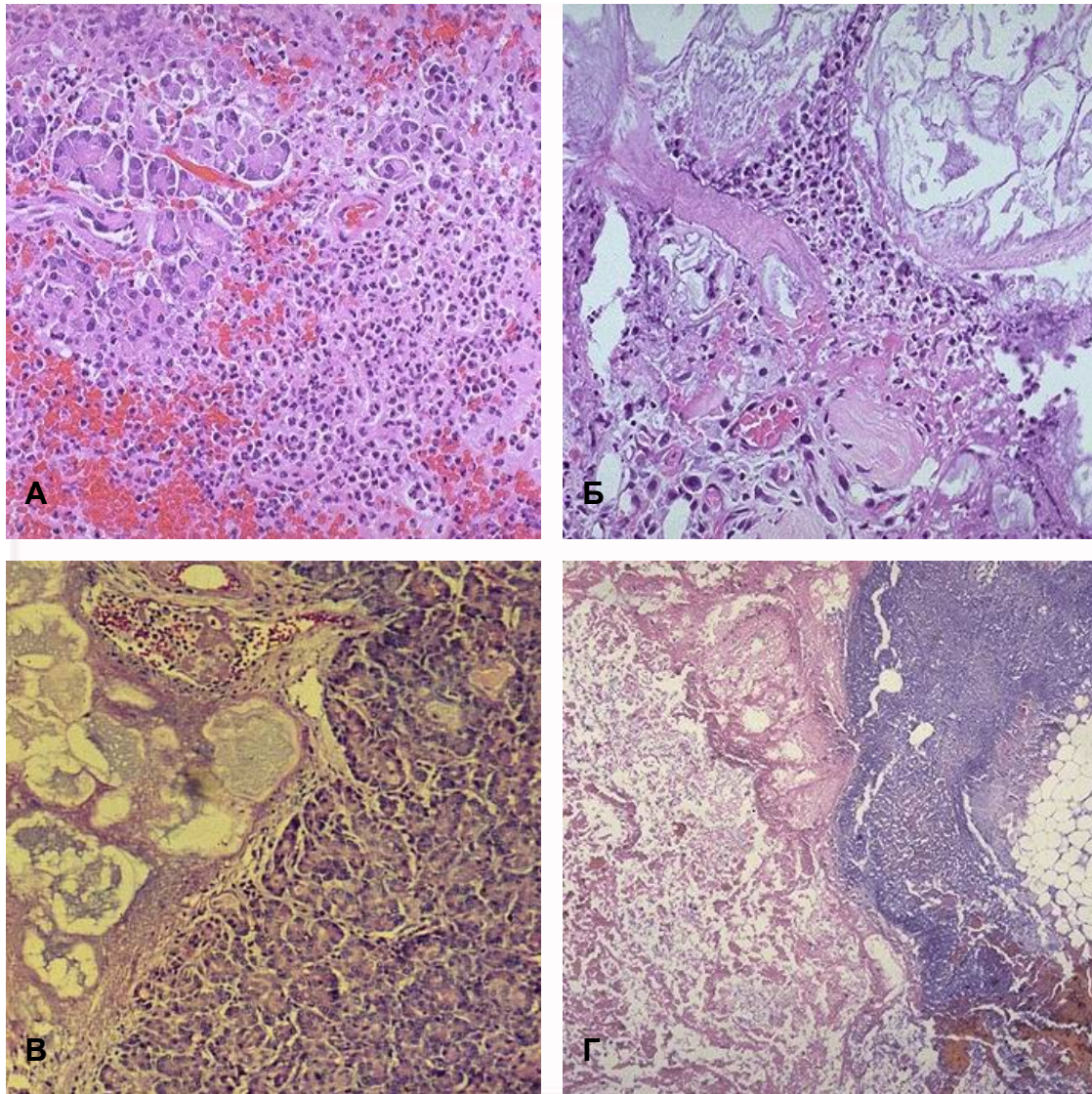


Рис. 2. Стан підшлункової залози щурів при моделюванні гострого панкреатиту після інтраперитонеального введення L-аргініну: А – через 12 годин, доза L-аргініну 4 г/кг; Б – через 12 годин, доза L-аргініну 5 г/кг; В – через 12 годин, доза L-аргініну 5 г/кг; Г – через 24 години, доза L-аргініну 4 г/кг. А, Б, Г – забарвлення гематоксилином-еозином. В – забарвлення за Ван-Гізеном. $\times 50$.

У групі тварин, де використовувався 1%-ний розчин таурохолату натрію, морфологічні зміни в голівці залози були незначними й мали характер поодиноких геморагій. Тіло й хвіст залози в цій групі тварин при гістологічному аналізі істотно не відрізнялися від контролю.

Підсумок

Проведені дослідження на моделях з інтраперитонеальним введенням розчину L-аргініну й внутрішньопотоковою ін'єкцією розчину таурохолату натрію виявили схожість у розвитку гострого панкреатиту щодо динаміки рівня амі-

лази крові, патоморфологічних змін паренхіми, стромы й мікроциркуляції в органі. Патологічні зміни мікросудин після введення L-аргініну поєднуються з дифузним ушкодженням паренхіми підшлункової залози за апоптотичним і некротичним механізмами. Для моделі з використанням таурохолату натрію більш характерними є геморагічні прояви поряд із запальними й некротичними змінами, що мають істотний градієнт від голівки до хвоста залози. Також після застосування таурохолату натрію спостерігається більш швидке в порівнянні з L-аргініном відновлення

рівня амілази крові, стану мікросудин і загальної тканинної структури підшлункової залози.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження моделі гострого панкреатиту спрямовані на з'ясування ультраструктурних основ розвитку даного виду патології.

Літературні джерела

Винник Ю. С. Диагностика нарушений микрогемодинамики при остром панкреатите / Ю. С. Винник, Д. В. Черданцев, А. А. Вахрунин [и др.] // Методология флоуметрии. - М. : Трансоник, 1997. - С. 93-106.

Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии.- 2-е изд., перераб. и доп.- Минск: Беларусь, 1982.- 366 с.

Лакин Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов.- 4-е изд., перераб. и доп.- М.: Высшая школа, 1990.- 352 с.

Моделирование острого панкреатита: / В.М.Буянов, И.В.Ступин, В.Н.Егиев и др. // Клин. хирургия.- 1989.- №11.- С.24-26.

A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of N-taurocholate / J.M.Laukkarinen, G.J.D. Van Acker, E.R.Weiss et al. // Gut.- 2007.- Vol.56, №6.- P.1590-1598.

Aho H.J., Koskensalo S.M., Nevalainen T.J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis // Scand. J. Gastroenterol.- 1980.- Vol.15, №4.- P.411-16.

Aho H.J., Nevalainen T.J. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions // Scand. J. Gastroenterol.- 1980.- Vol.15, №4.- P.417-24.

Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells / M.Tashiro,

C.Schafer, H.Yao et al. // Gut.- 2001.- Vol.49.- P.241-250.

Arginine induced acute pancreatitis alters the actin cytoskeleton and increases heat shock protein expression in rat pancreatic acinar cells / M.Tashiro, C.Schäfer, H.Yao et al. // Gut.- 2001.- Vol.49, №8.- P.241-250.

Early activation of endoplasmic reticulum stress is associated with arginine-induced acute pancreatitis // C.H.Kubisch, M.D.Sans, T.Arumugam et al. // Am. J. Physiol.Gastrointest. Liver Physiol.- 2006.- Vol.291.- P.238-245.

Lampel M., Kern H.F. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue // Virchows Arch.- 1997.- Vol.373.- P.97-117.

L-Arginine-induced experimental pancreatitis / P.Hegy, Z.Jr.Rakonczay, R.Sari et al. // World J. Gastroenterol.- 2004.- Vol.10.- P.2003-2009.

Mizunuma T., Kawamura S., Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas // J. Nutr.- 1984.- Vol.114.- P.467-471.

New model of acute necrotizing pancreatitis induced by excessive doses of arginine in rats / S.Tani, H.Ito, Y.Okabayashi et al. // Dig. Dis. Sci.- 1990.- Vol.35.- P.367-374.

Relationship of plasma CCK to acinar cell regeneration in acute pancreatitis as studied by proliferating cell nuclear antigen / J.Sakagami, K.Kataoka, A.Ohta et al. // Dig. Dis. Sci.- 1996.- Vol.41.- P.1828-1837.

Зиненко Д.Ю., Сухина Т.В. Изменения структуры поджелудочной железы в условиях моделирования экспериментального острого панкреатита.

Резюме. Использовали различные варианты 2 моделей: 1) модель с интраперитонеальным введением L-аргинина в дозах 3 г/кг, 4 г/кг и 5 г/кг; 2) модель с введением 50 мкл 1%-ного, 2,5%-ного и 5%-ного растворов тауроcholата натрия в проток поджелудочной железы. Гистологическое исследование и определение уровня амилазы крови проводили через 1, 4, 8, 12, 24, 48 и 72 часа после инъекции. Проведенные исследования на моделях с интраперитонеальным введением L-аргинина и внутрипротоковым введением тауроcholата натрия выявили сходную направленность в развитии острого панкреатита по динамике уровня амилазы крови, патоморфологическим изменениям паренхимы, стромы и микроциркуляции в органе. Для модели с введением тауроcholата натрия в проток поджелудочной железы более характерны геморрагические проявления наряду с воспалительными и некротическими изменениями, которые имеют существенный градиент от головки к хвосту железы. Также после применения тауроcholата натрия наблюдается более быстрая по сравнению с L-аргинином восстановительная динамика концентрации амилазы крови, состояния микрососудов и общей тканевой структуры поджелудочной железы.

Ключевые слова: поджелудочная железа, модели острого панкреатита, крысы, микроциркуляция, гистоструктура.