

ПАТОМОРФОЛОГІЯ

© Борисенко В. Б., *Сорокина И. В., *Горголь Н. И.

УДК 616.8:616.36–008.5–007.272]–091.8–092.9

Борисенко В. Б., *Сорокина И. В., *Горголь Н. И.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕДОХА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХОЛЕСТАЗЕ

Харьковская медицинская академия последипломного образования

(г. Харьков)

*Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

Данная работа является фрагментом НИР «Комплексная профилактика гнойно-септических осложнений у больных с невідкладними захворюваннями органів черевної порожнини», № гос. регистрации №0111U003580.

Вступление. Механическая желтуха (МЖ) является грозным осложнением различных доброкачественных и злокачественных заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны [10, 11]. Ее течение нередко осложняется развитием острого холангита и билиарного сепсиса, что значительно усугубляет течение основного заболевания и определяет высокий процент послеоперационных осложнений (24-54%), а также высокую летальность, достигающую 60 %, а случаях развития билиарного септического шока – 100% [1, 3, 8, 9].

В настоящее время мало изучены механизмы трансформации МЖ в острый холангит и в последующем билиарный сепсис, вследствие нарушения проходимости холедоха, а так же роль структурных компонентов стенки холедоха в развитии бактериохолии и острого холангита, а также портальной бактериемии [1, 4, 7]. Нуждается в более детальном изучении роль феномена бактериальной транслокации [1, 6] в развитии бактериохолии.

Результаты проведенных исследований по установлению роли холедоха в патогенезе острого холангита позволят с новых позиций разработать патогенетически обоснованную программу комплексного лечения больных с синдромом МЖ.

Цель исследования - динамическое изучение гистоструктурных изменений холедоха при механической желтухе в эксперименте.

Объект и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 36 крысах линии Вистар в условиях вивария Харьковской медицинской академии последипломного образования. Животные с соблюдением полового признака были распределены на две группы: основную – 30 животных и контрольную – 6 крыс. Животным основной группы в условиях общей анестезии произведено моделирование МЖ путем перевязки холедоха в нижней трети. Из эксперимента крысы выводились

на 3, 7, 14, 21, 30-е сутки путем введения летальной дозы анестетика. На аутопсии производили забор кусочков печени для их патоморфологического исследования.

Манипуляции на животных проводили согласно научно-практическим рекомендациями по содержанию лабораторных животных и работы с ними [2], а также в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986).

Изучение микропрепаратов и их микрофотографирование проводили на микроскопе «Olympus BX-41». В обзорных препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином изучали степень выраженности дистрофических, некробиотических, гемодинамических, воспалительных и атрофических изменений. Кроме того, морфометрически оценивали среднюю толщину стенки холедоха и высоту его эпителиальной выстилки.

Иммуногистохимические исследования проводили прямым методом Кунса по методике Brosnan (1979). С помощью моноклональных антител (МКА) определяли коллагены I, III и IV типов, а также клетки экспрессирующие рецепторы к CD34 (Novocastra Laboratories Ltd.) Оптическую плотность иммунофлюоресценции (ОПИ) определяли по методу Губиной-Вакулик Г.И. и соавторов [5] с помощью микроскопа «Axioskop 40» и программного обеспечения Biostat.exe.

Результаты исследования обработаны статистически с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Достоверность показателей оценивали по t – критерию Стьюдента, разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение. Патоморфологически на 3 сутки эксперимента в наружных слоях холедоха определяется рыхлый соединительнотканый и гладкомышечный компоненты. Слизистая оболочка (СО) характеризуется многочисленной складчатостью, эпителиальная выстилка целостная. Признаки отека и воспаления отсутствуют. Толщина стенки холедоха составляет

Таблиця 1

Толщина стенки холедоха, мкм

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	255,52 ± 1,42	-	-	-	-	-
Основная группа		259,88 ± 2,1	264,77 ± 0,87	274,6 ± 2,09	281 ± 2,09	343,22 ± 3,51

Таблиця 2

Толщина эпителия СО холедоха, мкм

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	15,47 ± 0,12	-	-	-	-	-
Основная группа		12,51 ± 0,22	16,35 ± 0,19	15,57 ± 0,19	16,01 ± 0,21	16,66 ± 0,18

Таблиця 3

Оптическая плотность иммунофлюоресценции коллагена IV типа в составе эпителиальных БМ холедоха

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	0,654 ± 0,001	-	-	-	-	-
Основная группа		0,621 ± 0,002*	0,648 ± 0,003*	0,668 ± 0,001*	0,701 ± 0,004*	0,711 ± 0,002*

Примечание: * - различия с контролем достоверны (P < 0,05).

(259,88 ± 2,1) мкм, что не отличается от показателя группы сравнения ($p_1 > 0,05$) (**табл. 1**). В тоже время отмечается некоторое уплощение эпителия, выстилающего СО, что связано с развитием в нем дистрофических процессов. Высота эпителия по данным морфометрического исследования составляет (12,51 ± 0,22) мкм ($p_1 < 0,001$) (**табл. 2**). В составе сосудистых базальных мембран (БМ) выявляется свечение коллагена IV типа, интенсивность его свечения соответствует контрольному показателю (**табл. 4**). Так же как и в группе контроля, эндотелиоциты экспрессируют рецепторы к CD34. ОПИ эндотелиальной выстилки сосудов достоверно от контроля не отличается (**табл. 6**). БМ эпителия содержит коллаген IV типа, интенсивность свечения которого по сравнению с контролем достоверно снижена (**рис. 1**), о чем свидетельствует показатель оптической плотности иммунофлюоресценции (ОПИ) этого коллагена (**табл. 3**). При этом ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34, практически равна контрольному показателю (**табл. 5**).

На 7-е сутки эксперимента СО и ее эпителиальная выстилка сохраняют целостность (**рис. 2**), признаки отека, воспаления отсутствуют. В субэпителиальных БМ содержание коллагена IV типа продолжает уменьшаться, о чем свидетельствует достоверное уменьшение показателя ОПИ этого коллагена (**табл. 3**). ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34, существенно от контроля не отличается (**табл. 5**). Признаки отека выражены слабо, а воспаления – отсутствуют. Толщина стенки холедоха – (264,77 ± 0,87) мкм, что достоверно ($p_1 < 0,001$) (**табл. 1**) превышает показатель группы контроля и показатель 3-х суток. Высота эпителия 16,35 ± 0,19 мкм ($p_1 < 0,01$) (**табл. 2**), ее увеличение можно объяснить отеком СО и

развитием гидропической дистрофии эпителия. По сравнению с предыдущим сроком исследования в составе сосудистых БМ увеличивается содержание коллагена IV типа, а ОПИ эндотелиоцитов сосудов в препаратах, обработанных CD34, достоверно снижена по сравнению с контрольным показателем (**табл. 4, 6**).

На 14-е сутки эксперимента стенка холедоха утолщена за счет отека, что подтверждают данные морфометрического исследования (**табл. 1**). СО складчатая, эпителиальная выстилка целостная. Субэпителиальные БМ выявляют яркое линейное свечение, интенсивность которого превышает контрольный показатель, тогда как ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 от контроля не отличается (**табл. 3**). Высота

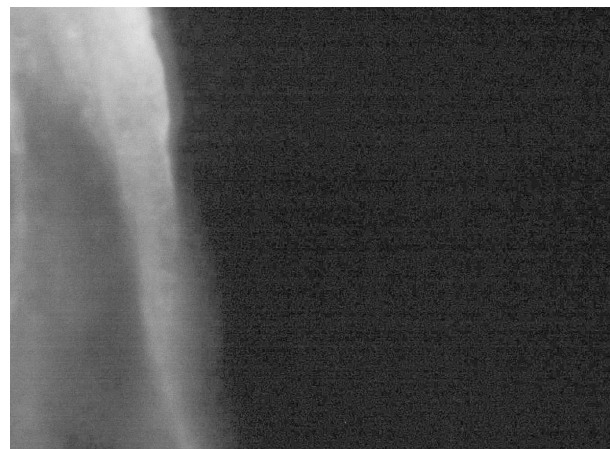


Рис. 1. Неравномерное местами ослабленной интенсивности свечение коллагена IV типа в эпителиальной БМ холедоха животного основной группы на 3-и сутки эксперимента. Прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа. X 600.

Таблиця 4

Оптическая плотность иммунофлуоресценции коллагена IV типа в составе сосудистых БМ холедоха

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	0,489±0,002	-	-	-	-	-
Основная группа		0,486±0,005	0,492±0,004	0,498±0,002*	0,524±0,008*	0,526±0,003*

Примечание: * - различия с контролем достоверны (P < 0,05).

Таблиця 5

Оптическая плотность иммунофлуоресценции эпителиоцитов холедоха, экспрессирующих рецепторы к CD34

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	0,374±0,003	-	-	-	-	-
Основная группа		0,368±0,005	0,369±0,002	0,372±0,004	0,376±0,002	0,378±0,002

Таблиця 6

Оптическая плотность иммунофлуоресценции эндотелиоцитов сосудов холедоха, экспрессирующих рецепторы к CD34

Группа		3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки	30 сутки
Контрольная группа	0,531±0,006	-	-	-	-	-
Основная группа		0,526± 0,002	0,502± 0,003*	0,512±0,005*	0,528±0,003	0,535±0,001

Примечание: * - различия с контролем достоверны (P < 0,05).

эпителия составляет (15,57±0,19) мкм ($p_1 > 0,05$) (табл. 2), что соответствует показателю группы сравнения, однако не за счет восстановления эпителия, а за счет отека и гидропической дистрофии эпителиоцитов. Субэпителиально определяются мелкоочаговые скопления нейтрофилов, эозинофилов, лимфогистиоцитарных элементов. В составе сосудистых БМ с 14-х суток эксперимента отмечается достоверно усиленное свечение коллагена IV типа (рис. 3), а ОПИ эндотелиальной выстилки сосудов в препаратах, обработанных МКА

к CD34, по сравнению с контролем достоверно снижена (табл. 4, 6).

На 21-е сутки эксперимента стенка холедоха утолщена за счет отека, ее толщина по данным морфометрического исследования составляет (281±2,09) мкм, что достоверно ($p_1 < 0,001$) (табл. 1) превышает показатели группы сравнения и предыдущих сроков эксперимента. СО холедоха утолщена, складчатая, эпителиальная выстилка целостная, высота эпителия составляет (16,01±0,21) мкм ($p_1 < 0,05$) (табл. 2). Субэпителиальные БМ выявляются в виде

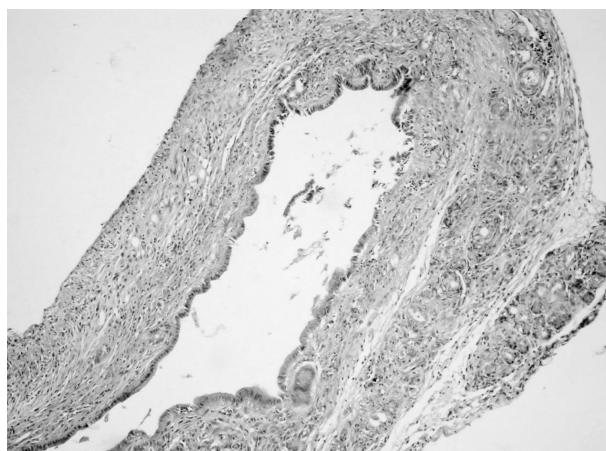


Рис. 2. Гистоструктура холедоха животного основной группы на 7 сутки эксперимента: СО и эпителиальная выстилка целостные, признаки отека, воспаления отсутствуют. Окраска гематоксилином и эозином. X 100.

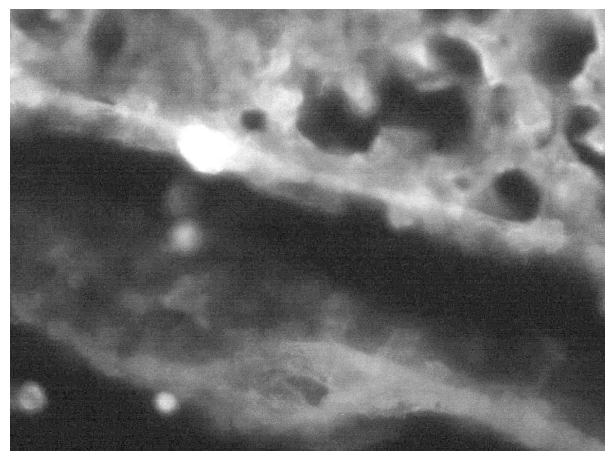


Рис. 3. Яркое свечение коллагена IV типа в БМ эпителия и сосудов животного основной группы на 14-е сутки эксперимента. Прямой метод Кунса с МКА к коллагену IV типа. X 400.

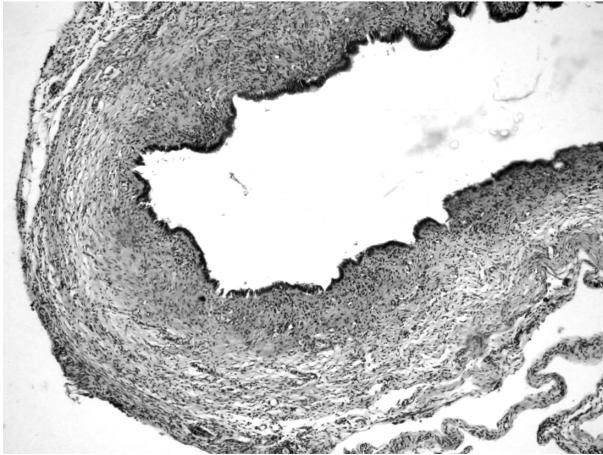


Рис. 4. Гистоструктура холедоха животного основной группы на 30-е сутки эксперимента: стенка утолщена, эпителиальная выстилка целостная, субэпителиально определяются очаговые скопления воспалительных элементов. Окраска гематоксилином и эозином. X 100.

яркого линейного свечения, интенсивность которого достоверно превышает контрольный показатель, тогда как ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 выявляет лишь тенденцию к повышению (табл. 5). Субэпителиально определяются мелкоочаговые скопления нейтрофилов, эозинофилов, лимфогистиоцитарных элементов. В составе сосудистых БМ достоверно увеличено содержание коллагена IV типа, о чем свидетельствует анализ показателя ОПИ, тогда как ОПИ эндотелия

сосудов в препаратах, обработанных МКА к CD34, по сравнению с контролем не отличается, а по сравнению с 14-и сутками эксперимента несколько повышается (табл. 4, 6).

На 30-е сутки эксперимента толщина стенки холедоха составляет $343,22 \pm 3,51$ мкм, что достоверно ($p_1 < 0,001$) меньше показателей группы сравнения и предыдущих сроков эксперимента (табл. 1). Это можно объяснить растяжением холедоха в условиях нарастающего холестаза. СО утолщена, складчатая, эпителиальная выстилка целостная, высота эпителия ($16,66 \pm 0,18$) мкм ($p_1 < 0,001$) (табл. 2). Содержание коллагена IV типа в составе субэпителиальных БМ еще более выражено, чем в предыдущие сроки эксперимента, в то же время ОПИ эпителиоцитов, экспрессирующих рецепторы к CD34 достоверно не изменяется по сравнению с контролем (табл. 3, 5). В стенке холедоха определяются мелкоочаговые скопления нейтрофильных гранулоцитов, лимфоцитов (рис. 4).

Выводы. Во все сроки исследования выраженные воспалительные изменения в холедохе не развиваются. Начиная с 14 суток, обнаруживалась самая легкая форма этого заболевания в виде катарального холангита – что позволяет утверждать о факте достаточной устойчивости эпителия желчных путей к проникновению инфекции при наличии прогрессирующего холестаза.

Перспективы дальнейших исследований. Полученные экспериментальные данные в перспективе позволяют разработать патогенетически обоснованную программу комплексного лечения пациентов с неосложненной МЖ.

Литература

1. Даденко Б.М. Механическая желтуха, острый холангит, билиарный сепсис: их патогенетическая взаимосвязь и принципы дифференциальной диагностики / Б.М. Даденко, В.Б. Борисенко // Новости хирургии. – 2013. – № 5. – С. 31–39.
2. Методичні рекомендації по утриманню лабораторних тварин та роботі з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко [та ін.]. – К. : Авіцена, 2002. – 155 с.
3. Обоснование хирургической тактики при механической желтухе / С. М. Елисеев, Н. Г. Корнилов, С. П. Чикотеев, Р. Р. Гумеров // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2010. – № 5(75). – С. 233–239.
4. Острый холангит и билиарный сепсис / В. В. Хацко, А. Д. Шаталов, В. Н. Войтюк [и др.] // Укр. журн. хирургии. – 2013. – № 2. – С. 152–157.
5. Пат. 46489 Україна, G 01 N 33/00. Спосіб кількісного визначення вмісту антигену в біологічних тканинах / Г. І. Губіна–Вакулик, І. В. Сорокіна, В. Д. Марковський [та ін.]. – № u200906730; заявл. 26.06.09; опубл. 25.12.09. Бюл. № 4.
6. Столин А.В. Выбор тактики лечения у больных гнойным холангитом / А.В. Столин, М.И. Прудков, Е.В. Нишневич // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 3. – С. 126–129.
7. Ультраструктурные и иммунологические изменения печени при механической желтухе и гнойном холангите. Выбор хирургического лечения / В. В. Паршиков, С. Г. Измайлов, Е. И. Яковлева [и др.] // Анналы хирург. гепатологии. – 2009. – Т. 14, № 3. – С. 48–55.
8. Early detection of extrahepatic bile-duct carcinomas in the nonicteric stage by using MRCP followed by EUS / J. K. Sai, M. Suyama, Y. Kubokawa [et al.] // Gastrointest. Endosc. – 2009. – Vol. 70. – P. 29–36.
9. Risk factors of liver dysfunction after extended hepatic resection in biliary tract malignancies / K. Suda, M. Ohtsuka, S. Ambiru [et al.] // Am. J. Surg. – 2009. – Vol. 197. – P. 752–758.
10. Kucukav F. Percutaneous biliary intervention for primary sclerosing cholangitis in a patient with situs inversus totalis / F. Kucukav, R. S. Okten, T. Cumhur // Turk. J. Gastroenterol. – 2011. – Vol. 22, № 6. – P. 636–640.
11. Prospective evaluation of a selective approach to cholangiography for suspected common bile duct stones / J. Horwood, F. Akbar, K. Davis, R. Morgan // Ann. R. Coll. Surg. Engl. – 2010. – Vol. 92, № 3. – P. 206–210.

УДК 616.8:616.36–008.5–007.272]–091.8–092.9

ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕДОХА ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ХОЛЕСТАЗИ

Борисенко В.Б., Сорокіна І.В., Горголь Н.І.

Резюме. В експерименті на 36 щурах з моделлю механічної жовтяниці вивчені динамічні патоморфологічні зміни загальної жовчної протоки. Встановлено, що на тлі наростаючої жовчної гіпертензії у всі терміни дослідження не відзначаються виражені запальні зміни в холедосі. Починаючи з 14 доби відзначалися тільки помірні прояви катарального холангіту – що свідчить про факт достатньої стійкості епітелію жовчних шляхів на проникнення інфекції при наявності прогресуючого холестаза.

Ключові слова: механічна жовтяниця, моделювання, холедох, патоморфологічні зміни.

УДК 616.8:616.36–008.5–007.272]–091.8–092.9

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕДОХА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХОЛЕСТАЗЕ

Борисенко В.Б., Сорокина И.В., Горголь Н.И.

Резюме. В эксперименте на 36 крысах с моделью механической желтухи изучены динамические патоморфологические изменения общего желчного протока. Установлено, что на фоне нарастающей желчной гипертензии во все сроки исследования не отмечаются выраженные воспалительные изменения в холедо-хе. Начиная с 14 суток выявлены только умеренные проявления катарального холангита – что свидетельствует о факте достаточной устойчивости эпителия желчных путей к проникновению инфекции при наличии прогрессирующего холестаза.

Ключевые слова: механическая желтуха, моделирование, холедох, патоморфологические изменения.

UDC 616.8:616.36–008.5–007.272]–091.8–092.9

Pathomorphological Characteristics of Choledoch under Experimental Cholestasis

Borisenko V. B., Sorokina I. V., Gorgol N. I.

Abstract. Introduction. Mechanical jaundice is a complication of various benign and malignant diseases of hepatopancreatobiliary area organs. At present pathogenic role of choledoch wall structural components in the development of bacteriocholia and acute cholangitis as well as portal bacteremia in the conditions of progressive cholestasis is little studied.

Aim of the research. Dynamical study of choledoch hystostructural changes under mechanical jaundice in experiment.

Materials and methods. The experimental study in modeling of mechanical jaundice was carried out on 36 rats of Wistar line. The animals were divided into two groups: the main group included 30 animals and the control group included 6 rats. The animals of the main group were made ligation of choledoch in the lower third of it. The rats were removed from the experiment on the 3, 7, 14, 21 and 30th day. Sampling of choledoch slices for their pathomorphological research were made during autopsy.

In review preparations colored by haemotoxylin and eosin the degree of dystrophic, necrobiotic, hemodynamic, inflammatory and atrophic manifestations changes were studied. Immunohistochemically with the help of monoclonal antibodies collagens of the I, III and IV types were defined as well as cells, expressing the receptors to CD34. Average depth of choledoch wall and height of its epithelial lining were also morphometrically estimated.

Results. Discussion. Signs of choledoch edema and inflammation are absent from 3rd to 14th day of the experiment under pathomorphological study. Subepithelially from the 14th day of the experiment small accumulations of neutrophils, eosinophils, lymphohistocytic elements were identified. Mucous membrane was with plentiful folding, epithelial lining was wholesome.

Choledoch wall depth varied from 259,88±2,1 mcm on the 3rd day to 343,22±3,51 mcm on the 30th day of the experiment according to morphometric study. Choledoch epithelium height growth can be explained by the development of its hydropic dystrophy and mucous membrane edema.

Collagen of the IV type glow intensity in the structure of vessel basal membranes from the 3rd day corresponded to the control one, up to the 30th day its intensity in comparison with the control one was marked. Choledoch epithelial cells glow, expressing the receptors to CD34 from the 3rd day did not differ from control and only from the 21st day tendency to immunofluorescence optical density strengthening was marked. In its turn choledoch vessels endothelial cells glow expressing the receptors to CD34 did not reliably differ from the control up to the 30th day.

Conclusions. In all terms of the study the expressed inflammatory changes in choledoch demonstrate no progress. Beginning from the 14th day the lightest form of this disease was detected in the way of catarrhal cholangitis which allows stating the fact of sufficient stability of biliary tracts epithelium to infection penetration under progressive cholestasis.

Key words: mechanical jaundice, modeling, choledoch, pathomorphological changes.

Рецензент – проф. Гасюк А.П.

Стаття надійшла 12.09.2014 р.