

МІКРОЦИРКУЛЯТОРНІ Й ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ У РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ У ЩУРІВ

ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України» (м. Дніпропетровськ)

ivt@dsma.dp.ua

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Аналіз нормального й аномального гістогенезу тканинних компонентів серцево-судинної системи людини та експериментальних тварин» (№ державної реєстрації 0105U007837).

Вступ. Прояви гострого панкреатиту в клініці мають три головні рівні: ураження ацинуса (тканинний рівень), локальних змін у залозі (органний рівень) і системні прояви (рівень організму) [15]. Внаслідок відстроченого клінічного прояву хвороби ранні морфологічні події в ацинусі під час так званої ацинарної фази гострого панкреатиту до кінця не з'ясовані. Після створення моделей гострого панкреатиту за допомогою різних речовин, що підсилюють секрецію залози [10], чинять токсичну [12] або місцеву активуючу дію [7], дослідники показали їх дозозалежний ефект. Однією з легко відтворених моделей є інтраперитонеальне введення L-аргініну. У дослідженнях різних авторів [13,14] 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 [10,11]. Першими в цій моделі відбуваються дегенеративні зміни з боку епітелію протоки та паренхіми, що пояснюють детергентною дією введенного розчину [11]. Комплекс порушень, що при цьому розвиваються, відносять до геморагічного панкреатиту. Останнім часом ці моделі були розроблені й для мишей [5]. 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 [5,9]. Також проведено функціональне вивчення мікрогемодинаміки підшлункової залози за допомогою флуометрії [1] після моделювання гострого панкреатиту у собак за рекомендаціями В.М. Буянова із співавторами [4], 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 при використанні різних моделей експериментального гострого панкреатиту.

Об'єкт і методи дослідження. 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 таурохолата 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. Kubisch зі співавторами [9]. 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 [2].

Для реалізації другої моделі гострого панкреатиту проводили загальне знеболювання за допомогою ін'єкції розчину кетаміна в дозі 100 мг/кг. Після середньої 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 розчинів таурохолата 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 [3].

Результати досліджень та їх обговорення.

Після введення L-аргініну наприкінці 1 години експерименту в крові тварин спостерігалось незначне підвищення рівня амілази, що не залежало від початкової концентрації пошкоджуючого агента (табл. 1). У крові контрольних тварин концентрація амілази становила $1,91 \pm 0,26$ од/мл. Після 4 і 8 годин збільшення рівня цього ферменту в крові було майже дворазовим у моделях із введенням 4 г/кг і 5 г/кг і лише несуттєво зростало в моделі із введенням 3 г/кг L-аргініну. Максимальна концентрація ферменту в крові спостерігалась через 24 години й була характерною для тварин, що одержали різні дози L-аргініну (табл. 1). Зокрема, у групі із введенням 5 г/кг L-аргініну зростання концентрації ферменту було чотириразовим. Зворотна динаміка з відновленням вихідного рівня концентрації ферменту спостерігалась в моделі із введенням L-аргініну в дозі 3 г/кг. Відновлення вихідного рівня концентрації амілази не спостерігалось в групах тварин з дозою L-аргініну 4 г/кг і 5 г/кг. Інволютивна динаміка також була менш виразною. Таким чином, лише в моделі із введенням L-аргініну в дозі 3 г/кг ефект відносно концентрації амілази в крові виявився тимчасовим.

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 вакуолоподібних структур у цитоплазмі панкреатоцитів вже через 4 години експерименту. На початкових стадіях розвитку панкреатиту спостерігався виразний міжклітинний набряк, міжацинарний простір розширювався.

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 панкреатоцитах 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.

Некротичні зміни були відзначені через 8 годин експерименту у всіх досліджуваних групах. За даними М. Tashiro зі співавторами [8], початок некрозу приходить на 7 годину й раніше. Ми також спостерігали зростання вакуолізації після 8 годин ек-

Таблиця 1.

Активність амілази крові щурів (од/мл) при експериментальному панкреатиті після введення різних доз L-аргініну ($M \pm m$)

Час	Доза (г/кг)		
	3	4	5
1 година	$2,34 \pm 0,32$	$2,52 \pm 0,39$	$2,91 \pm 0,45^*$
4 години	$2,56 \pm 0,51$	$3,95 \pm 0,44^*$	$5,13 \pm 0,62^*$
8 годин	$2,62 \pm 0,48$	$4,46 \pm 0,52^{**}$	$5,36 \pm 0,47^{**}$
12 годин	$2,85 \pm 0,42^*$	$5,04 \pm 0,51^{**}$	$6,26 \pm 0,71^{**}$
24 години	$5,33 \pm 0,51^{**}$	$6,91 \pm 0,56^{**}$	$8,24 \pm 0,82^{**}$
48 годин	$2,72 \pm 0,34^*$	$4,21 \pm 0,48^{**}$	$7,29 \pm 0,68^{**}$
72 години	$2,54 \pm 0,38$	$3,95 \pm 0,32^*$	$5,52 \pm 0,56^{**}$

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ у порівнянні з величинами контрольної групи ($1,91 \pm 0,26$ од/мл).

перименту. 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-аргінин у дозі 3 г/кг.

Після 48 годин патоморфологічні зміни наростали, а деяке поліпшення морфологічної картини ми спостерігали наприкінці 3-ї доби у тварин, що отримували L-аргінин у дозах 3 г/кг і 4 г/кг. При цьому в групі із введенням 4 г/кг стан поодиноких екзокр них 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 фіброласти, 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.

Після введення таурохолату натрію виживаність тварин через 72 години експерименту для груп, що одержали 50 мкл 2,5%-ного і 5%-ного розчину, становила 3 із 5 щурів. У групі із введенням 5%-ного розчину виживаність становила 1 із 5 тварин наприкінці 2-ї доби. Динаміка рівня амілази крові в цих групах тварин, у цілому, відповідала аргініновій моделі панкреатиту, проте відновлення її рівня після піка концентрації на 24-й годині дослідження відбувалося більш швидко, ніж у попередній моделі (табл. 2).

Таблиця 2.

**Активність амілази крові щурів (од/мл)
при експериментальному панкреатиті
після введення різних концентрацій
таурохолату натрію ($M \pm m$)**

Час	Концентрація (%)		
	1	2,5	5
1 година	2,25 \pm 0,16	2,21 \pm 0,26	2,32 \pm 0,35
4 години	2,46 \pm 0,33	4,92 \pm 0,63*	4,83 \pm 0,66*
8 годин	2,73 \pm 0,47*	5,61 \pm 0,66**	6,46 \pm 0,72**
12 годин	2,91 \pm 0,44*	6,82 \pm 0,74**	6,93 \pm 0,081**
24 години	3,12 \pm 0,46*	6,51 \pm 0,74**	7,52 \pm 0,81**
48 годин	2,54 \pm 0,32	4,53 \pm 0,56*	5,32 \pm 0,63**
72 години	2,26 \pm 0,23	3,94 \pm 0,47*	4,31 \pm 0,45*

Примітка: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ у порівнянні з величинами контрольної групи (1,91 \pm 0,26 од/мл).

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 пан-

креатиту 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.

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.

Висновки

1. 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 амілази крові, патоморфологічних змін паренхіми, строми й мікроциркуляції підшлункової залози.

2. 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.

Література

1. 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.
2. Колб В.Г. Справочник по клинической химии. – 2-е изд., перераб. и доп. / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия: [Учеб. пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп.] / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
4. Моделирование острого панкреатита / В.М. Буянов, И.В. Ступин, В.Н. Егиев [и др.] // Клин. хирургия. – 1989. – № 11. – С. 24-26.
5. A mouse model of acute biliary pancreatitis induced by retrograde pancreatic duct infusion of Na-taurocholate / J.M. Laukkanen, G.J.D. Van Acker, E.R. Weiss [et al.] // Gut. – 2007. – Vol. 56, № 6. – P. 1590-1598.
6. Aho H.J. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis / H.J. Aho, S.M. Koskensalo, T.J. Nevalainen // Scand. J. Gastroenterol. – 1980. – Vol. 15, № 4. – P. 411-416.
7. Aho H.J. Experimental pancreatitis in the rat. Ultrastructure of sodium taurocholate-induced pancreatic lesions / H.J. Aho, T.J. Nevalainen // Scand. J. Gastroenterol. – 1980. – Vol. 15, № 4. – P. 417-424.
8. 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.
9. 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.
10. Lampel M. Acute interstitial pancreatitis in the rat induced by excessive doses of a pancreatic secretagogue / M. Lampel, H.F. Kern // Virchows Arch. – 1997. – Vol. 373. – P. 97-117.
11. L-Arginine-induced experimental pancreatitis / P. Hegyi, Z. Jr. Rakonczay, R. Sari [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2004. – Vol. 10. – P. 2003-2009.
12. Mizunuma T. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas / T. Mizunuma, S. Kawamura, Y. Kishino // J. Nutr. – 1984. – Vol. 114. – P. 467-471.

13. 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.
14. 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.
15. Steer M.L. Experimental acute pancreatitis: Studies of the early events that lead to cell injury / M.L. Steer, A.K. Saluja // York: Raven. – 1993. – P. 489-526.

УДК: 616.361-007.272:616.37:616-005

МІКРОЦИРКУЛЯТОРНІ Й ПАТОМОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ У РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГОСТРОГО ПАНКРЕАТИТУ У ЩУРІВ

Береговенко І. М., Зіненко Д. Ю., Твердохліб І. В.

Резюме. Метою дослідження було визначення ранніх мікроциркуляторних і гістоструктурних змін у тканині підшлункової залози в різних моделях експериментального гострого панкреатиту у щурів. Проведені дослідження на моделях з інтраперитонеальним введенням L-аргініну й внутрішньопотоковим 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.

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

УДК: 616.361-007.272:616.37:616-005

МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫЕ И ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА У КРЫС

Береговенко И. Н., Зиненко Д. Ю., Твердохлеб И. В.

Резюме. Целью исследования было определение ранних микроциркуляторных и гистоструктурных изменений в ткани поджелудочной железы в разных моделях экспериментального острого панкреатита у крыс. Проведенные исследования на моделях с интраперитонеальным введением L-аргинина и внутрипотоковым введением таурохолата 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 таурохолата 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 таурохолата натрия наблюдается более быстрая по сравнению с L-аргином восстановительная динамика концентрации амилазы крови, состояния микрососудов и общей тканевой структуры поджелудочной железы.

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

UDC: 616.361-007.272:616.37:616-005

MICROCIRCULATION AND PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES OF PANCREAS IN DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS IN RATS

Beregovenko I. M., Zinenko D. Yu., Tverdokhlil I. V.

Abstract. Background. The manifestations of acute pancreatitis in the clinic are three main levels: acinus lesion (tissue level), local changes in gland (organ level) and systemic symptoms (level of the body). Due to delayed clinical manifestations of the disease early morphological events acini during the so-called acinar phase of acute pancreatitis is not fully understood. Until now, there was a complex morphological studies of different models of pancreatitis considering pathological changes in the gland and the state of the microcirculation in the body.

Objective. The purpose of research was definition of early microcirculation and hystosrtructure changes in a tissue of a pancreas in different models of an experimental sharp pancreatitis at rats.

Methods. Used various variants of 2 models: 1) model with intraperitoneal application of L-arginin in doses 3; 4 and 5 g/kg; 2) model with application of 50 mkl 1 %, 2,5 % and 5 % 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.

Results. The lead researches on models with intraperitoneal application of 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 gland. 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. Infiltration of lymphoid elements was particularly sensual in connective tissue structures surrounding pancreatic lobules. Perivascular edema and vascular wall damage observed in most part of

arterioles and capillaries. Structure cancer less subject to changes in the group of animals that received L-arginine at a dose of 3 g/kg. After 48 hours postmortem changes were growing, and some improvement morphological picture we saw at the end of the 3rd day in animals treated with L-arginine in doses of 3 g/kg and 4 g/kg. In the group with the introduction of 4 g/kg single state of exocrine elements pancreas approaching the control group and with the application of 3 g/kg were significantly more. Most of acini in groups with the application of 4 g/kg and 5 g/kg showed abuse of tissue architecture and few maintain normal structure characteristic tubular shape in cross sections. Kept and leukocyte elements that were the result of infiltrative processes in the connective tissue layer around acini also appeared fibroblasts, indicating the beginning of fibrosis. Also in the wall of arteries showed signs of sclerosis. Violation of the total tissue structure was typical of exocrine component of the pancreas, while islets of Langerhans remained without significant microscopic changes.

Conclusion. 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 taurocholat.

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

Рецензент – проф. Проніна О. М.

Стаття надійшла 14.03.2016 року