

inflammation and disruption of the ICC network. *Neurogastroenterol. Motil.*, 2006, v. 18, p. 53–61.

Поступила в редакцию 19.10.09
Получена после доработки 18.02.10

REACTIVE CHANGES OF SMOOTH MUSCLE TISSUE OF RAT SMALL INTESTINE DURING EXPERIMENTAL INTESTINAL OBSTRUCTION

A.L. Zashikhin, J. Sehlin and A.O. Barmina

Using light, electron microscopy and immunohistochemical methods, the reactive transformation of smooth muscle tissue (SMT) was studied in the intestinal wall during the development of acute partial high intestinal obstruction. The material of small intestine was taken from 10 male rats in both the zone of ligature application, and proximal and distal zones, 3 cm distant from the

ligation zone. The results of the study demonstrate that in partial intestinal obstruction, the nature of structural and functional SMT transformation was variable depending upon differences in functional and destructive loads. During these changes, the remodeling of smooth myocyte population was shown to be one of the mechanisms of SMT adaptation to the changing conditions of functioning. Immunohistochemical analysis found no changes in the pattern of expression of marker and phenotypic proteins in the intestinal zones studied during the dynamics of an experiment.

Key words: *smooth muscle tissue, smooth muscle cells, reactivity, immunohistochemistry, electron microscopy.*

Department of Histology, Cytology and Embryology, Northern State Medical University, Arkhangelsk; Department of Integrative Medical Biology, Umea University, Sweden

© Коллектив авторов, 2010
УДК 616.37-006.2-039-018:599.323.4

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

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ПСЕВДОКИСТЫ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ Кафедра анатомии человека с курсом оперативной хирургии и топографической анатомии (зав. — доц. В.Н. Жданович) Гомельского государственного медицинского университета; ² кафедра нормальной анатомии (зав. — проф. П.Г. Пивченко) Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск

Цель исследования — изучить клеточные популяции нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, фибробластов и лимфоцитов в соединительной ткани стенки псевдокисты поджелудочной железы (ПЖ) с использованием количественных методов. Для моделирования псевдокисты использовали локальное холодное воздействие на ПЖ белой крысы с помощью криохирургического комплекса КСН ЗА/В. Выявлены общее снижение содержания клеток в стенке псевдокисты и смена доминирующих популяций на протяжении исследования. На 14–21-е сутки эксперимента преобладают нейтрофильные гранулоциты, к 30-м суткам доминирующими оказываются макрофаги, которые на 45-е сутки замещаются фибробластами. Наблюдается прогрессивное увеличение количества лимфоцитов в течение эксперимента.

Ключевые слова: *клеточные популяции, псевдокиста, поджелудочная железа.*

Интерес к проблеме псевдокист поджелудочной железы (ПЖ) обусловлен значительным увеличением числа больных с этой патологией, что связано с ростом заболеваемости острым деструктивным панкреатитом [7, 13], при котором, по данным компьютерной томографии и ультразвукового исследования, псевдокисты ПЖ выявляются в 50% случаев [11].

Псевдокисты ПЖ характеризуются склонностью к различного рода осложнениям, частота которых может составлять 20–50%, при этом смертность достигает 40–60% [1]. Однако имеются наблюдения возможности в 15–30% случаев

спонтанного регресса псевдокист, возникших на фоне острого панкреатита, без проведения при этом активных консервативных мероприятий [4]. В литературе в основном освещены клинические аспекты, а данные морфологических исследований ограничиваются указанием на наличие в стенке псевдокисты признаков неспецифического воспаления [2, 10, 14, 15].

Цель настоящего исследования — изучение отдельных клеточных популяций в соединительной ткани стенки псевдокисты ПЖ с использованием количественных методов.

Материал и методы. Эксперименты проведены на 42 нелинейных белых крысах-самцах массой 160–180 г, что позволило исключить гормональное влияние, связанное с эстральным циклом на течение патологического процесса. 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 ч до эксперимента животные не получали пищу; с целью стандартизации условий опыта синхронизации секреторного цикла в клетках ПЖ воду давали в неограниченном количестве.

Операции выполняли с соблюдением правил аспетики и антисептики. Под эфирным наркозом производили срединную лапаротомию. При проведении операции использовали ранорасширитель, криохирургический наконечник и иглодержатель собственной конструкции (патент Республики Беларусь № 3641, 3979 и 4454).

Локальную гипотермию ПЖ проводили с использованием криохирургического комплекса КСН 3А/В (Хирана, Чехословакия) путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника ($t = -140\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 60 с.

Охлажденный участок ПЖ оттаивал в течение 30 с, после чего ее селезеночный сегмент вместе с сальником и селезенкой погружали в брюшную полость. Для манипуляций на ПЖ использовали пинцет собственной конструкции (патент Республики Беларусь № 4891).

Операционную рану ушивали послойно наглухо. Сразу после операции животные получали пищу и воду в неограниченном количестве.

Животных декапировали через 3, 6, 12 и 24 ч, на 3-, 7-, 21-, 30-, 45-, 60-, 75-е сутки после локальной гипотермии ПЖ (на каждую временную точку по 6 особей). Для гистологических исследований брали селезеночный сегмент ПЖ с псевдокистой, фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином—эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону, резорцин-фуксином по Вейгерту. В стенке псевдокисты с помощью окулярной рамки на площади 1000 мкм² при об. 90, ок. 10 в 100 случайно просмотренных полях зрения на 5 срезах у каждого животного подсчитывали количество нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов, макрофагов и фибробластов и пересчитывали на 1 мм² площади среза, определяли общее количество клеток и относительное содержание каждой популяции. Полученные результаты обработали с помощью пакета компьютерных программ статистического анализа «Microsoft Excel 2003» и «Statistica 6.0».

Результаты исследования. Охлажденные ткани ПЖ в использованном режиме вызывает образование ледяного пятна диаметром $9,00 \pm 0,12$ мм. Структурные изменения, вызванные криовоздействием, могут быть определены как отечная-геморрагическая форма острого панкреатита.

На 7-е сутки в полости брюшины содержится незначительное количество фибринозного выпота. Серозные оболочки умеренно отечны. Бляшки стеатонекрозов единичны. В верхнем этаже полости брюшины сформировался инфильтрат, рыхлые спайки которого образованы за счет фиброзных наложений. К очагу повреждения ПЖ и прилегающей к нему парапанкреатической клетчатке фиксирован большой сальник и смежные

органы (желудок, петли кишки, селезенка, левая доля печени). При микроскопии в парапанкреатической клетчатке выявляются поля жирового некроза с лейкоцитарными инфильтратами. Они в совокупности образуют конгломерат, окруженный формирующимся демаркационным валом, представленным скоплением нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, а также лимфоцитов и фибробластов.

После повреждения на 14-е сутки в полости брюшины жидкости не содержится. Сохраняется незначительный отек серозных оболочек. Спайки инфильтрата подверглись рассасыванию. К селезеночному сегменту ПЖ и прилегающей к нему парапанкреатической клетчатке остается фиксирован только большой сальник. В верхнем этаже полости брюшины определяется псевдокиста — подвижное, округлой формы образование с гладкой белесой поверхностью, упругое на ощупь.

При микроскопическом исследовании стенки кисты различимы 2 слоя. Наружный — плотный, состоит из оформленной соединительной ткани. Коллагеновые волокна имеют концентрическое направление. Выявляются фибробласты различной степени зрелости и фиброциты. Внутренний слой более рыхлый, богат клеточными элементами, сформирован грануляционной тканью. Эпителиальная выстилка полости отсутствует. Среди клеточных популяций преобладают палочкоядерные нейтрофильные гранулоциты, макрофаги и фибробласты. Определяются лимфоциты, а также единичные многоядерные гигантские клетки (клетки инородных тел). Стенка псевдокисты содержит кровеносные сосуды, с их преобладанием во внутреннем слое. Полость псевдокисты заполнена тканевым детритом, включающим в себя нейтрофильные гранулоциты в стадии распада. Сообщения полости псевдокисты с протоковой системой ПЖ не выявлено.

После идентификации клеточных элементов в стенке псевдокисты определено наличие нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов, фибробластов, лимфоцитов (таблица).

Установленные морфометрические данные позволяют провести анализ изменений клеточных популяций псевдокисты.

На 21-е сутки эксперимента общее количество клеток на 1 мм² стенки псевдокисты снизилось на 9,8%, нейтрофильных гранулоцитов — на 29,2%. Популяции остальных клеток возросли: макрофагов — на 2,0%, фибробластов — на 10,7% и лимфоцитов — на 33,9%.

На 30-е сутки после криовоздействия общее содержание клеток на 1 мм² стенки псевдокисты снизилось на 15,1%. Отмечено уменьшение нейтрофильных гранулоцитов на 40,2%, а макрофагов, фибробластов и лимфоцитов — увеличилось соответственно на 0,3, 1,7 и 2,7%.

Количество клеток на 1 мм² среза стенки псевдокисты поджелудочной железы крысы ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Наименование клеточных популяций	Срок эксперимента, сутки						
	14-е	21-е	30-е	45-е	60-е	75-е	90-е
Нейтрофильные гранулоциты	1077±6 (49,1)	763±5* (38,6)	455±5* (27,1)	389±6* (25,7)	276±3* (19,0)	254±5* (18,0)	244±3 (18,0)
Макрофаги	590±6 (26,9)	602±5 (30,4)	604±3 (35,9)	425±6* (28,1)	376±5* (25,9)	357±6* (25,3)	311±3 (22,9)
Фибробласты	419±5 (19,1)	464±9* (23,4)	472±4 (23,4)	545±5* (36,1)	639±4* (44,1)	635±5 (45,1)	638±3 (47,0)
Лимфоциты	109,0±2,1 (4,9)	146±4* (7,6)	150±3 (7,6)	152±3 (10,1)	159±3 (11,0)	164±4 (11,6)	164±3 (12,1)
Общее количество клеток исследуемых популяций	2194±12	1979±8*	1680±8*	1510±14*	1449±13*	1408±14	1357±5*

Примечание. В скобках указано относительное содержание клеточных популяций (%); общее количество клеток — 100%.

* Различия значимы по сравнению с показателем предыдущего срока эксперимента при $P < 0,05$.

На 45-е сутки в сравнении с 30-ми количество клеток на 1 мм² среза стенки псевдокисты снизилось на 10,1%, нейтрофильных гранулоцитов — на 14,5% и макрофагов — на 29,6%. Популяции фибробластов и лимфоцитов увеличились соответственно на 15,5 и 1,3%.

На 60-е сутки эксперимента общее количество клеток на 1 мм² среза стенки псевдокисты уменьшилось на 4,0%, нейтрофильных гранулоцитов — на 28,3%, макрофагов — на 11,5%. Числа фибробластов увеличилось на 17,2% и лимфоцитов — на 4,6%.

На 75-е сутки исследования общее количество клеток на 1 мм² стенки псевдокисты уменьшилось на 2,8%, нейтрофильных гранулоцитов, макрофагов и фибробластов — соответственно на 8,0, 5,1 и 0,6%. Сохранилась тенденция роста числа лимфоцитов (на 3,1%).

К завершению эксперимента, на 90-е сутки содержание клеток на 1 мм² среза стенки уменьшалось на 3,6%, выявлено уменьшение числа нейтрофильных гранулоцитов на 3,9% и макрофагов — на 13,0%. Прирост числа фибробластов составил 0,5%. Количество лимфоцитов не изменилось.

Обсуждение полученных данных. По данным литературы [11], в морфогенезе псевдокисты основным патогенетическим фактором является повреждение панкреатических протоков, когда вокруг излившегося панкреатического секрета развивается воспалительная реакция и формируется капсула. Такая концепция патогенеза не дает достаточной ясности для понимания роли различных патологических субстратов, выявляемых в клинической практике при компьютерной томографии и ультразвуковом исследовании, которые инициируют и поддерживают образование псевдокисты.

Существующие немногочисленные способы моделирования псевдокист ПЖ [2, 3] отличаются

значительной технической сложностью, требуют двухэтапных операций. На первом этапе моделируют полость будущей кисты, на втором — формируют сообщение образованной полости с протоковой системой железы. Такие модели травматичны, часто сопровождаются гибелью животных и имеют искусственный характер. Патологический процесс образования псевдокисты ПЖ с самого начала не связан с ее деструктивными изменениями, которые в большинстве случаев являются его причинами.

В основе развития патологических изменений при локальной гипотермии в эксперименте лежит повреждение экзокринных панкреатоцитов с последующим выходом активированных ферментов ПЖ в соединительную ткань и развитие отечно-геморрагической формы панкреатита. Высвобождающиеся ферменты приводят к образованию очагов жировых некрозов, формированию инфильтратов, исходом которых является псевдокиста ПЖ. Отличием ее строения от истинной кисты является отсутствие эпителиальной выстилки на внутренней поверхности стенки.

Предложенный способ воспроизведения псевдокисты методом локального криовоздействия на ПЖ характеризуется отчетливой выраженностью патологического процесса и близостью морфологических проявлений к аналогичной патологии у человека.

Приведенные экспериментальные данные указывают на характерную последовательность клеточных реакций. В течение исследования наблюдалось снижение общего количества клеток в стенке псевдокисты. Это связано с созреванием соединительной ткани, а также снижением активности воспалительного процесса.

Численность нейтрофильных гранулоцитов уменьшалась на протяжении эксперимента. На 14-е и 21-е сутки исследования они занимали доминирующее положение среди клеточных популяций, выполняя очистительную функцию,

переваривая продукты распада тканей [5]. Число макрофагов увеличивалось и достигало максимума на 30-е сутки исследования. Такая смена доминирующих клеточных популяций указывает на иммунный характер процессов, происходящих в псевдокисте. Функция макрофагов не ограничивается фагоцитозом. Известно, что при активации макрофагов они синтезируют и секретируют большое число медиаторов (монокинов), влияющих в том числе на размножение, дифференцировку и функцию фибробластов. Макрофаги регулируют образование и состав межклеточного вещества: с одной стороны, стимулируют синтез коллагена, а с другой — продуцируя коллагеназу, оказывают обратное действие [6, 8, 9, 12].

Содержание фибробластов в стенке псевдокисты прогрессивно увеличивалось с 45-х суток и до завершения исследования, популяция фибробластов преобладала. Стенка псевдокисты характеризовалась избыточным фиброзом, что объясняется постоянным стимулирующим воздействием на макрофаги и фибробласты продуктов распада клеток и тканей, содержащихся в полости кисты.

Установлено, что количество лимфоцитов в стенке псевдокисты увеличивалось на протяжении исследования. Лимфоциты влияют на различные клеточные процессы через секретируемые ими лимфокины, в том числе они стимулируют синтез коллагена, а также выработку коллагеназы макрофагами и фибробластами. Макрофаги, взаимодействуя с лимфоцитами, составляют единое функциональное целое. Известна также способность лимфоцитов ингибировать клеточную пролиферацию [12]. С 60-х суток и до завершения эксперимента изменения численности исследуемых популяций минимальны. В соединительной ткани стенки псевдокисты, вероятно, установилось динамическое равновесие между продукцией и распадом коллагена.

По данным литературы, возможна инволюция соединительной ткани в эксперименте, вплоть до полного ее рассасывания, после окончания воспалительного процесса или удаления инородного тела [5, 8]. Однако в стенке псевдокисты ПЖ инволютивные изменения незначительны, что можно объяснить сохранением ее отграничительной функции.

Таким образом, предложенный способ моделирования псевдокисты ПЖ (патент Республики Беларусь № 12268) отличается высокой специфичностью. Полученные данные могут быть использованы для разработки рациональных методов лечения и оценки их эффективности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вашетко Р.В., Толстой А.Д., Курыгин А.А. и др. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы. СПб., Питер, 2000.

2. Вилявин Г.Д., Кочиашвили В.И. и Калтаев К.К. Кисты и свищи поджелудочной железы. М., Медицина, 1977.
3. Костырной А.В. Моделирование ложной кисты поджелудочной железы: разработка концепции патогенеза и способа инструментального лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Харьков, 1992.
4. Мишин В.Ю. и Квезерова А.П. Современный подход к лечению псевдокист поджелудочной железы. *Анналы хирургии*, 2000, № 3, с. 32–39.
5. Общая патология человека. Под ред. А.И. Струкова, В.В. Серова и Д.С. Саркисова. М., Медицина, 1990, т. 2.
6. Пауков В.С., Даабуль С.А. и Беляева Н.Ю. Роль макрофагов в патогенезе ограниченного воспаления. *Арх. пат.*, 2005, т. 69, № 4, с. 3–9.
7. Пугаев А.В. и Ачкасов Е.Е. Острый панкреатит. М., Профиль, 2007.
8. Серов В.В. и Шехтер А.Б. Соединительная ткань. М., Медицина, 1981.
9. Струков А.И. и Кауфман О.Я. Гранулематозное воспаление и гранулематозные болезни. М., Медицина, 1989.
10. Толстой А.Д., Панов В.П., Красногоров В.Б. и др. Паранепанкреатит. Этиология, патогенез, диагностика, лечение. СПб., Ясный свет, 2003.
11. Филин В.И. и Костюченко А.Л. Неотложная панкреатология. СПб., Питер, 1994.
12. Юрина Н.А. и Радостина Н.А. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани. М., Изд-во Ун-та дружбы народов, 1990.
13. Яцкий Н.А., Седов В.М. и Сопия Р.А. Острый панкреатит. М., МЕДпресс-информ, 2003.
14. Bradley E.L. A clinical based classification system of acute pancreatitis. *Arch. Surg.*, 1993, v. 128, p. 586–590.
15. Hwang T.L., Chiu C.T., Chen H.M. et al. Surgical results for severe acute pancreatitis — comparison of the different surgical procedures. *Hepatogastroenterology*, 1995, v. 42, p. 1026–1021.

Поступила в редакцию 26.03.09
Получена после доработки 27.11.09

ANALYSIS OF THE CHANGES OF CELLULAR POPULATIONS OF THE DUODENAL PSEUDOCYST IN THE EXPERIMENT

S.V. Doroshkevich, P.G. Pivchenko, Ye.Yu. Doroshkevich

The purpose of the research was to study, using the quantitative methods, the cellular populations of neutrophilic granulocytes, macrophages, fibroblasts and lymphocytes in the connective tissue of the wall of the pancreatic pseudocyst. Local cold application to the pancreas of albino rat with the help of KCH 3A/B cryosurgical complex was used for the modeling of the pseudocyst. General decrease in the cell content in wall of the pseudocyst was detected together with the changes of predominant cell populations during the study. At days 14–21 of the experiment, the neutrophilic granulocytes were found to dominate, by day 30 the dominating cells were the macrophages, which were substituted by fibroblasts at day 45. The progressive increase of the number of lymphocytes was found throughout the the experiment.

Key words: *cellular populations, pseudocyst, pancreas.*

Department of Human Anatomy with the Course of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Gomel State Medical University; Department of Normal Anatomy, Belorussian State Medical University, Minsk