

Морфометрические параметры псевдокисты поджелудочной железы после однократной пункционной аспирации (экспериментальное исследование)

*УО «Гомельский государственный медицинский университет» **

*УО «Белорусский государственный медицинский университет» ***

Цель исследования – изучить изменения морфометрических параметров псевдокисты поджелудочной железы после однократной пункционной аспирации. Для моделирования псевдокисты применяли локальное холодное воздействие на поджелудочную железу белой крысы с помощью криохирургического комплекса КСН 3А/В. Пункцию и аспирацию содержимого псевдокисты производили на 14 сутки эксперимента. Однократная пункционная аспирация вызывает уменьшение диаметра и внутренней полости псевдокисты, но не приводит к ее полной инволюции. Морфологическим проявлениям характерна определенная последовательность которая складывается из следующих фаз: контракции (первые 24 часа), ремоделиции (с 1 по 16 сутки) и стабилизации (с 16 по 31 сутки).

Ключевые слова: псевдокиста, поджелудочная железа, пункция.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 66 нелинейных белых крысах весом 160-180 грамм с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов.

Моделирование псевдокисты поджелудочной железы производили по оригинальной методике [2]. Под эфирным наркозом производили срединную лапаротомию. Для локальной гипотермии поджелудочной железы использовали криохирургический комплекс КСН 3А/В (фирма Хирана, г.Брно, Чехословакия), применяемый для местного замораживания тканей. Охлаждение железы осуществляли интраоперационно, путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника с тканью поджелудочной железы.

Использовали температурный режим -100 °С. Воздействие низкой температуры осуществлялось в течение 60 секунд.

Охлажденный участок железы оттаивал в течение 30 секунд, после чего селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой погружали в брюшную полость. Операционную рану ушивали послойно наглухо. Выбор времени воздействия обусловлен, с одной стороны, теплопроводностью криохирургического наконечника, а с другой – анатомическими параметрами поджелудочной железы белой крысы.

Пункцию псевдокисты производили на 14 сутки эксперимента. Выбор обусловлен тем, что через 14 суток после холодного воздействия определяется четко отграниченная киста. Пункционное аспирирование выполняли с соблюдением правил асептики и антисептики. Под эфирным наркозом производили релапаротомию. В рану выводили селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой, а также псевдокисту.

Рыхлые спайки осторожно разрушали и высвобождали псевдокисту. Выделив стенку псевдокисты, производили пункцию и аспирацию содержимого. После чего селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником, селезенкой и пунктированной псевдокистой погружали в брюшную полость. Рану наглухо ушивали.

Забой животных производили на 1, 3, 7, 16 и 31 сутки после выполнения пункционного аспирирования. Для гистологического исследования брали, подвергнув пункционному аспирированию псевдокисту поджелудочной железы, а также саму железу с парапанкреатической клетчаткой, брыжейку тонкой и толстой кишки, большой сальник. Материал фиксировали в 10% нейтральном формалине, проводили через спирты возрастающей концентрации, заливали в парафин с воском. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5мкм. Депарафинированные срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Для количественной оценки и получения достоверных данных характеризующих морфогенез псевдокисты поджелудочной железы использовалась морфометрия, которая проводилась на световом микроскопе Nikon eclipse E200 с применением программно-аппаратного комплекса, оснащенного цифровой видеокамерой Donpisha color vision 3CCD, с помощью компьютерной программы «Морфотест», использовался также микроскоп МБС-10 с окуляр – микрометром и окулярной сеткой.

Проводилось измерение наружного диаметра псевдокисты поджелудочной железы. Определялись размеры ее внутренней полости. Измерялась ширина наружного и внутреннего слоев, а также толщина стенки псевдокисты в целом. Полученные результаты обработали с помощью пакета компьютерных программ статистического анализа «Microsoft Excel 2003» и «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение

Через сутки после пункционной аспирации содержимого псевдокисты в брюшной полости экссудата не обнаружено. Определяется незначительный отек серозных оболочек. В парапанкреатической клетчатке имеется подвижное, округлой формы образование, белесого цвета, мягко-эластичной консистенции. Гистологически стенка образования состоит из двух слоев: наружного – более плотного, состоящего из оформленной соединительной ткани и внутреннего – образованного грануляционной тканью.

В наружном слое превалирует концентрически ориентированные волокнистые структуры. Выявляются различной степени зрелости фибробласты.

Внутренний слой богат клеточными элементами, превалируют нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и фибробласты.

В стенке псевдокисты определяются расширенные и полнокровные кровеносные сосуды, наибольшее их число содержится во внутреннем слое. В полости псевдокисты имеется жидкость, содержащая нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и незначительное количество эритроцитов. Установлены морфометрические характеристики псевдокисты поджелудочной железы (табл.).

Таблица – Морфометрическая характеристика псевдокисты поджелудочной железы после однократной пункционной аспирации ($M \pm m$), мм

Сроки после пункционной аспирации псевдокисты, сутки	Морфометрические параметры псевдокисты				
	Диаметр	Диаметр полости	Толщина стенки	Ширина наружного слоя стенки	Ширина внутреннего слоя стенки
1	5,88±0,02 (8,72±0,02)...	4,20±0,02 (6,99±0,02)...	0,84±0,02 (0,86±0,01)	0,41±0,01 (0,48±0,02)...	0,43±0,01 (0,38±0,01)...
3	5,52±0,02*** (8,94±0,02)...	3,80±0,02*** (7,05±0,02)...	0,86±0,01* (0,92±0,01)...	0,51±0,03* (0,59±0,01)...	0,35±0,01** (0,33±0,01)
7	5,36±0,02** (9,01±0,03)...	3,71±0,02* (7,15±0,04)...	0,83±0,01 (0,93±0,01)...	0,55±0,01 (0,64±0,01)...	0,28±0,01* (0,30±0,02)
16	4,85±0,01*** (9,03±0,01)...	3,55±0,01*** (7,14±0,02)...	0,65±0,01*** (0,95±0,01)...	0,42±0,01*** (0,67±0,02)...	0,23±0,02 (0,28±0,02)
31	4,71±0,01*** (9,03±0,01)...	3,51±0,02 (7,02±0,03)...	0,60±0,01** (1,01±0,01)...	0,40±0,01 (0,76±0,01)...	0,20±0,01 (0,25±0,01)...

Примечание:

- 1) различия достоверны по отношению к предыдущему показателю:
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$;
- 2) различия достоверны при сравнении с показателями псевдокисты не подвергшейся пункционной аспирации:
– $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$;
- 3) в скобках указаны морфометрические характеристики псевдокисты поджелудочной железы, не подвергшейся пункционной аспирации.

Полученные морфометрические данные позволяют изучить преобразования псевдокисты после однократной пункционной аспирации ее содержимого. Спустя одни сутки после пункционной аспирации диаметр псевдокисты снизился на 44,6 %, диаметр полости уменьшился на 65,0 %. Указанные изменения носят достоверный характер ($p < 0,05$).

На третьи сутки после однократной пункционной аспирации в сравнении с первыми сутками диаметр псевдокисты и диаметр ее полости уменьшились соответственно на 6,5 % и 10,5 % ($p < 0,05$). Ширина наружного слоя увеличилась на 19,6 %, а внутреннего слоя уменьшилась на 22,9 %. Установленные изменения достоверны.

На 7 сутки эксперимента в сравнении с 3 сутками изменение морфологических параметров следующее: диаметр псевдокисты уменьшился на 3,0 %, толщина стенки снизилась на 3,6 %, уменьшился на 2,4 % диаметр полости. Ширина наружного слоя увеличилась на 7,3 %, а внутреннего – уменьшилась на 25,0 %.

На 16 сутки после однократной пункционной аспирации, по сравнению с 7 сутками эксперимента установлены достоверные ($p < 0,05$).

К завершению эксперимента на 31 сутки по сравнению с 16 сутками диаметр псевдокисты снизился на 3,0 %. Толщина стенки уменьшилась на 8,3 %. Диаметр полости сократился на 1,1 %. Уменьшилась ширина наружного и внутреннего слоя псевдокисты соответственно на 5,0 % и 15,0 %.

Анализ полученных данных позволяет установить различия морфометрических параметров псевдокисты подвергшейся и не подвергшейся однократной пункционной аспирации.

У псевдокисты через одни сутки после пункционной аспирации содержимого в сравнении с псевдокистой у которой не производилась пункционная аспирация

диаметр меньше на 32,6 %. На 39,9 % сократилась внутренняя полость. Толщина стенки уже на 2,3 %. Ширина наружного слоя меньше на 14,6 %, а внутреннего – больше на 13,2 %.

Спустя 3 суток после пункционной аспирации содержимое псевдокисты в сравнении с псевдокистой у которой не производилось аспирация содержимого диаметр снижается на 38,3 %. Диаметр внутренней полости сокращается на 46,1 %. Толщина стенки уменьшилась на 6,5 %. Ширина наружного слоя на 13,6 % меньше, а внутреннего – на 6,1 % больше.

Псевдокиста, подвергшаяся пункционному аспирированию содержимого, спустя 7 суток имела меньшие на 40,5 % диаметр и 48,1 % внутреннюю полость. Толщина стенки уже на 10,8 %. Ширина наружного слоя снижается на 14,1 %, а внутреннего – на 6,7 %.

Псевдокиста через 16 суток после аспирационной пункции в сравнении с псевдокистой у которой не проводилось аспирирование содержимого имело меньший на 46,2 % диаметр и на 50,3 % меньшую внутреннюю полость, толщина стенки уже на 31,6 %, уменьшена ширина наружного и внутреннего слоев соответственно на 37,3 % и 17,9 %.

На 31 сутки после однократной аспирации содержимого установлены различия в сравнении с псевдокистой не подвергшейся пункционной аспирации. Диаметр псевдокисты и ее полости уменьшились соответственно на 47,8 % и 50,0 %. Толщина стенки сократилась на 40,6 %. Уже ширина наружного слоя на 47,4 %, внутреннего – на 20,0 %.

Пункционная аспирация псевдокисты приводит к морфологическим проявлениям, которым характерна определенная последовательность состоящая из трех фаз: 1) контракция, 2) ремоделиция, 3) стабилизация.

Фаза контракции (первые 24 часа после пункционной аспирации) характеризуется быстрым уменьшением диаметра и внутренней полости псевдокисты поджелудочной железы. При контракции происходит концентрическое сжатие псевдокисты. Следует считать, что главным фактором контракции является наличие в стенке псевдокисты, преимущественно во внутреннем грануляционном слое, контрактильных фибробластов (миофибробластов). Ультраструктура этих клеток характеризуется наличием длинных отростков и присутствием значительного количества ориентированных пучков микрофиламентов [4,5].

Через 24 часа после пункционной аспирации и завершения фазы контракции в сравнении с псевдокистой не подвергавшейся данной манипуляции установлено, что диаметр псевдокисты и размер внутренней полости уменьшились. Толщина стенки и ширина наружного слоя стали уже, а внутренний слой расширился.

Полученные нами данные о преимущественной локализации клеточных структур и в том числе миофибробластов во внутреннем грануляционном слое позволяет объяснить причину недостаточной эффективности пункционной аспирации у зрелой псевдокисты поджелудочной железы. Это связано с уменьшением грануляционного слоя и преобладанием наружного фиброзного каркаса, бедного клеточными элементами.

Во время фазы ремоделиции (с первых по 16 сутки) происходит реорганизация стенки псевдокисты поджелудочной железы. Снижение механической нагрузки рецептируется клетками как сигнал к ослаблению биосинтеза коллагена и

активации коллагенолиза. Считают, что это обусловлено, прежде всего, изменением пьезоэлектрических свойств коллагена, которые в свою очередь влияют на заряд наружных мембран клеток, а также наличием рецепторов к коллагену на поверхности клеток [1,3]. На протяжении фазы ремоделиции диаметр и размеры полости достоверно меньше, чем у псевдокисты не подвергшейся пункционной аспирации. Толщина стенки уже. Ширина наружного слоя меньше на протяжении всей фазы ремоделиции. С первых по третьи сутки внутренний слой шире, а с 7 по 16 сутки уже в сравнении с псевдокистой не подвергшейся пункционной аспирации.

Нами установлено, что при ремоделиции в стенке псевдокисты поджелудочной железы извитые волнообразные коллагеновые пучки подвергаются набуханию, разрыхлению, истончению и исчезают в результате деятельности фиброкластов, одновременно образуются волокна и пучки, направление которых определяется функциональной нагрузкой.

В фазу стабилизации с 16 по 31 сутки диаметр и размеры полости меньше, чем у псевдокисты у которой не проводилось пункционное аспирирование содержимого. Уже наружный, внутренний слои и толщина стенки псевдокисты в целом. Устанавливается структурная стабильность. Считают [1,3], что это достигается при относительном равновесии между синтезом коллагена и его разрушением.

Выводы

Таким образом, аспирация содержимого псевдокисты на 14 сутки после криовоздействия приводит к уменьшению диаметра и внутренней полости псевдокисты, но не вызывает ее полную инволюцию. Морфологическим проявлением после пункционной аспирации характерна определенная последовательность, которая складывается из фаз: контракции (первые 24 часа), ремоделиции (с первых по 16 сутки) и стабилизации (с 16 по 31 сутки).

Литература

1. Серов, В. В. Соединительная ткань / В. В. Серов, А. Б. Шехтер. М.: Медицина, 1981. С. 159–284.
2. Способ моделирования псевдокисты поджелудочной железы: пат. 12268 Респ. Беларусь, МПК (2006) G 09В 23/00, А 61 В 18/00 С.В. Дорошкевич, Е.Ю. Дорошкевич; заявитель Гомельский гос. мед. ун-т. № а 20070428; заявл. 30.12.2008; опубл. 01.09.2009 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. 2009. № 4. С. 160.
3. Юрина, Н. А. Морфофункциональная гетерогенность и взаимодействие клеток соединительной ткани / Н. А. Юрина, Н. А. Радостина. М.: Изд-во УДН, 1990. С 144–283.
4. Benzonana, G. Distribution of smooth muscle and nonmuscle in tissue sections as seen by immunofluorescence (abstr.) / G. Benzonana, G. Martinello, G. Gabbiani // *Experientia*. 1986. Vol. 42. P. 650.
5. Eddy, R. J. Evidence for the nonmuscle nature of «myofibroblast» of granulation tissue and hypertrophic scar. An immunofluorescence study / R. J. Eddy, J. A. Petro, J. J. Tomasek // *Am. J. Physiol.* 1988. Vol. 130. № 2. P. 252–260.