

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ

А.Л. УШКЕВИЧ, К.Н. ЖАНДАРОВ, Н.И. ПРОКОПЧИК

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ОСТРОГО ДЕСТРУКТИВНОГО ПАНКРЕАТИТА,
ПАРАПАНКРЕАТИТА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

УО «Гродненский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

В работе представлен способ экспериментального моделирования острого деструктивного панкреатита, парапанкреатита по механизму поражения максимально приближённый к клинической практике. Предлагаемая модель воспроизведена у 10 кроликов. Способ основан на перемещении дистальной части поджелудочной железы в клетчатку забрюшинного пространства, травмировании и инфицировании паренхимы железы микробной взвесью забранной у больных, оперированных по поводу острого деструктивного панкреатита, парапанкреатита. Применялись лабораторные, морфометрические, микроскопические методы исследования, которые подтвердили развитие острого деструктивного панкреатита, парапанкреатита. Важным преимуществом предлагаемого способа является использование микрофлоры, которая встречается при данной патологии в клинической практике. Разработанный метод является доступным для выполнения и может использоваться в научно-исследовательских лабораториях для экспериментального изучения вопросов патогенеза, а также разработки методов диагностики и способов лечения острого гнойно-некротического парапанкреатита.

Ключевые слова: гнойный панкреатит, парапанкреатит, моделирование

In the article the method of the experimental modeling of an acute destructive pancreatitis, parapancreatitis according to the mechanism of injury maximally close to the clinical practice is presented. The suggested model is reproduced in 10 rabbits. The method is based on the displacement of the distal part of the pancreas to the cellular tissue of the retroperitoneal space, injuring and infecting parenchyma glands with a microbe suspension taken from the patients operated on for an acute destructive pancreatitis, parapancreatitis. Development of an acute destructive pancreatitis, parapancreatitis was confirmed by using laboratory, morphometric, microscopic methods of research. An important advantage of the offered way is the use of microflora which is found at the given pathology in the clinical practice. The designed method is accessible to performance and can be used in research laboratories for an experimental study of pathogenesis problems as well as for working out methods of diagnostics and ways of treatment of an acute purulent-necrotic parapancreatitis.

Keywords: purulent pancreatitis, parapancreatitis, modeling

Введение

Проблема острого деструктивного панкреатита (ОДП) остаётся одной из наиболее сложных и актуальных в современной хирургии. Несмотря на развитие и совершенствование методов инструментальной диагностики, стремительное развитие фармакологии, принципов интенсивной терапии, применения современных высокотехнологических методов лечения ОДП, резуль-

таты не удовлетворяют хирургов. Летальность при инфицированной форме ОДП остаётся высокой и колеблется в пределах 10–80%, а у выживших больных в ряде случаев возникает стойкая утрата трудоспособности [1, 2].

Количество больных, в том числе с тяжёлыми формами этого заболевания, постоянно увеличивается [3, 4]. Патоморфологические процессы, протекающие как в поджелудочной железе, окружающих тка-

нях и органах, так и в организме в целом при ОДП сопровождаются крайне тяжёлым эндотоксикозом, развитием полиорганной недостаточности и гнойно-некротических осложнений на соответствующих стадиях процесса. Прогноз при ОДП зависит как от объёма поражения поджелудочной железы, так и от распространённости гнойно-некротического процесса в самом органе и окружающих тканях [5]. Учитывая это, возникает необходимость в экспериментальных исследованиях, позволяющих решить ряд вопросов этиологии и патогенеза ОДП. Разработка новых экспериментальных моделей острого панкреатита (ОП) на животных позволит изучить механизмы развития патологических изменений в поджелудочной железе, в окружающих органах и тканях, влияние этих изменений на организм в целом, а также разработать и апробировать новые методы патогенетически обоснованного лечения и профилактики деструктивного панкреатита.

Известно, что в настоящее время для моделирования патологических процессов ЖКТ чаще всего используют крыс, кроликов, собак. Использование этих животных считается наиболее оправданным в связи с тем, что строение пищеварительной системы, характер питания их наиболее схожи с человеком, при этом эксперимент не требует больших материальных затрат [6, 7].

Большинство современных экспериментальных моделей острого панкреатита можно разделить на несколько групп в зависимости от воздействия на поджелудочную железу животного: каналикулярно-гипертензивные, инфекционные, травматические, токсические, ишемические, основанные на введении стимуляторов экзогенной секреции ПЖ и комбинированные. Наибольшее внимание исследователей привлекают модели панкреатита основанные на стимуляции экзогенной секреции ПЖ.

Используют церулеин (структурный аналог синтетического холецистокинина), вводят его как внутривенно, так и внутривенно [8, 9]. Распространены модели острого панкреатита с гипертензией в протоковой системе железы (перевязка, временное лигирование протоков различными способами), введением в протоки агрессивных веществ, которые вызывают воспаление. Вводят таурохолат натрия, собственную желчь, трипсин, этиловый спирт и др. [10, 11, 12]. Известны методики моделирования острого панкреатита, которые основаны на введении в паренхиму железы микробной взвеси, веществ, вызывающих воспаление в тканях [13, 14]. К травматическим методам моделирования острого панкреатита также можно отнести механическое раздавливание паренхимы железы и термическое воздействие (локальная гипотермия хлорэтилом, криодеструкция) [15, 16]. Ишемические модели связывают с нарушением трофики тканей ПЖ, примером может служить пережатие селезёночных сосудов на 2 часа [17]. Однако предлагаемые модели острого панкреатита не могут полноценно отразить все проявления деструктивного панкреатита по одной очень важной анатомической особенности строения желудочно-кишечного тракта у экспериментальных животных: поджелудочная железа у них расположена в брюшной полости (в отличие от человека, у которого железа с 12-перстной кишкой находится забрюшинно и только её передняя поверхность покрыта брюшиной). Вследствие этого не один из предлагаемых способов моделирования ОДП не даёт возможности в полной мере оценить влияние деструктивных и воспалительных изменений в поджелудочной железе по отношению к жировой клетчатке забрюшинного пространства.

Известно, что основным патоморфологическим субстратом гнойных осложнений

острого деструктивного панкреатита служит гнойно-некротический парапанкреатит. Поражение забрюшинной клетчатки при деструктивном панкреатите начинается в ферментативной фазе и происходит путём воздействия активных трипсина и липазы на парапанкреатическую клетчатку и является компонентом местного патологического процесса. Когда процесс переходит в стадию септической секвестрации, нагноению подвергаются именно эти зоны геморрагического пропитывания, образуется гнойно-некротический парапанкреатит. И если панкреатит и парапанкреатит начинаются практически одновременно, то в дальнейшем деструктивные процессы в самой железе затихают в течение нескольких суток, а экстрапанкреатическое поражение (парапанкреатит) может прогрессировать в течение нескольких недель, распространяясь на ранее непоражённые области клетчаточного пространства, приводя к возникновению гнойных затёков. Это доказывают результаты аутопсии пациентов умерших в более поздние сроки: деструктивные изменения непосредственно в поджелудочной железе минимальны, в основном они обнаруживаются в забрюшинной клетчатке в трудно доступных для санации местах [18, 19].

Изучить и обосновать новые методики эффективного лечения этой тяжёлой патологии возможно только в экспериментах на животных. Экспериментальная модель ОП должна соответствовать современным взглядам на этиологию и патогенез данного заболевания; быть максимально приближённой клинически к ОП по этапам развития, течения, исхода заболевания; воспроизводится легко на экспериментальных животных.

Цель исследования: создать экспериментальную модель острого гнойно-некротического парапанкреатита у кроликов на основе перемещения части поджелудоч-

ной железы в забрюшинную клетчатку, травмирования и инфицирования паренхимы железы микрофлорой, что позволит детально изучить патологические процессы в поджелудочной железе и забрюшинной клетчатке, разработать новые методики лечения больных с тяжёлыми формами острого деструктивного панкреатита осложнённого парапанкреатитом.

Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились на 10 кроликах обоих полов массой $3,2 \pm 0,2$ кг ($M \pm \sigma$). Их питание осуществлялось по обычной диете в условиях вивария. Кроликам был обеспечен свободный доступ к пище и воде, их содержали в стандартных условиях вивария с естественной 12-часовой сменой света и темноты. Работу проводили с соблюдением этических норм обращения с животными, а также с требованиями правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов, с участием экспериментальных животных разных видов. Животных вводили в наркоз, взвешивали, фиксировали к операционному столу и выполняли операции в стерильных условиях.

Способ экспериментального моделирования гнойно-некротического парапанкреатита осуществляли следующим образом. Под внутримышечным и внутривенным наркозом, после асептической обработки операционного поля производили послойное вскрытие брюшной полости козым доступом в правом подреберье. Мобилизовали дистальную часть поджелудочной железы на протяжении 4–5 см. В этой части в поперечном направлении на протяжении 3 см проводили раздавливание паренхимы железы зажимом 3 раза в разных местах. В травмированную паренхиму железы вводили 1 мл микробной взве-

си, при микробиологическом исследовании которой получали протеи 10^{4-5} или кишечную палочку 10^5 в одном миллилитре (гнойное отделяемое из дренажей, стоящих в парапанкреатическом пространстве, взятое накануне моделирования у больных с острым деструктивным панкреатитом, парапанкреатитом). Двенадцатиперстную кишку отводили медиально. Рассекали париетальную брюшину в области верхнего полюса правой почки, тупо формировали карман размером $4 \pm 1 \times 2 \pm 0,5$ см в забрюшинной клетчатке. Дистальную часть поджелудочной железы протяженностью $4 \pm 0,5$ см с травмированными участками паренхимы и введённой микробной взвесью помещали в сформированный карман в забрюшинной клетчатке. Париетальную брюшину над участком железы, помещённой в клетчатку забрюшинного пространства, сопоставляли путем ушивания. Брюшную полость послойно ушивали наглухо. Животные пробуждались от наркоза в течение 2–4 часов после операции. Помещались в отдельную клетку в условиях вивария. Таким образом, травмированная и инфицированная часть поджелудочной железы располагалась забрюшинно, как у человека. В последствии происходило развитие острого гнойного панкреатита с распространением процесса на клетчатку забрюшинного пространства и развитием гнойно-некротического панкреатита, парапанкреатита. Непосредственно перед моделированием острого гнойно-некротического парапанкреатита и в послеоперационном периоде ежедневно производился забор крови для общего и биохимического анализов.

Гибель животных отмечалась с первых суток после моделирования деструктивного панкреатита, парапанкреатита. На гистологическое исследование забирались кусочки из ткани поджелудочной железы, погружённой в клетчатку забрюшинного пространства, с окружающими тканями.

После проводки материал заливали в парафин. Гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином. Полученные результаты были статистически обработаны при помощи пакета статистических программ Prism.

Результаты и обсуждение

При наблюдении за животными в послеоперационном периоде было отмечено изменение их состояния с первых суток, которое выражалось вялостью, малой двигательной активностью в пределах клетки (по сравнению с неоперированными животными), отказом от пищи. С течением времени данные симптомы нарастали и к 2–3 суткам проведения эксперимента было отмечено прогрессирующее ухудшение состояния, проявляющееся в отсутствии самостоятельной двигательной активности. Животные передвигались, делая несколько шагов только при прикосновении к ним. Отмечался полный отказ от пищи и воды. Со второго дня были отмечены летальные случаи. Средний показатель продолжительности жизни экспериментальных животных в послеоперационном периоде составил $3,5 \pm 1,95$ суток ($M \pm \sigma$).

В общем анализе крови со стороны показателей «красной крови» изменений в послеоперационном периоде отмечено не было. Изменения касались уровня лейкоцитов, который нарастал с каждым днём (таблица 1).

Отмечалось постепенное нарастание палочкоядерных нейтрофилов (таблица 2). Также отмечено наличие токсической зернистости нейтрофилов уже со вторых суток после моделирования, она постепенно нарастала к пятым суткам (от + до ++).

Одновременно с общим анализом крови производили забор крови, в которой исследовали биохимические показатели (общий билирубин, мочевины, АсАТ, АлАТ,

Таблица 1

**Показатели уровня лейкоцитов в
общем анализе крови у
экспериментальных животных**

Случай №	Уровень лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$					
	Время после моделирования, сутки					
	0	1	2	3	4	5
1	3,5	7,9	8,5	9,2	14,7	15,5
2	2,6	5,6	7,0	7,4	8,9	16,3
3	4,0	8,8	9,1	11,0	14,3	-
4	4,2	8,2	8,7	8,1	8,5	-
5	4,9	7,3	8,2	7,2	-	-
6	2,6	6,2	8,1	-	-	-
7	3,6	6,9	-	-	-	-
8	5,3	9,9	-	-	-	-
9	3,3	-	-	-	-	-
10	4,3	-	-	-	-	-

амилаза, щелочная фосфатаза). При проведении анализа биохимических показателей после моделирования острого гнойно-некротического парапанкреатита, отмечено, что уровень общего билирубина на протяжении всего эксперимента варьировал незначительно (в пределах 3–6 мкмоль/л), и к 4–5 суткам отмечалось его небольшое снижение до 5,2–7,6 мкмоль/л, при исходном 10,4–12,6 мкмоль/л. Уровень мочевины повышался с каждым днём. У животных, выживших к пятым суткам, превышал

Таблица 3

**Показатели уровня амилазы в
биохимическом анализе крови у
экспериментальных животных**

Случай №	Уровень амилазы, Ед/л					
	Время после моделирования, сутки					
	0	1	2	3	4	5
1	114	437	399	609	801	661
2	171	453	604	614	678	586
3	134	399	375	338	454	-
4	137	258	243	444	331	-
5	113	384	397	495	-	-
6	130	409	412	-	-	-
7	169	578	-	-	-	-
8	135	520	-	-	-	-
9	143	-	-	-	-	-
10	132	-	-	-	-	-

Таблица 2

**Показатели уровня палочкоядерных
нейтрофилов в общем анализе крови у
экспериментальных животных**

Случай №	Уровень палочкоядерных нейтрофилов, %.					
	Время после моделирования, сутки					
	0	1	2	3	4	5
1	2	11	16	15	22	23
2	4	7	11	16	23	26
3	6	15	18	19	1	-
4	5	10	16	15	44	-
5	6	9	11	13	-	-
6	3	8	4	-	-	-
7	3	7	-	-	-	-
8	7	10	-	-	-	-
9	4	-	-	-	-	-
10	2	-	-	-	-	-

исходный (4,6–8,0 ммоль/л) в 3 раза (19,4–20,6 ммоль/л). Отмечено повышение амилазы, начиная с первых суток после моделирования, по сравнению с исходными данными, и дальнейший подъём её уровня к пятым суткам, что свидетельствует об острых воспалительных изменениях в поджелудочной железе (таблица 3).

Уровни аминотрансфераз также имели тенденцию к постоянному повышению и к пятым суткам отмечалось их 4-кратное увеличение (148–171 Ед/л) по сравнению с исходными показателями (18–68 Ед/л). Щелочная фосфатаза до моделирования была в пределах 13–64 Ед/л, постепенно нарастала и к пятым суткам и достигала 170–230 Ед/л.

Таким образом, полученные лабораторные данные отражают постоянный рост количества лейкоцитов в общем анализе крови, значительный сдвиг формулы влево, наличие патологических изменений в нейтрофилах, что характерно для воспалительных процессов в поджелудочной железе и брюшинной клетчатке. Увеличение в несколько раз основных биохимических показателей крови (мочевина, АсАТ, АлАТ, амилазы, щелочной фосфатазы) свидетель-

ствует о развитии ОДП с нарастающими явлениями печёночной и почечной недостаточности.

При аутопсии умерших животных после моделирования острого парапанкреатита по истечении 24 часов в брюшной полости определялось незначительное количество геморрагического выпота. Поджелудочная железа в брюшной полости была обычной формы и окраски, а та часть железы, которая погружалась в забрюшинную клетчатку гиперемирована, отёчна, по мере отдаления от забрюшинной клетчатки отёк и гиперемия поджелудочной железы уменьшаются. Жировая клетчатка забрюшинного пространства вокруг погружённой поджелудочной железы инфильтрирована с геморрагическим пропитыванием на $2,8 \pm 0,7$ см в диаметре. При микроскопическом исследовании определялись в жировой клетчатке резко выраженное расширение сосудов, их полнокровие, очаги кровоизлияний; в поджелудочной железе умеренная лимфоцитарная инфильтрация, резко выраженное полнокровие сосудов с очагами кровоизлияний. Через 72 часа в брюшной полости рыхлый спаечный процесс, более выраженный в правой половине в верхнем этаже. В подпечёночном пространстве мутный, геморрагический выпот, налёт фибрина на прилежащих органах. Бляшки стеатонекроза в сальнике и брыжейке тонкой кишки. Поджелудочная железа, уходящая забрюшинно, отёчна, вишнёвого цвета с кровоизлияниями. Такую же окраску имела и клетчатка забрюшинного пространства вокруг железы. При микроскопическом исследовании в клетчатке забрюшинного пространства резко выраженная лимфоидная инфильтрация, очаговое полнокровие вен с кровоизлияниями, наличие нескольких очагов гнойного воспаления. В поджелудочной железе полнокровие сосудов, обширные кровоизлияния, диффузная воспалительная инфильтрация

из сегментоядерных лейкоцитов, лимфоцитов. Расширение протоков с наличием в них белкового секрета. Через 6 суток с момента моделирования во всех отделах брюшной полости определялся гнойный выпот, налёты фибрина на тонком, толстом кишечнике, печени. В сальнике брыжейки тонкого и толстого кишечника бляшки стеатонекроза. Поджелудочная железа, уходящая забрюшинно, тёмно-вишнёвого цвета, резко отёчна. Забрюшинная клетчатка вокруг железы отёчна, с геморрагическим пропитыванием. При микроскопическом исследовании отмечалось диффузное гнойное воспаление, местами с деструкцией ткани поджелудочной железы и клетчатки забрюшинного пространства (рисунок, см. цв. вкладыш).

Данные макро- и микроскопические изменения в поджелудочной железе и забрюшинной клетчатке подтверждают развитие у животных острого гнойно-некротического парапанкреатита. Среди преимуществ данного способа моделирования можно выделить следующие:

1. Моделируется не только острый деструктивный панкреатит, но и парапанкреатит с образованием гнойно-некротической полости в забрюшинной клетчатке.

2. Создание модели острого деструктивного панкреатита с парапанкреатитом в сравнении с другими способами наиболее полно отражает процессы, происходящие у больных с острым деструктивным панкреатитом в клинических условиях.

Выводы

Проведённые экспериментальные исследования показывают, что при моделировании по предложенной нами методике у животных развивается острый деструктивный панкреатит, парапанкреатит. Доказательством тому служат лабораторные данные, макро- и микроскопические изме-

нения в поджелудочной железе и забрюшинной клетчатке. При использовании данного технического решения, появляется возможность моделирования такого грозного осложнения деструктивного панкреатита, как острый гнойно-некротический парапанкреатит. Важными моментами предлагаемого способа является использование идентичной микрофлоры, как и при данной патологии в клинике, дислокация части поджелудочной железы в жировую клетчатку забрюшинного пространства. Данный способ моделирования является доступным для выполнения и может использоваться в научно-исследовательских лабораториях для изучения патогенеза заболевания и разработки новых методов диагностики и лечения острого деструктивного панкреатита, парапанкреатита.

ЛИТЕРАТУРА

1. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: surgical managements / S. Isaji [et al.] // J. hepatobiliary Pancreat. Surg. – 2006. – Vol. 13. – P. 48-55.
2. Management acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care / J. Werner [et al.] // Gut. – 2005. – Vol. 54. – P. 426-436.
3. Владимиров, В. Г. Острый панкреатит: Экспериментальное клиническое исследование / В. Г. Владимиров, В. И. Сергиенко. – М.: Медицина, 1986. – 240 с.
4. Surgical results for severe acute pancreatitis - comparison of the different surgical procedures / T. L. Hwang [et al.] // Hepatogastroenterology. – 1995. – Vol. 42. – P. 1026-1029.
5. First experience in treating severe acute pancreatitis with recombinant human interleukin-2 / A. D. Tolstoy [et al.] // Int. J. Immunorehabilit. – 2000. – Vol. 2, N 3. – P. 126.
6. Способ моделирования острого деструктивного панкреатита / А. О. Луговой [и др.] // Анналы хирург. гепатологии. – 2007. – Т.12, № 4. – С. 84-90.
7. Protective effect of YH1 and HNI-I against experimental acute pancreatitis in rabbits / L. G. Zhao [et al.] // World J. Gastroenterol. – 1998. – Vol.4, N 3. – P. 256-259.
8. Ultrastructural clues for the protective effect of melatonin against oxidative damage in cerulein-induced pancreatitis / M. Esrefoglu [et al.] // J. Pineal. Res. – 2006. – Vol. 40, N 1. – P. 92-97.
9. Leukotricnc receptor antagonism in experimental acute pancreatitis in rats / N. Oruc [et al.] // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. – 2004. – Vol. 16, N 4. – P. 383-388.
10. Острый панкреатит и травмы поджелудочной железы / Р. В. Вашетко [и др.]. – СПб., 2000. – 310 с.
11. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis / G. Andican [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 21, N 11 (15). – P. 2340-2345.
12. Effect of resvcratrol on pancreatic oxygen free radicals in rats with severe acute pancreatitis / Z. D. Li [et al.] // World J. Gastroenterol. – 2006. – Vol. 7, N 12 (1). – P. 137-140.
13. Величенко, В. М. Острый панкреатит в эксперименте и клинике / В. М. Величенко. – Минск, 1971. – 111 с.
14. Экспериментальное обоснование эффективности нейтрального анолита при лечении гнойно-некротического панкреатита / А. Х. Касымов [и др.] // Анналы хирург. гепатологии. – 2004. – Т. 9, № 2. – С. 181.
15. Экспериментальное моделирование острого панкреатита / С. В. Дорошкевич [и др.] // Новости хирургии. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 14-21.
16. Жук, И. Г. Органосохраняющие операции при острой патологии поджелудочной железы / И.Г. Жук. – Гродно: ГрГМУ, 2006.– 204 с.
17. Ischemia/reperfusion-induced pancreatitis in rats: a new model of complete normotherraie in situ ischemia of a pancreatic tail-segment / R. Obermaier [et al.] // Clin. Exp. Med. – 2001. – Vol.1, N 1. – P. 51-59.
18. Гнойно-некротический панкреатит и парапанкреатит: учеб.-метод. пособие / авт.-сост. Г. И. Синченко [и др.]; Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова. – СПб., 2005. – 64 с.
19. Острый деструктивный панкреатит. Диагностика, тактика, лечение: метод. рекомендации / П.В. Гарелик [и др.]. – Гродно, 2008. – 32 с.

Адрес для корреспонденции

230026, Республика Беларусь,
г. Гродно, ул. Пестрака д. 54, кв. 68,
тел. моб.: +375 29 786-50-28,
e-mail: ukevich@mail.ru,
Ушкевич А.Л.

Поступила 8.12.2009 г.