

Ю.С. ВИННИК, Л.А. ШЕСТАКОВА, О.В. ТЕПЛЯКОВА, Н.И. ЦЕДРИК,  
О.В. ПЕРЬЯНОВА, А.Г. ГИТЛИНА, С.В. ЯКИМОВ, А.М. ПЛАХОТНИКОВА

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ПЕРВИЧНО ИНФИЦИРОВАННОГО ПАНКРЕОНЕКРОЗА

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет  
имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»,  
Российская Федерация

**Цель.** Изучить возможность использования клинического штамма *A. baumannii* в моделировании первично инфицированного панкреонекроза у лабораторных животных – кроликов, оценить воспроизводимость и валидность усовершенствованной экспериментальной модели.

**Материал и методы.** Исследования выполнены на 10 кроликах-самцах породы Шиншилла в возрасте 4-5 месяцев. Усовершенствованный способ предусматривал срединную лапаротомию, пункцию желчного пузыря с забором 0,6 мл желчи. Индукцию панкреонекроза осуществляли механическим сдавлением ткани поджелудочной железы в трех стандартных точках браншами зажима Бильрота с последующим интрапаренхиматозным введением по 0,2 мл аутожелчи и взвеси клинического штамма *A. baumannii*.

**Результаты.** На 2-3 сутки после моделирования у лабораторных животных регистрировали клинические проявления синдрома системной воспалительной реакции: тахипноэ, тахикардию, гипертермию. Во время релапаротомии, выполненной через 72 часа после индукции панкреонекроза, в брюшной полости определялся мутный экссудат с наличием хлопьев фибрина, отмечалась дилатация желудка и тонкой кишки. Поджелудочная железа не дифференцировалась на фоне брыжейки тонкой кишки, представляя собой гомогенную массу сливающихся очагов стеатонекроза. Гистологически в биоптатах поджелудочной железы животных определялся лизис ацинарной и железистой паренхимы. При исследовании препаратов печени определялись признаки вторичного острого гепатита, в почках – картина интерстициального нефрита, в миокарде – признаки интерстициального миокардита. В легком обнаружены признаки бронхопневмонии и обструктивной эмфиземы с формированием булл. *A. baumannii* идентифицирован в количестве  $5,0 \times 10^7$  КОЕ/г из биоптатов поджелудочной железы и в количестве  $10^7$  КОЕ/мл из перитонеального экссудата. У четырех животных в перитонеальном экссудате *A. baumannii* обнаружен в сочетании с энтеробактериями и *Enterococcus spp.*

**Заключение.** Использование усовершенствованного способа позволило у всех животных воспроизвести инфицированный панкреонекроз с клинико-морфологическими проявлениями синдрома системной воспалительной реакции, распространенным бактериальным перитонитом и уровнем суперинфекции 40,0% через 72 часа с момента моделирования.

*Ключевые слова:* инфицированный панкреонекроз, моделирование, эксперимент, *A. baumannii*

**Objectives.** To study the possibilities of *A. baumannii* clinical strain in modeling of the primary infected pancreatic necrosis in laboratory rabbits as well as to evaluate the capability of reproduction and validity of the improved experimental model.

**Methods.** The research was carried out on 10 Chinchilla rabbits breed (males) aging 4-5 months. The improved technique provided the middle laparotomy, the puncture of the gallbladder with aspiration of 0,6 ml of bile. The pancreatic necrosis induction was performed with a mechanical pressure of pancreatic tissue in three standard points with Bilrot's clips and the following intraparenchymatous injection of 0,2 ml automobile and suspension of *A. baumannii* clinical strain.

**Results.** On the second and third days after modeling the clinical symptoms of the system inflammation reaction such as tachypnea, tachycardia and hyperthermia have been registered. During relaparotomy performed 72 hours after the pancreatic necrosis induction a cloudy exudate with the presence of fibrin strands was determined in the abdominal cavity; dilatation of the stomach and small intestine was noted. The pancreas was not clearly seen on the background of small intestines mesentery and looked like a homogenous mass consisted of the confluent steatonecrosis focuses. Hystologically lysis of the acinar and glandular parenchyma was determined in the pancreas biopsies of the animals. While liver sample examining the signs of secondary acute hepatitis were detected.

The kidneys characterized by the interstitial nephritis, the signs of interstitial myocarditis were observed in myocardium. The evidence of bronchopneumonia and obstructive emphysema with formation of bullas was revealed in the lungs.

*A. baumannii* was identified in the amount of  $5,0 \times 10^7$  CFU/g taken from pancreatic biopsy specimens and in the amount of  $10^7$  CFU/ml – from the peritoneal exudate. *A. baumannii* combined with enterobacteria and *Enterococcus spp.* has been detected in peritoneal exudates (4 animals).

**Conclusions.** The use of the improved method allowed to simulate the infected pancreatic necrosis in all the animals with clinical and morphological symptoms of the systemic inflammation reaction as well as with the generalization of bacterial peritonitis and level of superinfection of 40,0% within 72 hours from the moment of modeling.

*Keywords:* infected pancreatic necrosis, modeling, experiment, *A. baumannii*

Novosti Khirurgii. 2013 May-Jun; Vol 21 (3): 3-8

Experimental model of primary infected pancreatic necrosis

Y.S. Vinnik, L.A. Shestakova, O.V. Teplyakova, N.I. Cedrick,  
O.V. Peryanova, A.G. Gitlina, S.V. Yakimov, A.M. Plahotnikova

### Введение

Проблема острого панкреатита сохраняет свою актуальность. Занимая первые позиции по частоте госпитализаций в экстренной абдоминальной хирургии, деструктивная форма заболевания одновременно является лидером среди причин послеоперационной летальности [1]. Многие исследователи отмечают произошедшее за последнее десятилетие перераспределение летальности из фазы асептической деструкции в инфекционную, от развития панкреатогенного сепсиса [1, 2, 3].

Стабильно высокая частота гнойно-септических осложнений (25-60%) и связанный с ней риск летального исхода определяют актуальность экспериментального поиска эффективных средств лечебного воздействия в условиях инфицированного панкреонекроза и поднимают вопрос о выборе адекватной модели заболевания. Способы индукции панкреонекроза исторически принято классифицировать на каналикулярно-гипертензионные, сосудисто-аллергические, травматические, токсико-аллергические и смешанные. Наиболее часто в экспериментальной панкреатологии используются модели, предусматривающие введение в панкреатический или общий желчный проток животного веществ природного (желчь, желудочный сок, кишечное содержимое) или синтетического происхождения (таурохолат натрия, гликодезоксихолевая кислота, трипсин и др.), в том числе на фоне стимуляции внешней секреции поджелудочной железы (церулеином, секретинном, энтерокиназой) [4, 5, 6]. Недостатком каналикулярно-гипертензионных моделей является высокая травматичность и, как следствие, низкая продолжительность жизни экспериментальных животных, значительно ограничивающая возможность изучения динамики патоморфологических проявлений заболевания, а также технические сложности моделирования у мелких особей – грызунов [7, 8].

В настоящее время известно, что вероятность инфицирования железы мало зависит от этиологии заболевания (билиарная, алкогольная или травматическая) и в основном определяется объемом некроза органа [9]. С этих позиций, а также с учетом технической простоты для моделирования инфицированного панкреонекроза широко используются

способы механической и термической травмы [10]. В отличие от криодеструкции и термокоагуляции, нередко приводящих к формированию кисты или склерозированию участков паренхимы железы, механическая травматизация органа практически всегда сопровождается развитием истинного некроза. С учетом интраперитонеального расположения органа у экспериментальных животных для моделирования парапанкреатита некоторые исследователи предлагают перемещение мобилизованного участка железы в карман паранефральной забрюшинной клетчатки после индукции панкреонекроза [11].

С позиции современных требований к валидности экспериментальной модели принципиальное значение в моделировании инфицированного панкреонекроза приобретает обоснованный выбор этиологически значимого бактериального агента. Основным источником контаминации участков панкреонекроза считается содержимое тонкой кишки в условиях ее пареза и дисбиоза [9]. Вместе с тем некоторые исследователи не исключают значимости нозокомиального пути инфицирования и даже рассматривают инфицированный панкреонекроз как частный случай проблемы внутрибольничной инфекции [12]. Доказано, что нозокомиальное инфицирование значительно увеличивает госпитальную летальность и продолжительность стационарного лечения при панкреонекрозе [13]. В качестве наиболее «проблемных» микроорганизмов, ассоциированных с наибольшей летальностью и максимальными материальными затратами на лечение, большинство исследователей в последние годы называют грамотрицательные неферментирующие бактерии: *A. baumannii*, *P. aeruginosa* [14, 15, 16]. Между тем для моделирования инфицированного панкреонекроза в настоящее время продолжают использоваться гной из дренажей пациентов, кишечное содержимое животных, а также бактериальные культуры, не обладающие достаточной этиологической значимостью в современных условиях [11, 17].

Таким образом, меняющиеся представления об этиопатогенезе заболевания, а также регламент международных Принципов надлежащей лабораторной практики доклинических исследований, предусматривающий необходимость замены в опыте высокоорганизованных

животных (собак) менее развитыми особями с одновременной минимизацией их количества, не позволяют сделать обоснованного выбора в существующем многообразии моделей инфицированного панкреонекроза.

**Целью** исследования явилось изучение возможности использования клинического штамма *A. baumannii* в моделировании первично инфицированного панкреонекроза у лабораторных животных-кроликов, оценка воспроизводимости и валидности усовершенствованной экспериментальной модели.

### Материал и методы

Исследования выполнены на 10 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2,52-3,17 кг (2,81 (2,66; 2,94) кг) в возрасте 4-5 месяцев. Животных содержали в условиях вивария в изолированных клетках с 12-часовым циклом освещения при температуре 18-21°C с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказа МЗ РФ 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Оперативному вмешательству предшествовала премедикация атропином в дозе 0,2 мг/кг подкожно и ксилазином в дозе 4 мг/кг внутримышечно (за 20 минут до операции), внутривенная анестезия тиопентал-натрием (в дозе 30 мг/кг), фиксация на операционном столе, удаление волосяного покрова с передней брюшной стенки, антисептическая обработка операционного поля. После выполнения срединной лапаротомии осуществляли пункцию желчного пузыря иглой инсулинового шприца с забором 0,6 мл желчи и последующим закрытием пункционного отверстия Z-образным серо-серозным швом.

Индукцию панкреонекроза осуществляли механическим сдавлением ткани поджелудочной железы браншами зажима Бильрота до фиксации замка-кремальеры на первую ступень в трех предварительно выбранных точках: в наиболее проксимальном (у пилородуоденального изгиба) и наиболее дистальном отделах правой доли железы и в области хвоста левой доли органа (у селезенки). Продолжительность сдавления паренхимы в каждой точке составляла 30 секунд. Непосредственно после механической травматизации в каждой из трех выбранных точек в паренхиму железы последовательно вводили по 0,2 мл аутожелчи

и взвеси клинического штамма *A. baumannii* в концентрации  $10^5$  КОЕ/мл.

С первых часов после операции животные находились в условиях свободного доступа к воде и пище. При объективной оценке их состояния учитывали динамику двигательной активности, пищевого поведения, реакции на звуковой раздражитель, частоту дыхательных движений (ЧДД), частоту сердечных сокращений (ЧСС), температуру тела. Наблюдение продолжали в течение 72 часов после моделирования, после чего выживших животных подвергали релапаротомии, торакотомии с макроскопической оценкой состояния органов брюшной и плевральных полостей, забором биоптатов для гистологического исследования. Эвтаназию осуществляли интракардиальным введением воздуха при завершении повторной операции. Объем премедикации и анестезиологического обеспечения повторной операции не отличался от исходной.

Биоптаты органов (поджелудочной железы, печени, желудка, почек, легких, миокарда) фиксировали не менее 2 часов в 10% растворе нейтрального формалина. Обезжизнение проводили в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Полученные гистологические препараты изучали при увеличении  $\times 200$  и  $\times 400$ .

### Результаты и обсуждение

В течение первых суток после моделирования инфицированного панкреонекроза у всех животных отмечены изменения в поведении: вялость, уменьшение двигательной активности, отказ от приема пищи и увеличение потребности в воде. На 2-3 сутки состояние особей прогрессивно ухудшалось: регистрировались клинические проявления синдрома системной воспалительной реакции: тахипноэ, тахикардия, гипертермия; отмечена минимальная двигательная активность, слабая или отсутствующая реакция на звуковой раздражитель, отказ не только от приема пищи, но и воды. Случаев гибели животных в пределах 72 часов с момента моделирования не наблюдали.

Во время релапаротомии, выполненной спустя трое суток после моделирования панкреонекроза, в брюшной полости определялся мутный экссудат с наличием хлопьев фибрина, отмечалась дилатация желудка и тонкой кишки, желчное пропитывание в области гепатодуоденальной связки. Поджелудочная железа не дифференцировалась на фоне брыжейки

тонкой кишки, представляя собой гомогенную массу сливающихся очагов стеатонекроза серого цвета.

Гистологически в биоптатах поджелудочной железы животных определялся лизис ацинарной и железистой паренхимы (рис. 1).

У всех животных течение экспериментального панкреонекроза сопровождали системные воспалительные проявления. Так, при исследовании препаратов печени определялась картина вторичного острого гепатита: на фоне сохранения гистологической структуры органа отмечалось умеренное расширение портальных трактов, с выраженной лимфо-макрофагальной инфильтрацией, местами разрушающей пограничную пластинку, проникающая в дольки (рис. 2). По ходу инфильтратов отмечались некробиоз и некроз гепатоцитов.

В препаратах почек выявлена микроскопическая картина межпочечного (интерстициального) нефрита: лимфогистиоцитарная инфильтрация интерстиция органа, полнокровие капилляров, единичные лимфоциты и нейтрофильные гранулоциты в большей части клубочков. Отмечены интерстициальный отек с очаговой инфильтрацией лимфо-гистиоцитарными элементами и полиморфно-ядерными лейкоцитами; гиалиново-капельная, гидropическая дистрофия и фокальные некрозы в эпителии извитых канальцев проксимального и дистального отделов нефрона, в просвете канальцев определялись белковые цилиндры (рис. 3).

В стенке желудка выявлена дистрофия покровно-ямочного эпителия с очагами некробиоза, полнокровием сосудов собственной пластинки слизистой оболочки, подслизистой

основы, отмечена субсерозная инфильтрация лимфо-гистиоцитарными элементами и полиморфно-ядерными лейкоцитами (рис. 4).

Экстраабдоминальные воспалительные изменения отмечены в ткани легкого и миокарда. Гистологическая картина в легком характеризовалась наличием бронхопневмонии и обструктивной эмфиземы с формированием булл (рис. 5). В просвете мелких бронхов выявлен экссудат, содержащий полиморфно-ядерные лейкоциты, слущенный эпителий; инфильтрация распространялась на стенки бронхов. Перибронхиально выявлены ацинозные сливные участки инфильтрации нейтрофильными гранулоцитами.

В препаратах миокарда на фоне сохранения гистологической структуры органа отмечены признаки интерстициального миокардита: межклеточный отек, нейтрофильная и лимфо-гистиоцитарная инфильтрация (рис. 6).

При бактериологическом исследовании биоптатов поджелудочной железы возбудитель экспериментального инфицированного панкреонекроза (*A. baumannii*) идентифицирован в среднем количестве  $5,0 \times 10^7$  КОЕ/г. При этом у двух животных (20,0%) *A. baumannii* выделен в ассоциации с *P. mirabilis* и *E. faecalis*. Микробные ассоциации также изолированы при исследовании перитонеального экссудата, степень контаминации которого составила  $10^7$  КОЕ/мл. У четырех (40,0%) животных *A. baumannii* в перитонеальном экссудате обнаружен в сочетании с энтеробактериями (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Providencia spp.*) и *Enterococcus spp.*, что, возможно, объясняется транслокацией микрофлоры из просвета желудочно-кишечного тракта на фоне энтеральной недостаточности.

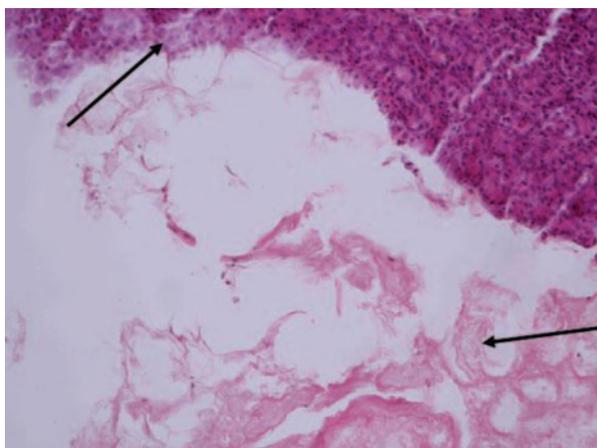


Рис. 1. Препарат поджелудочной железы кролика с моделью инфицированного панкреонекроза: лизис ацинарной и железистой паренхимы (отмечен стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

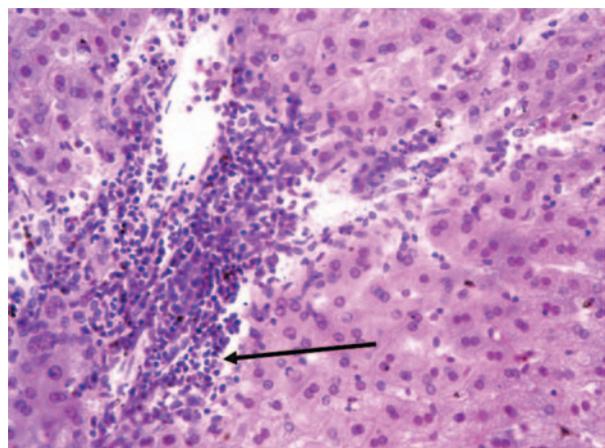


Рис. 2. Препарат печени кролика с моделью инфицированного панкреонекроза: межклеточный гепатит. Выраженная лимфо-макрофагальная инфильтрация (указана стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$

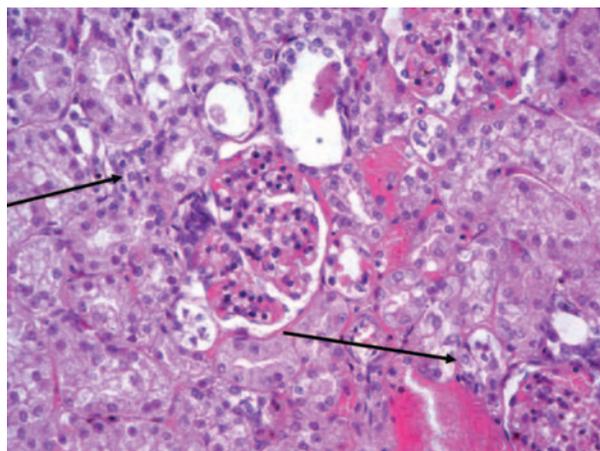


Рис. 3. Препарат почки кролика с моделью инфицированного панкреонекроза. Интерстициальный нефрит. Стрелками указана очаговая инфильтрация интерстиция органа лимфо-гистиоцитарными элементами и полиморфно-ядерными лейкоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$

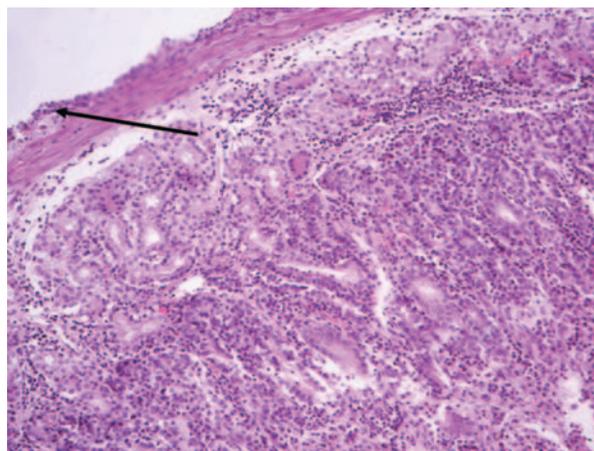


Рис. 4. Препарат стенки желудка кролика с моделью инфицированного панкреонекроза. Субсерозная инфильтрация лимфо-гистиоцитарными элементами и полиморфно-ядерными лейкоцитами (указана стрелкой). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 200$

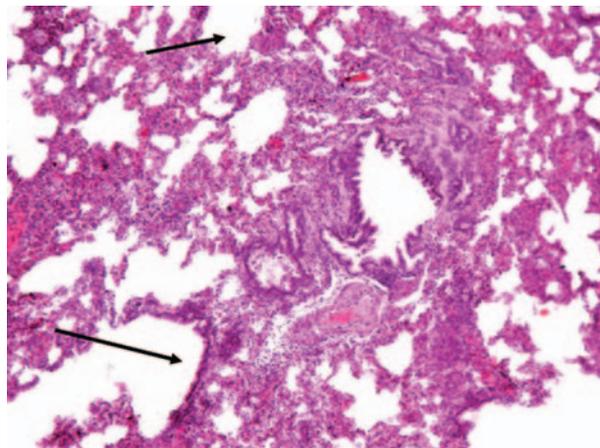


Рис. 5. Препарат ткани легкого кролика с моделью инфицированного панкреонекроза: обструктивная эмфизема с формированием булл (указаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 100$

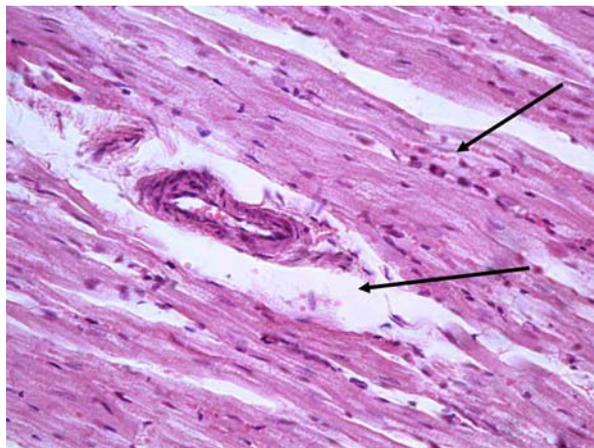


Рис. 6. Препарат ткани миокарда кролика с моделью инфицированного панкреонекроза. Межуточный миокардит. Отек интерстиция, инфильтрация нейтрофильными гранулоцитами и моноцитами (указаны стрелками). Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $\times 400$

### Заключение

Таким образом, использование усовершенствованного способа моделирования позволило у всех экспериментальных животных воспроизвести инфицированный панкреонекроз с клинико-морфологическими проявлениями синдрома системной воспалительной реакции, распространенным бактериальным перитонитом и уровнем суперинфекции 40,0% через 72 часа с момента моделирования.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иммунологические нарушения при панкреонекрозе и их коррекция / В. С. Тарасенко [и др.] //

Хирургия. Журн. им. Н. И. Пирогова. – 2013. – № 1. – С. 88–95.

2. Литвин А. А. Современные тенденции в хирургическом лечении острого некротизирующего панкреатита и инфицированного панкреонекроза / А. А. Литвин, В. М. Хоха // Вестн. клуба панкреатологов. – 2012. – № 15. – С. 31–35.

3. Миллер С. В. Лечение больных острым деструктивным панкреатитом / С. В. Миллер, Ю. С. Винник, О. В. Теплякова // Хирургия. Журн. им. Н.И. Пирогова. – 2012. – № 5. – С. 24–30.

4. Зиненко Д. Ю. Изменения структуры поджелудочной железы в условиях моделирования экспериментального острого панкреатита / Д. Ю. Зиненко, Т. В. Сухина // Морфология. – 2010. – Т. IV, № 1. – С. 17–21.

5. A novel animal model of severe pancreatitis in mice and its differences to the rat / W. Hartwig [et al.] //

- Surgery. – 2008 Sep. – Vol. 144, N 3. – P. 394–403.
6. Review of experimental animal models of biliary acute pancreatitis and recent advances in basic research / M. H. Wan [et al.] // HPB (Oxford). – 2012 Feb. – Vol. 14, N 2. – P. 73–81.
7. Liu Z. H. A simple taurocholate-induced model of severe acute pancreatitis in rats / Z. H. Liu, J. S. Peng, C. J. Li // World J Gastroenterol. – 2009 Dec 7. – Vol. 15, N 45. – P. 5732–39.
8. Su K. H. Review of experimental animal models of acute pancreatitis / K. H. Su, C. Cuthbertson, C. Christophi // HPB (Oxford). – 2006. – Vol. 8, N 4. – P. 264–86.
9. Парапанкреатит. Этиология, патогенез, диагностика, лечение / А. Д. Толстой [и др.]. – СПб. : Ясный Свет, 2003. – 256 с.
10. Дорошкевич С. В. Экспериментальное моделирование острого панкреатита / С. В. Дорошкевич, Е. Ю. Дорошкевич // Новости хирургии. – 2008. – Т. 16, № 2. – С. 14–21.
11. Ушкевич А. Л. Моделирование острого деструктивного панкреатита, парапанкреатита в эксперименте / А. Л. Ушкевич, К. Н. Жандаров, Н. И. Прокочник // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 2. – С. 8–14.
12. Петрова Е. В. Влияние госпитальной инфекции на течение деструктивного панкреатита / Е. В. Петрова, Н. Т. Алексеева, А. Ю. Корольков // Врач. – 2008. – № 4. – С. 68–70.
13. The impact of hospital-acquired infection on outcome in acute pancreatitis / B. U. Wu [et al.] // Gastroenterology. – 2008 Sep. – Vol. 135, N 3. – P. 816–20.
14. Динамика этиологической структуры и антибиотикочувствительности микрофлоры инфицированного панкреонекроза / С. В. Миллер [и др.] // Анналы хирургии. – 2011. – № 5. – С. 54–61.
15. Антибиотикочувствительность микрофлоры при деструктивных формах острого панкреатита / О. В. Перьянова [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2006. – Т. 62, № 4. – С. 22–25.
16. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital / L. L. Dent [et al.] // BMC Infect Dis. – 2010 Jul 7. – Vol. 10. – P. 196–202.
17. Шеина Е. А. Репаративные потенции тканей поджелудочной железы при экспериментальном инфицированном панкреонекрозе / Е. А. Шеина, Б. А. Стадников, А. А. Третьяков // Морфология. – 2008. – Т. 134, № 5. – С. 29–32.

#### Адрес для корреспонденции

660022, Российская Федерация,  
г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1,  
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный  
медицинский университет имени профессора  
В.Ф. Войно-Ясенецкого»,  
кафедра общей хирургии,  
тел. раб. +7 3912 220-19-09,  
e-mail: teplyakova-olga@yandex.ru,  
Теплякова Ольга Валерьевна

#### Сведения об авторах

Винник Ю.С., заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой общей хирургии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Шестакова Л.А., к.м.н., доцент, заведующая кафедрой патологической анатомии им. проф. П.Г. Подзолкова ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Теплякова О.В., к.м.н., докторант кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Цедрик Н.И., ассистент кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.

Войно-Ясенецкого».

Перьянова О.В., к.б.н., доцент, заведующая кафедрой микробиологии им. доц. Б.М. Зельмановича ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Гитлина А.Г., старший научный сотрудник ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Якимов С.В., д.м.н., профессор кафедры общей хирургии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Плахотникова А.М., студентка 6 курса ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого».

Поступила 17.01.2013 г.