

Морфологическое обоснование профилактики послеоперационного панкреатита низкоинтенсивным лазерным излучением в эксперименте

Гродненский государственный медицинский университет

Исследование посвящено изучению влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на течение послеоперационного панкреатита. Эффективность терапии оценивали на основании морфологических методов исследования. Было выявлено, что применение низкоинтенсивного лазерного излучения способствует уменьшению степени воспалительной реакции органа при послеоперационном панкреатите, ускоряет процессы репаративной регенерации. Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, послеоперационный панкреатит, световая микроскопия, электронная микроскопия.

Благодаря усовершенствованию оперативной техники, появлению эффективных препаратов для заместительной терапии значительно расширились показания к хирургическим вмешательствам на поджелудочной железе. Различные виды резекций поджелудочной железы остаются самыми распространёнными вмешательствами на этом органе [2, 5, 6]. Одним из основных осложнений, которые развиваются после резекции поджелудочной железы, является послеоперационный панкреатит, который встречается у 1,9-20,1% пациентов [1, 4]. В экспериментальных исследованиях (Ложко П.М.) доказано, что выполнение резекции поджелудочной железы даже с применением прецизионной техники и соблюдением принципа анатомичности все равно всегда приводит к развитию послеоперационного панкреатита в области резекции. Таким образом, разработка способов профилактики развития послеоперационного панкреатита, при операциях на поджелудочной железе, является актуальной задачей.

Материал и методы

Нами было проведено исследование по изучению влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на течение послеоперационного панкреатита. Исследования проводились на белых беспородных крысах самцах массой 200-250 г с чистой и гладкой шерстью и нормальной поведенческой активностью, находившихся на стандартном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде, с естественным световым режимом. Послеоперационный панкреатит моделировали путем резекции дистальной части поджелудочной железы под внутримышечным калипсоловым наркозом. Животные были разделены на две группы: контрольная – резекция, без последующего лечения; опытная – резекция с однократным интраоперационным и последующим чрезкожным в зоне проекции облучением гелий-неоновым лазером (мощность 20 мВт; длина волны 632,7 нм; продолжительность облучения 5 мин; кратность 1 раз в сутки; курс – 7 дней). Животных выводили из опыта на 7 сутки после операции. Результаты экспериментов оценивали с применением следующих методов: микроскопическое исследование микроциркуляторного русла препаратов поджелудочной железы, инъецированных тушью-желатином; микроскопия препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону; электронная микроскопия препаратов фиксированных 1% раствором четырехоксида осмия на 0.1 М буфере Миллонига [7], контрастированных 2%-ым раствором уранилацетата на 50% метаноле [9] и цитратом свинца по E.S. Reynolds [8].

Результаты и обсуждение

В первой серии опытов (контрольная группа) было выполнено 10 операций. Все животные в течение 12 часов после операции были вялыми, заторможенными, медленно передвигались по клетке. Наблюдалось учащение дыхания, выраженная тахикардия, послабление стула. К концу первых суток послеоперационного периода состояние животных стабилизировалось: крысы стали активными, принимали пищу, пили воду, происходила нормализация функций дыхательной и сердечно-сосудистой систем, а также физиологических отравлений.

При аутопсии в контрольной группе животных брюшина была без видимых макроскопических изменений, выпота не наблюдалось. В области резекции отмечался спаечный процесс, незначительная отечность культи железы, которая также имела красноватый цвет и была плотновата на ощупь. В 2 случаях были обнаружены в зоне спаек культи с сальником плотноэластические образования, представляющие собой на разрезе инкапсулированные гнойно-некротические массы. При гистологическом исследовании определялся клеточный детрит, окруженный хорошо выраженной пиогенной мембраной, обильно инфильтрированной лейкоцитами. В окружающей ткани железы определялись дистрофические изменения. Микроскопически на препаратах, инъецированных тушью-желатином, в области резекции наблюдали формирование редкой полиморфной капиллярной сети.

На полутонких срезах, окрашенных метиленовым синим, и частично на ультратонких срезах, отмечали образование грануляционной ткани, расположенной вокруг шовного материала и на границе со здоровой тканью поджелудочной железы. В прилежащих отделах железы наблюдались дистрофические и атрофические изменения паренхимы, сохранялась воспалительная инфильтрация, очаговые некрозы. Грануляционная ткань была представлена расширенными кровеносными капиллярами и клеточными элементами. Стенки кровеносных капилляров были утолщены (рис. 1), за счет чего просветы их несколько сужены.

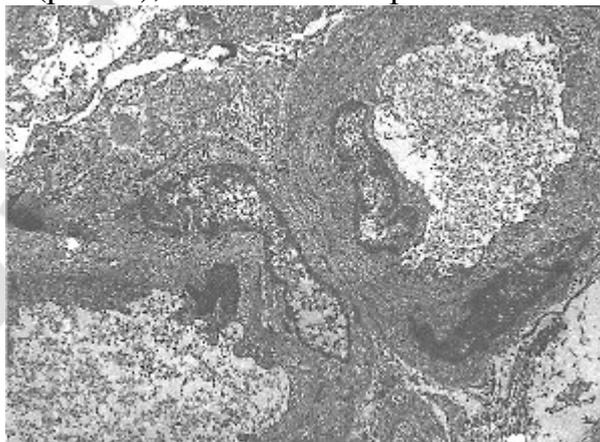


Рис. 1. Грануляционная ткань представлена расширенными и утолщенными кровеносными капиллярами и клеточными элементами. Контрастирование уранилацетат. Ув.х9600

В ацинарных клетках, расположенных вблизи шовного материала, ядра приобретали удлинённую форму, с мелкозернистым хроматином и формированием крупных гранул в кариоплазме и возле внутренней ядерной мембраны (рис. 2). Ядрышки отличались в одних клетках мелким, в других крупным размером, с преимущественно гранулярным компонентом, были локализованы, как правило, эксцентрично. Ядерные поры были отчетливые, крупные, многочисленные. Эти

наблюдения указывали на активацию ядерного аппарата, которая имела разную степень интенсивности в различных, часто, рядом расположенных, клетках.

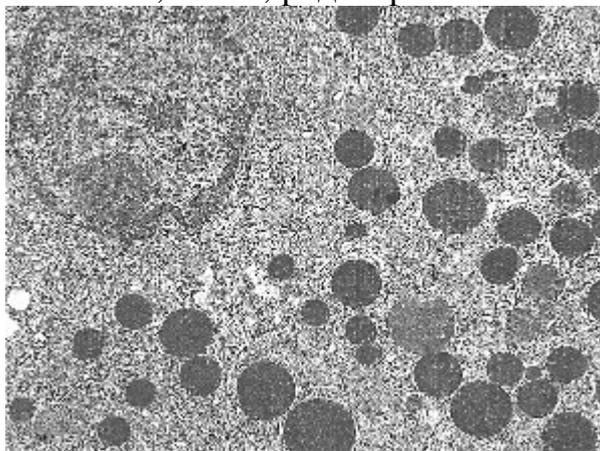


Рис. 2. Стадия накопления секрета, преимущественно зрелые зимогеновые гранулы, картина их тесного контакта между собой и с митохондриями, умеренное расширение цистерн ГрЭС, ядра с мелкозернистым хроматином и формированием крупных гранул в кариоплазме и возле внутренней ядерной мембраны, обилие ядерных пор. Контрастирование уранилацетат. Ув.х19600

Митохондрии в большинстве клеток были немногочисленные, овальной формы, с умеренным количеством крист, матриком средней электронной плотности (рис. 3). Лишь в отдельных ацинарных клетках наблюдалось локальное просветление матрикса и лизис крист отдельных органелл. Зоной преимущественной локализации их являлись участки цитоплазмы, примыкающие к плазматической мембране. Именно в этой зоне происходят основные обменные процессы между клеткой и межклеточным пространством. Эти процессы протекают с большой затратой энергии и митохондрии там необходимы как источник энергии.

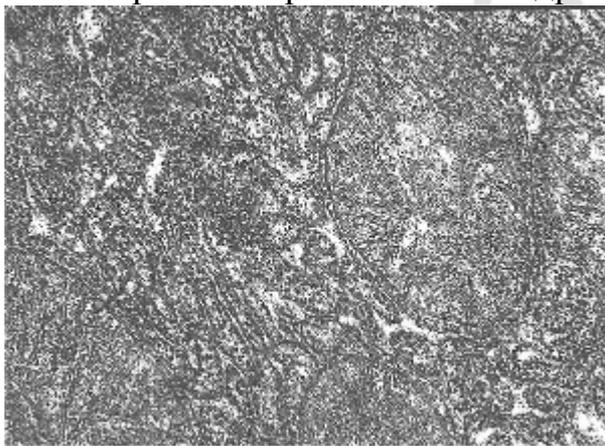


Рис. 3. Митохондрии овальной формы, с умеренным количеством крист, матриком средней электронной плотности. ГрЭС сильно развита: умеренно расширенные цистерны с многочисленными связанными рибосомами. Контрастирование уранилацетат. Ув.х58000

Гранулярная эндоплазматическая сеть была сильно развита и представлена умеренно расширенными цистернами с многочисленными связанными рибосомами. Последнее наблюдение свидетельствует о выработке большого количества транспортного белка «на экспорт» (рис. 2 и 3).

Комплекс Гольджи был представлен уплощенными цистернами и крупными конденсационными вакуолями со слабо осмиофильным содержимым, расположенный, как правило, между ядром и апикальным отделом ацинарной

клетки. В цитоплазме клеток регистрировалось большое число зимогеновых гранул различных размеров, преимущественно зрелых, не интенсивно черного цвета, локализованных большей частью в апикальной зоне клеток. Выявлялись также единичные гранулы прозимогена и незрелые гранулы. Достаточно часто наблюдалась картина их тесного контакта между собой и с митохондриями (рис. 2). В обычных условиях ацинусы находятся на разных стадиях цикла. Судя по количеству, составу и расположению зимогеновых гранул, секреторные клетки находились преимущественно на стадии накопления или выделения секрета (рис. 2), которое происходило по мерокриновому типу.

Просветы центрoацинозных протоков, как правило, были расширены и заполнены содержимым умеренной или повышенной электронной плотности, т.е. секретом. Ворсинки в них были редуцированы и укорочены. В ацинусах определялись единичные двоядерные клетки и «темные» клетки. Последние характеризовались более электронно-плотной цитоплазмой, большим количеством митохондрий и плотно расположенными мембранами гранулярной эндоплазматической сети, что свидетельствовало об их большей функциональной активности.

Таким образом, в ацинарных клетках, на границе с шовным материалом существенных деструктивных изменений не выявлено. Регистрировались морфологические признаки, указывающие на повышенную биосинтетическую активность. В секреторном цикле в одних ацинусах преобладала стадия накопления секрета, в других выявлялось значительное количество выделенного секрета в просветах центрoацинозных протоков.

Во второй серии опытов (опытная группа) выполнено 10 операций. Все прооперированные животные в опытной группе выжили. Послеоперационный период у крыс протекал сравнительно легко, в их состоянии и поведении наблюдалась положительная динамика. По истечении 6 часов после резекции и облучения низкоинтенсивным лазерным излучением животные передвигались по клетке, пили воду, дыхание и число сердечных сокращений было незначительно учащено. К исходу первых суток послеоперационного периода их состояние значительно улучшалось: нормализовалась работа дыхательной и сердечно-сосудистой систем, возрастала двигательная активность, диспепсические явления не наблюдались.

Вскрытие животных показало отсутствие видимых макроскопических изменений со стороны брюшины. Спаечного процесса в области культи поджелудочной железы и ее отечности не отмечали. Она была бледно-розового цвета, эластическая на ощупь. На препаратах, инъецированных тушью, структура сосудов сохранялась на всем протяжении. Некоторые сосуды были деформированы, междолевые вены расширены, формировались коллатеральные пути интраорганного кровообращения. На гистологических препаратах в области резекции разрасталась грануляционная ткань богатая капиллярами, плазматическими клетками и фибробластами; в прилежащих участках поджелудочной железы наблюдались дистрофические изменения в ацинарных клетках, умеренно выраженная воспалительная инфильтрация, мелкоочаговые некрозы, расширение протоков.

Облучение резецированной поджелудочной железы лазером низкой интенсивности вызывало ряд ультраструктурных изменений в ацинарных клетках и соединительно-тканной строме. Вокруг шовного материала наблюдалось

разрастание соединительной ткани с преобладанием коллагеновых волокон, часто обладающих повышенной электронной плотностью, и фибробластов (рис. 4). Встречались безмякотные нервные волокна, окруженные фибриллами коллагеновых волокон (рис. 4). Клеточные элементы выявлялись редко. Указанные морфологические признаки свидетельствовали о более быстром созревании грануляционной ткани под воздействием лазера и трансформации ее в соединительную ткань.

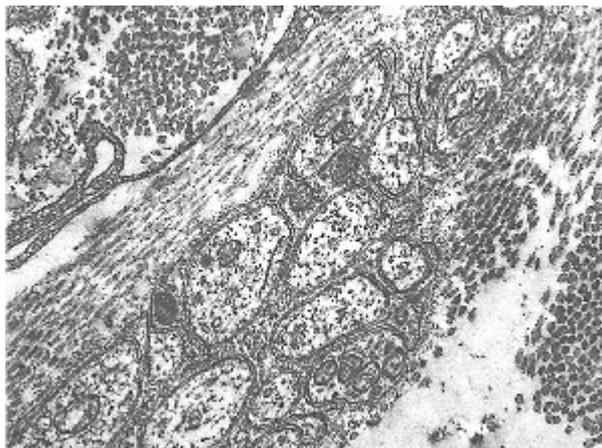


Рис. 4. Разрастание соединительной ткани с преобладанием коллагеновых волокон повышенной электронной плотности и фибробластов. Безмякотное нервное волокно, окруженное фибриллами коллагеновыми волокнами. Контрастирование уранилацетат. Ув.х38000

Ацинарные клетки отличались выраженной гетерогенностью цитоплазматического матрикса. Резко возросло число «темных» клеток (в 2-3 раза), по сравнению с контрольной группой (рис. 5). Увеличение числа «темных» клеток в поджелудочной железе обычно наблюдается при ее повышенной функциональной активности, когда идет стимуляция выброса секрета. Количество этих клеток также увеличивается при приеме жирной пищи, при стимуляции железы пилокарпином [3]. «Темные» клетки являются либо резервными («покоящимися»), позже вступающими в фазу синтеза секрета, либо такими, в которых синтез пищеварительных ферментов занимает более длительный срок. Наряду с «темными» и «светлыми» клетками выявлялись «промежуточные».

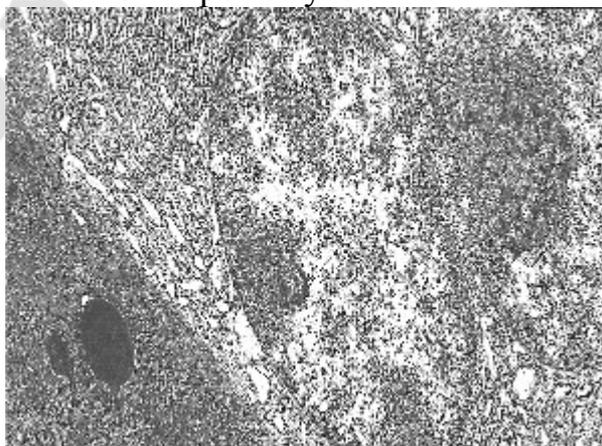


Рис. 5. Ядра удлиненной формы, содержат крупное, эксцентрично расположенное ядрышко, с преимущественно гранулярным компонентом, широкие отчетливые поры в ядерной оболочке. Контрастирование уранилацетат. Ув.х20000

Возрастало количество двуядерных ацинарных клеток, причем как «светлых» так и «темных» (рис. 5). Ядра большинства клеток приобрели удлиненную форму

(рис. 5), содержали крупное, эксцентрично расположенное ядрышко, с преимущественно гранулярным компонентом. Отмечались широкие отчетливые поры в ядерной оболочке. В ядрах отдельных ацинарных клеток значительно увеличивалось количество ядрышкового материала.

Митохондрии содержали многочисленные кристы, матрикс умеренной электронной плотности. Во многих ацинарных клетках отмечалось набухание матрикса митохондрий и приобретение наружной мембраной органелл волнистых очертаний (рис. 6), что способствует увеличению поверхностной плотности органелл, чаще встречались гипертрофированные формы. Подобные структурные изменения митохондрий указывают на возрастание их функциональной активности.

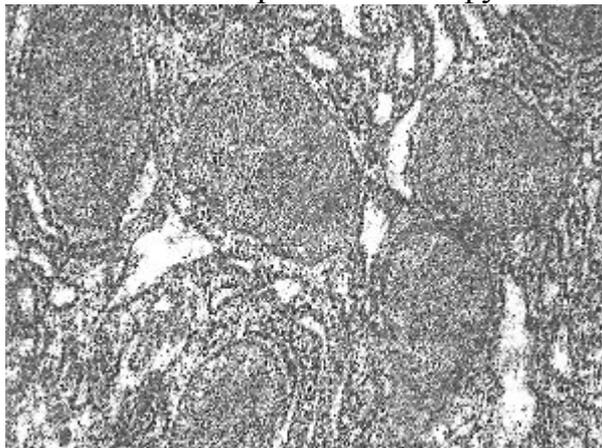


Рис. 6. Митохондрии с многочисленными кристами, матрикс умеренной электронной плотности, набухание матрикса митохондрий и приобретение наружной мембраной органелл волнистых очертаний. Контрастирование уранилацетат. Ув.х58000

Гранулярная эндоплазматическая сеть была сильно развита, цистерны ее с многочисленными связанными рибосомами практически равномерно плотно заполняли всю цитоплазму ацинарных клеток, как в базальном отделе, так и в апикальном (рис. 7). Кроме того, между цистернами гранулярной эндоплазматической сети выявлялось множество свободных рибосом. Эти морфологические признаки являются показателем активации биосинтеза как транспортного белка, так и для собственных нужд клеток. В «светлых» клетках цистерны гранулярной эндоплазматической сети, как правило, были расширены, в промежуточных – в меньшей степени, в «темных» были представлены плотно упакованными параллельными мембранами (рис. 7).

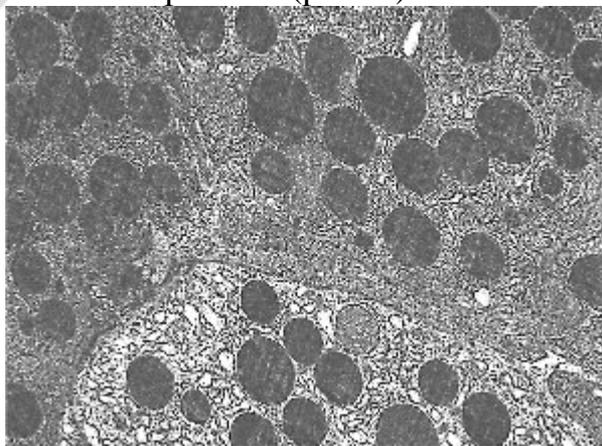


Рис. 7. ГрЭС сильно развита: цистерны с многочисленными связанными рибосомами равномерно плотно заполняют всю цитоплазму ацинарных клеток,

множество свободных рибосом. В «светлых» клетках цистерны расширены, в промежуточных – в меньшей степени, в «темных» представлены плотно упакованными параллельными мембранами. Контрастирование уранилацетат. Ув.х14400

Комплекс Гольджи был представлен стопкой уплощенных цистерн и крупными вакуолями с электронно-светлым содержимым, часто имел расплывчатые структуры. В ацинарно-островковых клетках комплекс Гольджи был сильно развит, при этом в одной клетке выявлялись три-четыре фрагмента его компонентов, состоящих из уплощенных цистерн с мешочками на концах.

В результате лазерного воздействия в цитоплазме ацинарных клеток появлялись довольно многочисленные вторичные образования в виде электронно-плотных структур или ограниченных мембраной вакуолей с электронно-светлым содержимым и мембранными структурами. Последние являются автофагосомами, появление или увеличения числа которых свидетельствует об обновлении и постепенном замещении (путем резорбции) использованных белков.

Характерно, что в отличие от предыдущей группы, в примерно одной трети «светлых» ацинарных клеток как в пределах одного ацинуса, так и в разных ацинусах преобладают незрелые гранулы зимогена и гранулы прозимогена (рис. 8). Это обстоятельство указывало на преобладание стадии созревания секрета над накоплением. При этом незрелые гранулы зимогена имели нетипичный вид, обусловленный характером распределения секрета в гранулах. В остальных ацинарных клетках выявлялись преимущественно зрелые гранулы зимогена интенсивно черного цвета, которые местами тесно контактировали друг с другом и локализовались большей частью в апикальном отделе (стадия накопления и выделения секрета) (рис. 8). Принято считать, что асинхронизм в секреторном цикле в ацинусе обусловлен наличием «темных» клеток, динамика секреции которых отличается от остальных «светлых» клеток.

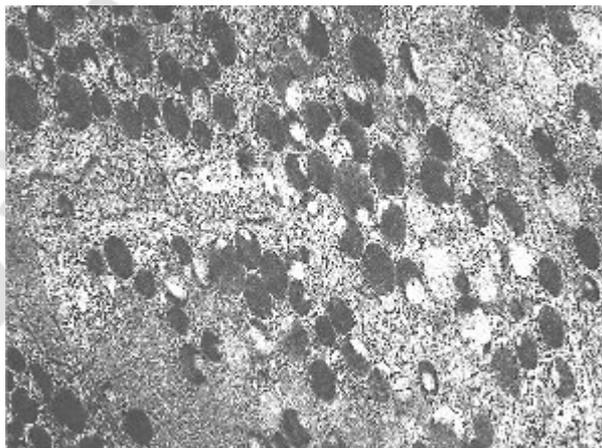


Рис. 8. Зрелые, незрелые гранулы зимогена и гранулы прозимогена. Контрастирование уранилацетат. Ув.х14400

Центроацинозные протоки отличались многочисленными микроворсинками и отчетливыми соединительно-тканными комплексами. На полутонких и ультратонких срезах отмечалась пролиферация островковой ткани.

Таким образом, при резекции поджелудочной железы в результате воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения, регистрируется ускорение созревания грануляционной ткани в области травмы с трансформацией последней в соединительную ткань. Резко возрастают репаративные процессы в ацинарных

клетках, морфологическим показателем которых является значительное увеличение числа двудерных и «темных» клеток. В соответствии с этим повышается биосинтетическая активность в клетках, о чем свидетельствует активация ядерного аппарата, гранулярной эндоплазматической сети и митохондрий. Усиливаются процессы катаболизма, наблюдается более выраженный ассинхронизм секреторного цикла в ацинусах. Стимулируется пролиферация островковой ткани.

Выводы:

На основании полученных данных можно сделать вывод, что низкоинтенсивное лазерное излучение уменьшает выраженность воспалительной реакции, стимулирует образование и созревание соединительной ткани в области резекции поджелудочной железы. Под воздействием низкоинтенсивного лазерного излучения в культе поджелудочной железы коррегируются микроциркуляторные нарушения, ускоряется неоангиогенез, повышается биосинтетическая активность в клетках и, как следствие, резко возрастают репаративные процессы в ацинарных клетках и островковой части поджелудочной железы. Установленные эффекты низкоинтенсивного лазерного излучения способствуют предупреждению развития послеоперационного панкреатита при резекции поджелудочной железы.

Литература

1. Бойко Ю.Г., Прокопчик Н.И. Послеоперационный панкреатит.-Минск: 1992. 92с.
2. Ли А.Б., Цхай В.Ф. Диагностика и лечение послеоперационного панкреатита // Хирургия. – 1991.-№ 2. – С. 122-126.
3. Ложко П.М. Профилактика послеоперационного панкреатита при резекции поджелудочной железы: Автореф. дис.... канд. мед. наук.-Гродно, 2001.-С. 21.
4. Шалимов С.А., Радзиховский А.П., Ничитайло М.Е. Острый панкреатит и его осложнения.-Киев.: Наук. думка, 1990.-272с.
5. Hutter M., Glasgow R., Mulvihill S. Does the participation of a surgical trainee adversely impact patient outcomes? // Surgery, 2000. – Vol. 128, № 2. – P. 286-292.
6. Ionescu A., Hamburda M., Sciuca S. et al. Pancreatic injuries // Chirurgia Bucur., 1995.-Vol. 44, № 4. – P. 65-68.
7. Millonig G.A. Advantages of a phosphate buffer for osmiumtetroxide solutions in fixation // J. Appl. Physics.-1961.-V.32.-P.1637-1643.
8. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208-212.
9. Watson M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals // J. Biophys. Biochem. Cyt. – 1958.-V.4.-P.475-478.