

Б.Б. Бромберг, А.В. Денисов, Л.С. Онищенко,
Е.В. Зиновьев, К.Н. Демченко, Д.В. Овчинников

Особенности ультраструктуры поджелудочной железы при экспериментальном остром панкреатите

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург.

Резюме. Представлены результаты исследования по моделированию острого панкреатита в эксперименте на крупных лабораторных животных. Авторами предложена оригинальная экспериментальная модель по изучению особенностей течения острого панкреатита, вызванного введением аутожелчи в протоки поджелудочной железы свиньи. Подробно изучен морфогенез экспериментального острого панкреатита в начальную фазу заболевания на ультраструктурном уровне с применением световой и электронной микроскопии. Показано, что при развитии острого деструктивного панкреатита в большей степени деструктивным изменениям подвергается левая доля и тело поджелудочной железы. В правой доле деструктивные изменения менее выражены. При использовании световой микроскопии в ткани поджелудочной железы обнаружены явления выраженного межуточного отека, зернистая дистрофия панкреоцитов, расширение венозных и лимфатических сосудов на фоне артериоспазма. Расширение общего панкреатического протока сопровождалось слущиванием в его просвет эпителия и формированием микроэрозий. Изредка встречались свободные эритроциты, что может свидетельствовать о нарушении гематоканального барьера. Электронная микроскопия позволила выявить наиболее характерные ультраструктурные изменения для ранней фазы заболевания – нарушение структуры ядра (апоптоз), эндоплазматической сети, митохондрий. При этом нарушается синтез и созревание зимогеновых гранул. Вследствие нарушения структуры пенистых (защитных) клеток поджелудочной железы не обеспечивалась защита ее структуры от вредных патогенных воздействий (в нашем эксперименте – аутожелчи). Патоморфологическим изменениям подвергается не только паренхима (клетки, образующие секрет), но и строма железы (фибробласты). Таким образом, весь комплекс установленных на ультраструктурном уровне морфологических нарушений свидетельствует о значительных патофизиологических нарушениях в работе поджелудочной железы и подтверждает обоснованность предложенной экспериментальной модели острого панкреатита.

Ключевые слова: острый панкреатит, капилляростаз, экспериментальный панкреонекроз, световая микроскопия, электронная микроскопия, нарушение микроциркуляции, апоптоз ядер, вакуолизация стромы.

Введение. Острый панкреатит (ОП) занимает одну из ведущих позиций среди острых хирургических заболеваний органов брюшной полости. На его долю приходится около трети от всего количества пациентов, поступающих в хирургические стационары [3–5, 20]. Особый интерес со стороны хирургов представляет острый деструктивный панкреатит (ОДП), который встречается в 15–20% наблюдений, а смертельный исход наблюдается практически у каждого третьего пациента [10]. В начале заболевания смертность связана с развитием панкреонекроза и эндотоксикоза, которые вызывают системную воспалительную реакцию, при прогрессировании которой больной погибает от полиорганной недостаточности. Летальность при деструктивном панкреатите зачастую обусловлена развитием гнойно-септических осложнений [11]. Во многих литературных источниках [1, 2, 10, 12, 16, 17] описаны патоморфологические исследования поджелудочной железы (ПЖ), касающиеся в основном действия различных токсикантов как в медицинской практике, так и в эксперименте.

Цель исследования. Провести углубленное морфологическое (гистологическое и электронно-

микроскопическое) исследование в эксперименте на крупных лабораторных животных для уточнения звеньев патогенеза ОДП.

Материалы и методы. Эксперимент проводился на 5 биообъектах – свиньях породы «вьетнамская вислобрюхая» – массой от 40 до 68 кг в соответствии с существующими нормативными документами, регламентирующими проведение экспериментальных работ [9]. Оперативные вмешательства на животных проводились под общим обезболиванием на аппарате искусственной вентиляции легких (ветеринарный монитор «Zoomed IM10» с принадлежностями фирмы «Shenzhen Adecon Technology Co., Ltd», (Китай)). Выведение животных из эксперимента осуществлялось посредством передозировки KCl 40 мг/мл. Четыре животных составили опытную группу, одно животное было контрольным. ОДП воспроизводили путем интраоперационного введения в проток поджелудочной железы аутожелчи с целью последующего развития панкреонекроза.

Материал для светооптического исследования фиксировали в 10% нейтральном формалине и приготавливали по общепринятым методикам [6]. Из блоков,

залитых в парафин, изготавливали гистологические срезы толщиной 7 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали в световом микроскопе.

Для электронно-микроскопического исследования отбирали биоптаты ПЖ, которые фиксировали в 2,5% растворе глютарового альдегида на фосфатном буфере (рН 7,4). Постфиксацию осуществляли в 1% растворе четырехоксида осмия, приготовленном на фосфатном буфере с сахарозой (рН 7,4) и далее обрабатывали по стандартным методикам [7]. Полутонкие эпонаралдитовые срезы окрашивали толуидиновым синим по методу Ниссля и оценивали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы контрастировали азотнокислым свинцом по Рейнольдсу и уранилацетатом, после чего изучали, используя электронный микроскоп «JEM-100CX» (Япония). Всего исследовано 840 отсканированных электронограмм.

Результаты и их обсуждение. При светооптическом исследовании в некоторых фрагментах ткани ПЖ обнаруживаются явления межуточного отека, зернистая дистрофия панкреоцитов, в других участках – фрагменты жировой клетчатки с явлениями отека, артерии с извитой базальной мембраной (признак артериоспазма). Иногда визуализируются небольшие участки лимфатического узла. Диффузно в ткани ПЖ определяются одиночные расположенные, оптически пустые клетки со смещенным относительно центра небольшим ядром – адипоциты. Встречаются небольшие

(ацинарные) выводные протоки обычного строения. Наряду с указанным выше для общего панкреатического протока стенка выводного протока имеет обычное строение. Между дольками наблюдается выраженный межуточный отек соединительнотканного прослоя ПЖ и в нем – умеренно выраженная диффузная инфильтрация сегментоядерными лейкоцитами и моноцитами. Здесь же в несколько расширенных венах определяется явление краевого прилегания сегментоядерных лейкоцитов. Заметно расширен общий панкреатический проток, а часть его эпителия слущена в просвет с формированием эрозии на небольшом по протяженности участке. Кроме того, в ПЖ встречаются заметно расширенные вены и лимфатические сосуды, отек капсулы и спазм артерий.

При электронной микроскопии в правой доле ПЖ часто встречаются картины очагового некроза в виде разрушения в ряде клеток различных органелл цитоплазмы, наличия вакуолей и липидов, образующих бесформенные скопления. Вблизи этих скоплений находятся редкие каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ЭПС) и слабо осмиофильные гранулы (рис. 1). Иногда вокруг таких участков цитоплазма прозрачна, но вблизи разрушенных органелл встречаются плотные осмиофильные тельца и структуры неясного генеза с плотным осмиофильным ободком и прозрачной сердцевинкой, напоминающие миелиновые волокна (рис. 2), которые, по некоторым сведениям, могут указывать на нарушение перекисного

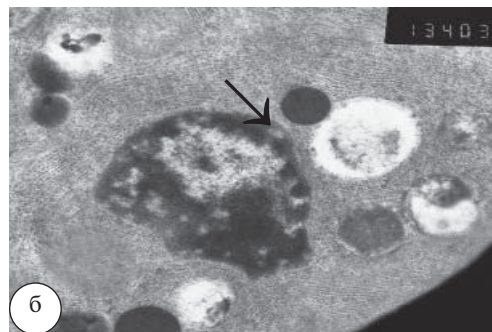
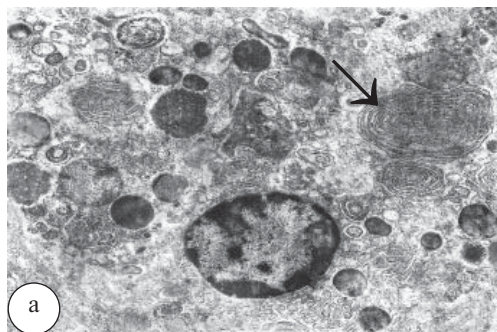


Рис. 1. Очаговый некроз клеток поджелудочной железы: а – клетка с зимогеновыми гранулами и закрученными каналцами ЭПС (стрелка), ув. $\times 8300$; б – митохондрии гигантских размеров с сильно измененной структурой (стрелка) в окружении вакуолей и зимогеновых гранул, ув. $\times 13000$

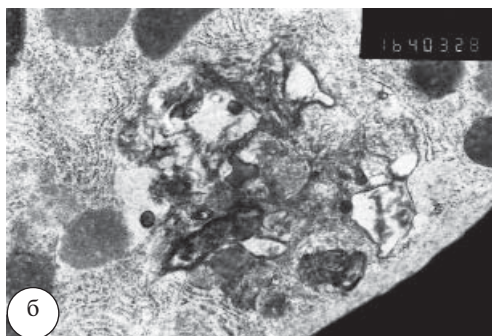
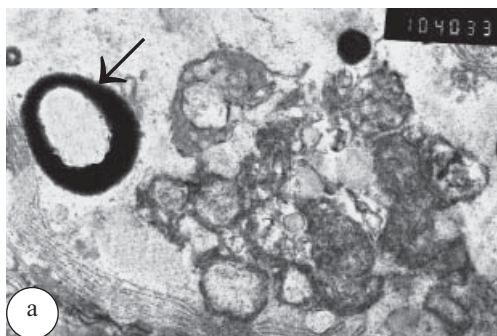


Рис. 2. Структуры различного, иногда неясного генеза вблизи органелл: а – участок с миелиноподобной структурой (стрелка), ув. $\times 10000$; б – участки скоплений деструктивно измененных органелл, содержащих лизосомы, разрушенные митохондрии и ЭПС, ув. $\times 16000$

окисления липидов [12]. Наличие таких структур также свидетельствует в пользу дегенерации части ткани ПЖ, аналогичной описанной при ряде нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваний (рассеянный склероз и другие).

В некоторых крупных клетках, синтезирующих зимогеновые гранулы, ядра имеют признаки апоптоза, неповрежденные гранулы единичны, и, напротив, большая их часть распадалась. Кроме того, наблюдаются клетки с крупными, слабо осmioфильными, но незрелыми зимогеновыми гранулами. Изредка внутри даже в неизмененных участках ЭПС встречаются крупные вакуоли, содержащие волокнистые структуры. Митохондрии могут быть крупными, но слабо осmioфильными, и поэтому матрикс и кристы в них почти неразличимы.

Тело ПЖ при начальной фазе ОДП хорошо васкуляризировано, однако стенки капилляров изменены, и в их просвете в ряде случаев наблюдается капилляростаз (рис. 3). Вблизи некоторых сосудов часто встречаются сильно вакуолизированные клетки с распадающимися гранулами и отдельные очень крупные вакуоли с почти прозрачным содержимым.

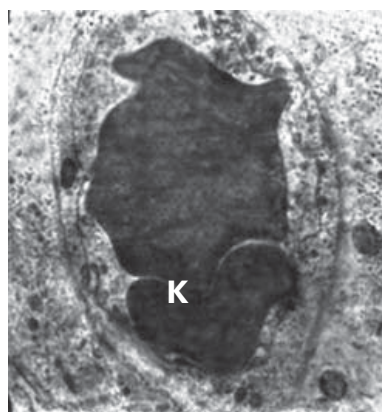


Рис. 3. Капилляростаз капилляров тела ПЖ. Капилляр (К) заполненный эритроцитами, ув. $\times 10000$

Нередко в паренхиме ПЖ встречаются клетки с цитоплазмой пенистого вида. Пенистые клетки, возможно, играют роль макрофагов в ПЖ, но они редко сохраняются, и кроме того, среди них часть клеток имеет

ядра с выраженной картиной апоптоза вплоть до появления ядер в виде апоптоидных телец. При этом чем больше было изменено ядро, тем больше цитоплазма теряет типичный для пенистой клетки вид и в ней больше разрушенных органелл (рис. 4а). В этих клетках увеличивается вакуолизация одних участков цитоплазмы и становятся более плотными другие участки цитоплазмы, возможно, вследствие накопления лизосом. В отдельных случаях пенистые клетки подвергаются некрозу. Пространство вокруг таких разрушающихся пенистых клеток почти прозрачно, и в нем встречаются лишь единичные прерывистые коллагеновые волокна (рис. 4б).

Строма тела ПЖ также нередко сильно изменена, а составляющие ее клетки (фибробласты) частично разрушены и имеют вакуолизированную цитоплазму. Часто ядра их находятся в состоянии апоптоза вплоть до образования апоптоидных телец (рис. 5а). В связи с сильным изменением структуры фибробластов нарушается и структура коллагена. Так, например, он был либо коротковолокнистым, либо прерывистым (рис. 5б). Однако в некоторых участках ПЖ строма организована типичным образом, и коллагеновые волокна в ней сохранены, хотя наблюдалась вакуолизация между коллагеновыми волокнами (рис. 6а, б). Вследствие выраженных морфологических изменений пенистых клеток вплоть до их некроза их функции могут нарушаться (эти клетки выполняют в ПЖ противовоспалительные функции). Поэтому в нашем эксперименте противовоспалительная защита в ПЖ в целом отсутствует, что, по всей видимости, является одним из важнейших факторов, приводящим к появлению участков очагового некроза ПЖ при ОДП.

Бета-клетки ПЖ могут иметь гипертрофические ядра с признаками апоптоза и достаточно большое количество гранул в цитоплазме. Они иногда контактируют с клетками, содержащими крупные (зимогеновые) гранулы, в которых каналы ЭПС образуют закрученные плотные завитки (рис. 7).

В левой доле ядра фибробластов имеются признаки изменений по типу апоптоза. Цитоплазма содержала мелкие и плотные осmioфильные тельца, но какие-либо определенные органеллы в ней почти не встречаются, хотя наблюдавшиеся митохондрии

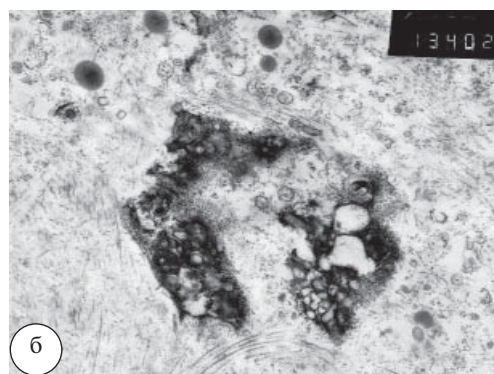
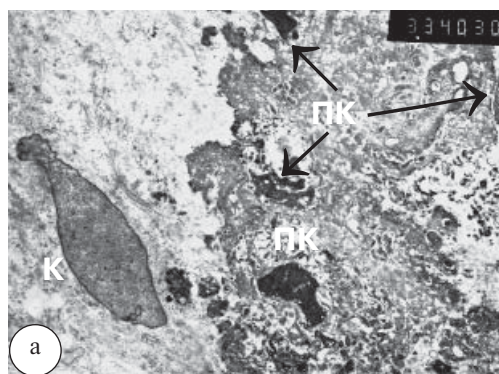


Рис. 4. Участки цитоплазмы пенистых клеток с разрушенными органеллами при ОДП: а – некроз фибробластов (Ф) через 40 мин от начала эксперимента, ув. $\times 3300$; б – некроз пенистых клеток (ПК) через 2 ч от начала эксперимента, ув. $\times 13000$

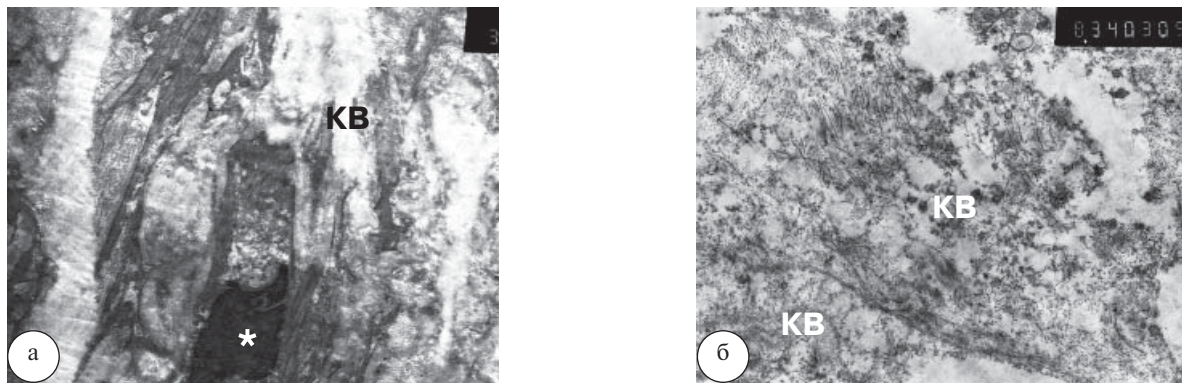


Рис. 5. Ядра клеток в состоянии апоптоза: а – измененные фибробласты (*) и разрушенные пучки коллагеновых волокон (KB), ув. $\times 3300$; б – тонковолокнистый неструктурированный коллаген (KB), ув. $\times 6600$

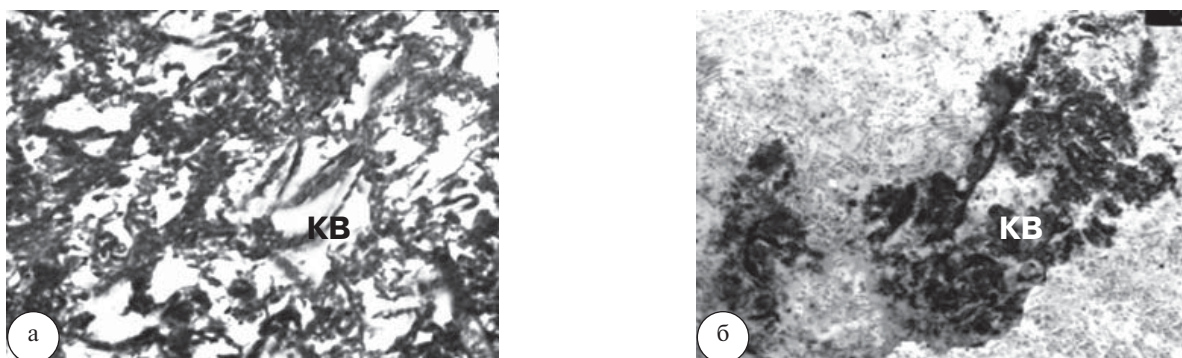


Рис. 6. Изменения в строме клеток поджелудочной железы: а – вакуолизация стромы ПЖ с хаотическим расположением коллагеновых волокон (KB), ув. $\times 3300$; б – гранулярный, сильно измененный осмиофильный коллаген (KB) в почти пустом пространстве ПЖ, ув. $\times 6600$

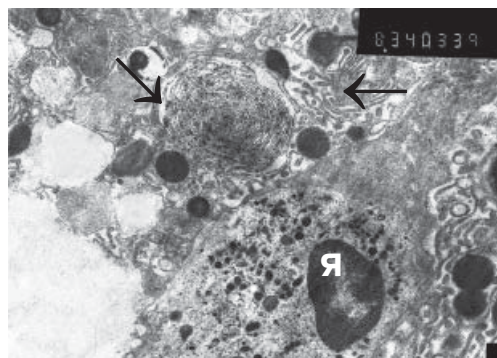


Рис. 7. Бета-клетка ПЖ. Я – бета-клетка ПЖ с гиперосмиофильным ядром, имеющим признаки апоптоза и большим количеством гранул в цитоплазме. Стрелками указаны две закрученные структуры, вероятно, образованные канальцами ЭПС, ув. $\times 8300$

сильно не изменены. Отдельные фибробласты дегенерируют, и при этом участки их цитоплазмы образуют выросты, а в самой цитоплазме наблюдаются крупные вакуоли (рис. 8а). Кроме того, в структуре левой доли при ОДП встречаются скопления мелких гранул неясного генеза, а также участки каких-то клеток, цитоплазма которых заполнена как крупными осмиофильными тельцами неясного генеза и неправильной

формы, так и вакуолями. Можно предположить, что эти тельца представляют собой сильно измененные сосуды с разрушенной стенкой, содержащие эритроциты неправильной формы и располагающиеся вблизи разрушенной стенки сосуда (рис. 8б). Изредка в ткани ПЖ при ОДП встречаются свободные эритроциты, что косвенно свидетельствует о нарушении гематоканевого барьера.

S. Willemer, G. Adler [21] при остром панкреатите отмечали наличие аутофагосом и накопление полиморфных вакуолей с двойной мембраной и разрушенными органеллами. При этом в ацинарных клетках ПЖ уменьшается и количество зимогеновых гранул. Кроме того, наблюдается и специфическое разрушение крист митохондрий, приводящее к превращению их в миелоноподобные структуры. К такому превращению митохондрий (по мнению ряда авторов), возможно, приводит окислительный стресс либо функциональное перенапряжение [8, 12, 19]. Закручивание канальцев ЭПС, по нашему мнению, является свидетельством ее «выключения» из белок-синтезирующих процессов, что также наблюдалось нами после морфофункционального напряжения нейросекреторных клеток гипоталамуса [8]. В литературе [17, 20] описаны и картины апоптоза, наблюдавшиеся нами в ПЖ в данном эксперименте. Таким образом,

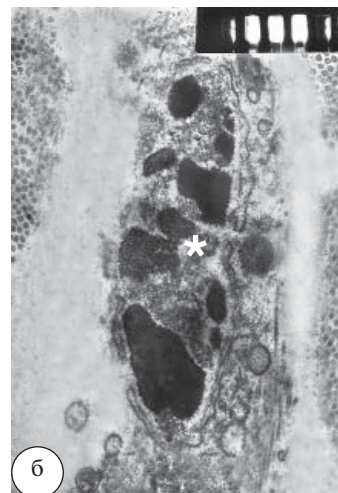
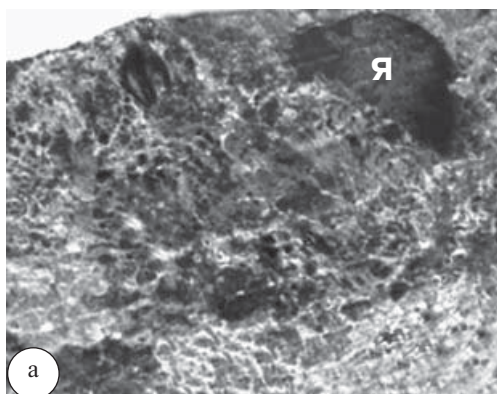


Рис. 8. Патологические изменения структурных элементов стромы ПЖ: а – сильно измененный, возможно, некротизированный фибробласт с очень гиперхромным ядром (Я) и сильно перерожденной цитоплазмой, ув. $\times 5000$; б – структура неясного генеза (*), напоминающая перерожденный сосуд, ув. $\times 10000$

весь комплекс установленных на ультраструктурном уровне морфологических нарушений свидетельствует о значительных патофизиологических нарушениях в работе ПЖ.

Выводы

1. При развитии ОДП в большей степени деструктивным изменениям подвергается левая доля и тело поджелудочной железы. В правой доле деструктивные изменения менее выражены.
2. Наиболее характерными ультраструктурными изменениями для ранней фазы заболевания следует считать нарушение структуры таких важнейших клеточных органелл, как ядро (апоптоз), эндоплазматическая сеть, митохондрии. При этом нарушается синтез и созревание зимогеновых гранул.
3. Вследствие нарушения структуры пенистых (защитных) клеток ПЖ не обеспечивалась защита ее структуры от вредных патогенных воздействий (в нашем эксперименте – аутожелчи).
4. Патоморфологическим изменениям подвергается не только паренхима (клетки, образующие секрет), но и строма железы (фибробласты).

Литература

1. Андреева, С.Д. Морфофункциональные изменения экзокринной паренхимы поджелудочной железы при экспериментальном остром панкреатите / С.Д. Андреева // Иппология и ветеринария. – 2011. – № 2. – С. 72–75.
2. Бархина, Т.Г. Ультраструктурные и молекулярные аспекты изучения клеточных мембран в норме и при патологии / Т.Г. Бархина // Морфология. – 2000. – № 3. – С. 117.
3. Вашетко, Р.В. К вопросу о терминологии и классификации острых панкреатитов / Р.В. Вашетко, К.С. Кремнев // Мат. VII Всеросс. конф. общих хирургов с междунар. участием совместно с Пленумом проблемных комиссий «Неотложная хирургия» и «Инфекция в хирургии» Межведомств. науч. совета по хирургии РАМН и МзисР РФ. – Красноярск, 2012. – С. 15–19.
4. Гостищев, В.К. Лечебно-диагностическая тактика при остром деструктивном панкреатите в зависимости от показателей интегральных шкал тяжести / В.К. Гостищев [и др.] // Мат. VII Всеросс. конф. общих хирургов с междунар. участием совместно с Пленумом проблемных комиссий «Неотложная хирургия» и «Инфекция в хирургии» Межведомств. науч. совета по хирургии РАМН и МзисР РФ. – Красноярск, 2012. – С. 66–71.
5. Ермолов, А.С. Хирургическая помощь при острых заболеваниях органов брюшной полости в Москве в 1995–2009 гг. / А.С. Ермолов, А.П. Турко, П.В. Карнаушенко // Мат. Всеросс. форума «Пироговская хирургическая неделя». – 2010. – С. 43–44.
6. Меркулов, Г.А. Курс патологистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медицина, 1969. – 424 с.
7. Миронов, А.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / А.А. Миронов, Я.Ю. Комиссарчик, В.А. Миронов. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.
8. Онищенко, Л.С. Исследование функциональной морфологии преоптического ядра лягушки (*Rana temporaria* L.) в связи с его физиологической регенерацией: автореф. ... дис. канд. мед. наук. – Л., 1984. – 23 с.
9. Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных: Приказ Министерства выс. и сред. спец. обр. от 13 нояб. 1984 № 742 // Мин. обр. СССР. – 1984. – 11 дек. – С. 14.
10. Савельев, В.С. Панкреонекрозы / В.С. Савельев, М.И. Филимонов, С.З. Бурневич. – М.: Мед. информ. аг-во, 2008. – 264 с.
11. Савищев, А.В. Ультраструктура клеток эндокринной и экзокринной частей поджелудочной железы в неонатальном периоде / А.В. Савищев // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 8. – С. 63–68.
12. Струков, А.И. Патологическая анатомия: учебник / А.И. Струков, В.В. Серов. – 5-е изд., стер. – М.: Литтерра, 2010. – 880 с.
13. Фирсова, В.Г. Острый панкреатит: современные аспекты патогенеза и классификации / В.Г. Фирсова, В.В. Паршиков, В.П. Градусов // Современные технологии медицины. – 2011. – № 2. – С. 127–134.
14. Andriewska, A. Effect of endothelin-1 receptor antagonists on histological and ultrastructural changes in the pancreas and trypsinogen activation in the early course of caerulein-induced acute pancreatitis in rats / A. Andriewska, J.W. Dlugosz, A. Augustynowicz // World J. Gastroenterol. – 2005. – № 11 (8). – P. 1115–1121.

15. Bhatia, M. Apoptosis of pancreatic acinar cells in acute pancreatitis: is it good or bad? / M. Bhatia // J. Cell Mol. Med. – 2004. – № 8 (3). – P. 402–409.
16. Bhatia, M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis / M. Bhatia // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2004. – № 286 (2). – P. 189–196.
17. Miyahara, T. Morphological study of pancreatic endocrine in an experimental chronic pancreatitis with diabetes induced by stress and cerulein / T. Miyahara [et al.] // Ultrastruct. Pathol. – 1999. – № 23 (3). – P. 171–180.
18. Takano, S. Ultrastructural study of the effects of stress on the pancreas in rats / S. Takano [et al.] // Pancreas. – 1994. – № 9 (2). – P. 249–257.
19. Tukaj, C. Ultrastructural aspects of acute pancreatitis induced by 2, 2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) in rats / C. Tukaj [et al.] // Folia Morphol. (Warsz). – 2012. – № 71 (3). – P. 136–141.
20. Vildiri, A. Effect of ischemia reperfusion on B cells of pancreas and protective effects of melatonin treatment / A. Vildiri [et al.] // Int. J. Morphol. – 2009. – № 27 (2). – P. 519–525.
21. Willemer, S. Mechanism of acute pancreatitis. Cellular and subcellular events / S. Willemer, G. Adler // Int. J. Pancreatol. – 1991. – № 9. – P. 21–30.
22. Yadav, D.I. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer / D.I. Yadav, A.B. Lowenfels // Gastroenterology. – 2013. – № 144. – P. 1252–126.

B.B. Bromberg, A.V. Denisov, L.S. Onischenko, E.V. Zinoviev, K.N. Demchenko, D.V. Ovchinnikov

Features of the ultrastructure of the pancreas in experimental acute pancreatitis

Abstract. The article presents the results of a study on the modeling of acute pancreatitis in an experiment on large laboratory animals. The authors have proposed an original experimental model for studying the characteristics of the course of acute pancreatitis caused by the introduction of liver bile into the pancreatic ducts of the pig. The morphogenesis of experimental acute pancreatitis in the initial phase of the disease at the ultrastructural level using light and electron microscopy was studied in detail. It has been shown that with the development of acute destructive pancreatitis, the left lobe and the body of the pancreas undergo more destructive changes. In the right lobe, destructive changes are less pronounced. When using light microscopy in the pancreatic tissue, phenomena of pronounced interstitial edema, granular dystrophy of pancreatocytes, dilation of venous and lymphatic vessels on the background of arteriospasm was found. Expansion of the common pancreatic duct was accompanied by desquamation of the epithelium in its lumen and the formation of microerosions. Occasionally, free erythrocytes were encountered, which may indicate a violation of the hemato-tissue barrier. Results of electron microscopy data showed that the most characteristic ultrastructural changes for the early phase of the disease should be considered a violation of the structure of such important cellular organelles as the nucleus (apoptosis), endoplasmic reticulum, and mitochondria. In this case, the synthesis and maturation of zymogen granules is disturbed. Due to the disruption of the structure of the foamy (protective) cells of the pancreas, its structure was not protected from harmful pathogenic effects (in our experiment, liver bile). Not only the parenchyma (the cells that form the secret), but also the stroma of the gland (fibroblasts) is subject to pathological changes. Thus, the whole complex of morphological disturbances established at the ultrastructural level indicates significant pathophysiological disturbances in the work of the pancreas and confirms the validity of the experimental model of acute pancreatitis.

Key words: acute pancreatitis, capillary stasis, experimental pancreonecrosis, light microscopy, electron microscopy, microcirculation disorder, apoptosis, vacuolation of stroma.

Контактный телефон: 8-911-757-81-68; e-mail: vmeda-nio@mil.ru