

ВЛИЯНИЕ ЛИДОКАИНА НА ДИНАМИКУ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ОСТРОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАНКРЕАТИТА

Белорусский государственный медицинский университет

Изучено влияние лидокаина на течение и морфологические характеристики остро экспериментального панкреатита. Ингибирование лидокаином фосфолипазы А₂ помогает ациноцитам адаптироваться к патологическому процессу, что обуславливает положительную динамику морфометрических показателей и высокий уровень выживаемости-87,5%.

Ключевые слова: острый экспериментальный панкреатит, ациноциты, морфометрия, лидокаин.

А.М. Федорук

LIDOCAIN INFLUENCE ON THE DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS IN ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS

Lidocain influence on a course and morphological characteristics of an acute experimental pancreatitis is investigated. Inhibition of phospholipase A₂ by lidocain helps acinar cells to adapt to pathological process and causes positive dynamics of morphometric parameters and a high level of survival rate-87,5 %.

Key words: acute experimental pancreatitis, acinar cells, morphometry, lidocain.

Исследования последних лет главным образом посвящены изучению молекулярных механизмов лежащих в основе патогенеза острого панкреатита [4,9,14].

Чаще других упоминается об участии фосфолипазы А₂ (ФЛА2), которая относится к семейству ферментов, гидролизующих эфирную связь фосфоглицерида в положении 2. При гидролизе фосфолипидов происходит формирование двух продуктов – арахидоновой кислоты и лизофосфолипида. Эти продукты широко вовлечены в продукцию потенциально провоспалительных медиаторов, таких как простагландины, лейкотриены и фактор активации тромбоцитов (ФАТ) [12].

Основываясь на первичной структуре самого фермента выделяют два типа – ФЛА2I и ФЛА2II. [24]. Наиболее изучена внеклеточная секреторная ФЛА2I, которая является кальций зависимым ферментом и имеет молекулярную массу 13,7 kDa [1,11]. ФЛА2I выделяется ацинарными клетками поджелудочной железы в виде профермента, активация которого происходит под действием трипсина. ФЛА2I действует в основном на вещества в мицеллярной форме и субстраты с поверхностью раздела. По мнению ряда авторов фактором повреждающим клеточные мембраны является именно ФЛА2I, которая может выделяться ацинарными клетками в активном состоянии [3,17,20,21].

Развитие острого панкреатита и некроза в основном связывают с ФЛА2I типа [6,8,16]. Вместе с тем, в генерализации процесса и развитии вне панкреатических осложнений основную роль играет ФЛА2 II типа [19,23]. Развитие воспаления, аллергических реакций, тромбообразование интимно связано с действием ФЛА2II. Однако клеточный источник циркулирующей в плазме крови ФЛА2II пока не установлен, хотя предполагается, что им могут быть клетки печени [10,18].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные ФЛА2 как одной из групп ключевых ферментов в патогенезе острого панкреатита, попытки воздействия на них с целью предотвращения развития патологического процесса пока не вышли за рамки эксперимента [13,15].

Показано, что лидокаин *in vitro* способен ингибировать панкреатическую ФЛА2 [3].

Цель исследования: изучить влияние лидокаина на течение и морфологические характеристики острого экспериментального панкреатита (ОЭП).

Материал и методы

Экспериментальные исследования были выполнены на 64 (18-интактных и 30 с ОЭП, 16-лечение лидокаином) белых крысах самцах линии Вистар с массой тела 200 – 220 г.

Для воспроизведения ОЭП использовали модель предложенную Э.С.Гулянец и соавт. (1986г.) [5]. Лидокаин вводили экспериментальным животным внутривентриально в виде 2% раствора в дозе 5 мг на кг массы тела через 24 часа после начала моделирования ОЭП. Обезболивание животных проводили внутривентриальной анестезией 1% раствором тиопентала натрия в дозе 70 мг на 1 кг массы тела. Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Из эксперимента крысы выводили согласно протоколу исследования в разные сроки путем декапитации. Все исследования выполняли согласно «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» [2,6].

Ткань поджелудочной железы фиксировалась в 10% нейтральном формалине и заключалась в парафин. Гистологические препараты толщиной 4 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование проводили на базе кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии БГМУ (зав кафедрой проф. Слук Б.А.). Морфометрию на гистологических срезах проводили методом точечного счета. На срезах поджелудочной железы определяли доли объемов зимогенной зоны, гомогенной зон, клеточных ядер и рассчитывали ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО).

Для компьютерной кариометрии при иммерсионном увеличении (объектив х100) производили съемку препаратов с помощью цифрового фотоаппарата. Статистическая обработка выполнена с использованием программного пакета Statistica 6.0 (Stat Soft, Inc.).

Результаты и обсуждение

Развитие ОЭП у крыс характеризовалось набором следующих качественных морфологических признаков:

- появление зон некроза ПЖ через 24 часа после начала моделирования ОЭП;
- субкапсулярная локализация некротических зон;
- острый отек соединительнотканной стромы органа;
- лейкоцитарная инфильтрация;
- усиление эозинофилии ациноцитов за счет переполнения зимогенной зоны цитоплазмы гранулами секрета;

Таблица 1

Морфометрическая характеристика ациноцитов при лечении лидокаином (48 часов эксперимента)

Показатель	Интактные животные	ОЭП 48 часов	Лидокаин 48 часов
Зимогенная зона, %	37,8±1,0	42,3±2,0*	31,1±1,0***†††
Гомогенная зона, %	50,6±1,0	38,5±2,0***	43,4±2,0**
Ядро, %	11,5±0,8	19,1±1,0***	25,4±1,0***†††
ЯЦО	1:7,7	1:4,2	1:2,9
Площадь ядра, мкм ²	14,0±0,3	17,6±0,5***	22,2±0,7***†††
Логарифм площади ядра	2,62±0,02	2,85±0,02***	3,07±0,03***†††
Фактор формы ядра	0,801±0,006	0,845±0,004***	0,847±0,004***
Элонгация ядра	1,16±0,01	1,20±0,01**	1,14±0,01††

Достоверность отличия от интактных животных: * – P<0,05, ** – P<0,01, *** – P<0,001. Достоверность отличия от ОЭП 48 часов: † – P<0,05, †† – P<0,01, ††† – P<0,001.

Таблица 2

Морфометрическая характеристика ациноцитов при лечении лидокаином (72 часа эксперимента)

Показатель	Интактные животные	ОЭП 72 часа	Лидокаин 72 часа
Зимогенная зона, %	37,8±1,0	34,0±1,0**	37,6±1,0†
Гомогенная зона, %	50,6±1,0	45,9±2,0*	48,8±1,0
Ядро, %	11,5±0,8	20,0±1,0***	13,4±0,9†††
ЯЦО	1:7,7	1:4,0	1:6,4
Площадь ядра, мкм ²	14,0±0,3	15,9±0,6**	17,6±0,5***†
Логарифм площади ядра	2,62±0,02	2,72±0,04*	2,84±0,03***†
Фактор формы ядра	0,801±0,006	0,839±0,007***	0,872±0,005***†††
Элонгация ядра	1,16±0,01	1,31±0,02***	1,14±0,01†††

Достоверность отличия от интактных животных: * – P<0,05, ** – P<0,01, *** – P<0,001. Достоверность отличия от ОЭП 72 часа: † – P<0,05, †† – P<0,01, ††† – P<0,001.

Таблица 3

Динамика изменений морфометрических параметров ациноцитов при лечении лидокаином

Показатель	Лидокаин 48 часов	Лидокаин 72 часа
Зимогенная зона, %	31,1±1	37,6±1***
Гомогенная зона, %	43,4±2	48,8±1*
Ядро, %	25,4±1	13,4±0,9***
ЯЦО	1:2,9	1:6,4
Площадь ядра, мкм ²	22,2±0,7	17,6±0,5***
Логарифм площади ядра	3,07±0,03	2,84±0,03***
Фактор формы ядра	0,847±0,004	0,872±0,005**
Элонгация ядра	1,14±0,01	1,14±0,01

Достоверность отличия от лидокаина 48 часов: * – P<0,05, ** – P<0,01, *** – P<0,001.

- везикуляция и вакуолизация цитоплазмы ациноцитов;
- расширение цистерн гранулярной эндоплазматической сети в гомогенной зоне цитоплазмы к концу первых суток эксперимента, снижение базофилии гомогенной зоны к концу вторых суток эксперимента;
- дезинтеграция ацинусов на отдельные клетки и полное разрушение клеток ацинусов.

На фоне лечения лидокаином через 48 часов после начала ОЭП в соединительной ткани поджелудочной железы – умеренная диффузная инфильтрация, преимущественно лейкоцитарного характера, без разрушения периферии органа. В ацинусах встречались клетки с хорошо развитой гомогенной зоной и наличием крупных вакуолей. В ядрах многих клеток содержались крупные ядрышки. В жировой клетчатке – картины некроза.

Через 72 часа ОЭП на фоне лечения лидокаином по периферии органа наблюдались ограниченные разрушения. Имелась очаговая лейкоцитарная инфильтрация соединительнотканых прослоек и субкапсулярной области органа. В гомогенной зоне ацинарных клеток – множественные вакуоли. Отек стромы и жировой некроз имели мелкоочаговый характер.

Морфометрическая характеристика ациноцитов (табл. 1) показала, что на фоне лечения лидокаином через 48 часов после развития ОЭП площадь зимогенной зоны достоверно сократилась, как по сравнению с животными с ОЭП, так и с интактными крысами. Наблюдалась тенденция к увеличению площади гомогенной зоны ациноцитов. Однако она оставалась достоверно меньшей, чем у интактных животных.

генной зоны ациноцитов. Однако она оставалась достоверно меньшей, чем у интактных животных.

Площадь ядра, а также логарифм его площади под действием лидокаина достоверно (p<0,001) росли как по сравнению с животными с ОЭП, так и с интактными. Лидокаин достоверно (p<0,01) уменьшал элонгацию ядра и приводил к значениям у интактных животных, однако фактор формы оставался на уровне животных с ОЭП без лечения.

На стадии 72 часов эксперимента (табл. 2) площадь зимогенной зоны под действием лидокаина достоверно увеличивалась и достигла значений у интактных животных. Достоверных изменений гомогенной зоны не наблюдалось.

Действие лидокаина приводило к тому, что площадь ядра достоверно уменьшалась по сравнению с животными с ОЭП без лечения и достигала значений у интактных животных. При этом такие ядерные параметры, как площадь, логарифм площади и фактор формы ядра, были достоверно выше, чем у животных с ОЭП без лечения и интактных. Элонгация ядер достоверно уменьшалась и достигала значений у интактных животных.

Изучение динамики морфометрических параметров ациноцитов (табл. 3) в процессе лечения лидокаином показало, что на стадии эксперимента 48 и 72 часа площади, занимаемые зимогенной, гомогенной зонами и ядром достоверно отличаются от показателей у животных с ОЭП без лечения. Практически происходит нормализация основных параметров ациноцитов. Вместе с тем, через 72 часа эксперимента происходит рост значений фактора формы ядра, а элонгация не меняется.

При лечении лидокаином наблюдались гораздо более слабые проявления вакуолизации цитоплазмы, появления некротических процессов было заторможено, они проявлялись к концу третьих суток опыта, картины повреждения периферии железы и долек были выражены умеренно и слабо.

При лечении лидокаином на стадии 48 часов обнаруживался резкий скачок относительного объема ядер и ЯЦО ациноцитов, что хорошо объясняется результатами карิโอметрии – абсолютное значение средней площади ядер и в самом деле значительно увеличивались.

Еще через 24 часа относительные объемы компонентов ациноцитов начинали приближаться к норме, правда, повышенная средняя площадь ядер указывает на то, что на стадии 72 часа после начала эксперимента на фоне лечения лидокаином наблюдается, вероятно, функциональное напряжение клеточных ядер, обеспечивающее адаптацию ациноцитов к неблагоприятным условиям, вызванным острым панкреатитом.

Все это свидетельствует в пользу того, что лечение лидокаином изменяет протекание патологических процессов в цитоплазме клетки, помогает ациноцитам адаптироваться к патологическому процессу, стабилизировать и сглаживать агрессивность его течения. Вместе с тем, при лечении лидокаином сохраняются немногочисленные крупные вакуоли в цитоплазме, а картины повреждения долек выражены умеренно или слабо в основном на периферии железы.

В группе животных с ОЭП без лечения наблюдалась 100% летальность к 72 часам эксперимента. Среди животных, которые получали в качестве лечения лидокаин, выживаемость составила 87,5%.

Выводы

1. Использование лидокаина в качестве ингибитора фосфолипазы А2 позволило изменить протекание патологических процессов в цитоплазме клетки и агрессивность течения ОЭП.

2. Использование лидокаина у животных с ОЭП помогает ациноцитам адаптироваться к патологическому процессу, что обуславливает положительную динамику и тенденцию к нормализации морфометрических показателей, а также высокий уровень выживаемости.

Литература

1. Владимиров В. Г., Сергиенко В. И. Острый панкреатит. Экспериментально-клинические исследования – М.: Медицина, 1986 – 240 с.
2. Лабораторные животные (разведение, содержание, использование в эксперименте) / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Киев, Вища школа, 1983. – 383 с.
3. Литвиненко Н. М., Кисель М. А. Эндогенные фосфолипазы А2 (структура и функции). – Мн.: Наука и техника, 1991. – 270 с.
4. Панин Л. Е., Лукьянов И. В. Роль внутриклеточных процессов в механизме развития панкреатита // Сибирский биологический журнал. – 1991.-N 5. – С. 11-17.

5. Пат. 1327152 СССР, МКИ G09B23/28. Способ моделирования панкреатита / Гульянц Э. С., Лукаш Н. А., Ткачёва Т. Н. и др. – Заявл. 17.02 // Открытия. Изобретения. – 1987. – № 28. – С. 211.
6. Banerjee AK, Galloway SW, Kingsnorth AN. Experimental models of acute pancreatitis. *Br J Surg* 1994;81:1096-1103
7. Buchler M, Beger H. G. Standards in experimental acute pancreatitis // *Europ. surgical research.*-1992.-Vol. 24. – P. 89-91.
8. Вьчлер М, Малфертхайнер Р, Шхддлич Н, Невалайнен Т, Фриесс Н, Бегер НГ. Role of phospholipase A₂ in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1989;97:1521-1526.
9. Cationic liposome-mediated gene transfer during acute pancreatitis: tissue specificity, duration, and effects of acute inflammation / W. Denham, J. Yang, G. Carter, J. Norman // *J. Gastrointest. Surg.* – 1998. – Vol. 2. – P. 95-101
10. Crowl RM, Stoller TJ, Conroy RR, Stoner CR. Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J Biol Chem* 1991;266:2647-2651
11. Dennis EA. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1994;269:13057-13060
12. Dennis EA. Phospholipases, the enzymes. Vol. 16. New York: Academic Press, 1983.
13. Effect of a new inhibitor of type II phospholipase A2 on experimental acute pancreatitis in rats / T. Yoshikawa, S. Naruse, M. Kitagawa e.a. // *Pancreas.* – 1999. – Vol. 19, № 2. – P. 193-198.
14. Effects of cycloheximide on pancreatic endonuclease activity, apoptosis, and severity of acute pancreatitis / A. M. Kaiser, A. K. Saluja, L. Lu e.a. // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271. – P. 982-993.
15. Experimental study of a novel phospholipase A2 inhibitor in acute pancreatitis / W. Uhl,

- H. J. Schrag, N. Schmitter e.a. // *Br. J. Surg.* – 1998. – Vol. 85, № 5. – P. 618-623.
16. Kahle M, Кцнig H, Filler RD. Lysolecithin-concentration in pancreatic tissue during therapy with phospholipase A₂-inhibitors in acute necrotizing pancreatitis. *Klin Wochenschr* 1989;67:177-179
17. Langton S. R., Dench J. Phospholipase A2 is associated with albumini in patients with acute pancreatitis // *Clin. Chim. Acta.* – 1991. – Vol. 203, № 2-3. – P. 249-257.
18. Nevalainen TJ, Kallajoki M, Pesonen E, Andersson S, Кдрккдinen P, Нцckerstedt. Origin of circulating group II phospholipase A2 in hepatocytes in a patient with epithelioid hemangioendothelioma of the liver. *Lab Invest* 1996;74:585-591
19. Nevalainen TJ. Serum phospholipase A₂ in inflammatory diseases. *Clin Chem* 1993;39:2453-2459
20. Oxidative stress as an early prognostic factor in acute pancreatitis (AP): Its correlation with serum phospholipase A (2) (PLA (2)) and plasma polymorphonuclear elastase (PMN-E) in different-severity forms of human AP / U. Wereszczyuska-Siemiatkowska, A. Dabrowski, M. Jedynak, A. Gabryelewicz // *Pancreas.* – 1998 – Vol. 17, № 2. – P. 163-168.
21. Secretory phospholipase A2 in patients with infected pancreatic necroses in acute pancreatitis / J. Mayer, B. Rau, M. Grewe e.a. // *Pancreas.* – 1998. – Vol. 17, № 3. – P. 272-277.
22. Svensson C, Sjudahl R, Lilja I, Ihse I. The role of ascites and phospholipase A2 on peritoneal permeability changes in acute experimental pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1990;6:71-79
23. Tanaka K, Arita H. Secretory phospholipase A₂ inhibitors. Possible new antiinflammatory agents. In: Pruzanski W, Vadas P, eds. *Novel approaches to antiinflammatory therapy.* Basel: Birkhauser Verlag, 1995:51-64.
24. Vadas P, Pruzanski W. Biology of disease. Role of secretory phospholipase A₂ in the pathobiology of disease. *Lab Invest* 1986;55:391-404