

УДК 616.37-031.3-092.9

## ИЗМЕНЕНИЯ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО КРИОВОЗДЕЙСТВИЯ (экспериментальное исследование)

С.В. Дорошкевич, Е.Ю. Дорошкевич

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

*Выполнена локальная гипотермия поджелудочной железы белой крысы. В результате эксперимента выявлены органические изменения инфильтративного и воспалительного характера, особенности регенерационных процессов в органе. Предложенная модель панкреатита дает возможность изучить механизмы возникновения данной патологии и апробировать способы лечения.*

**Ключевые слова:** поджелудочная железа, белая крыса, гипотермия, экспериментальная модель.

*Local hypothermia of the pancreas of a white rat is accomplished. As a result of the experiment, organic changes of an infiltrative and inflammatory character, features of regeneration processes in the organ are revealed. The offered model of pancreatitis gives an opportunity to study mechanisms of the origin of the pathology and to approve the methods of the treatment.*

**Key words:** pancreas, a white rat, hypothermia, experimental model.

### Введение

Возросшие возможности медицины требуют решения фундаментальных аспектов этиопатогенеза патологии поджелудочной железы, теоретическому осмыслению новых и усовершенствованию известных методов оперативных вмешательств [1, 2, 4, 6, 7]. Запросы практической медицины не могут быть удовлетворены только на основании клинических наблюдений. В большинстве случаев решить поставленные задачи можно только в опытах на животных, в том числе путем создания экспериментальных моделей [5].

Для изучения механизмов развития острого панкреатита и его осложнений необходимо было создать модель заболевания, которой была бы присуща быстрота развития и яркая выраженность патологического процесса, а также близость по проявлениям к аналогичной патологии у человека. Для этого был избран способ локального криовоздействия на поджелудочную железу.

Цель исследования: изучить возможность моделирования патологии поджелудочной железы, основанной на локальной гипотермии.

### Материал и методы

Экспериментальные исследования проводились на нелинейных белых крысах весом 160-180 грамм. Использовались белые крысы – самцы, что позволяет исключить гормональное влияние, связанное с эстральным циклом на течение патологического процесса. Для обеспечения однородности генетических характеристик и улучшения качества эксперимента на нелинейных животных проводили производственное разведение 4-х линий с ведением инбредного ядра линий с целью поддержания однородности их характеристик. Питание осуществлялось по обычной диете в условиях вивария. Крысам был обеспечен свободный доступ к пище

и воде, их содержали в стандартных условиях с естественной 12-часовой сменой света и темноты. Работу проводили с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов.

Все животные были разделены на группы: I – крысы подвергнутые экспериментальной локальной гипотермии поджелудочной железы, II – ложнооперированные, III – интактные животные (таблица).

Таблица – Характеристика экспериментального материала

Наименование операции	Количество животных
Экспериментальная локальная гипотермия поджелудочной железы	258
Ложнооперированные	3
Интактные	3
Всего	264

В течение 18-24 часов до воспроизведения эксперимента животные не получали пищу, вода давалась в неограниченном количестве. Крыс выдерживали на голодном режиме с целью стандартизировать условия опыта, вызвать синхронизацию секреторного цикла в клетках поджелудочной железы.

Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Под эфирным наркозом производили срединную лапаротомию, отступая на 1 см от мечевидного отростка по белой линии живота длиной 3 см. Для расширения раны во время операции на лабораторных животных использовали ранорасширитель собственной конструкции (Патент РБ № 3641 «Ранорасширитель»). Зарегистрирован 02.04.2007 г.).

Для локальной гипотермии поджелудочной железы использовали криохирургический комплекс КСН 3А/В, применяемый для местного замораживания тканей.

Охлаждение железы осуществляли интраоперационно, путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника собственной конструкции, с определенными параметрами его рабочей части, позволяющей осуществить точечные воздействия. Рабочая часть криохирургического наконечника изогнута по отношению к основанию под углом в  $45^\circ$ , что расширяет предельный угол наклона инструмента в целом, а торцевая поверхность рабочей части имеет заданную площадь  $2 \text{ мм}^2$  (Патент РБ № 3979 «Криохирургический наконечник». Зарегистрирован 01.08.2007г.).

Воздействие низких температур осуществлялось в течение 60 секунд. Применение указанного наконечника позволяет осуществить стандартизацию криовоздействия на поджелудочную железу. Выбор времени воздействия обусловлен, с одной стороны, теплопроводностью криохирургического наконечника, а с другой – анатомическими параметрами поджелудочной железы крысы.

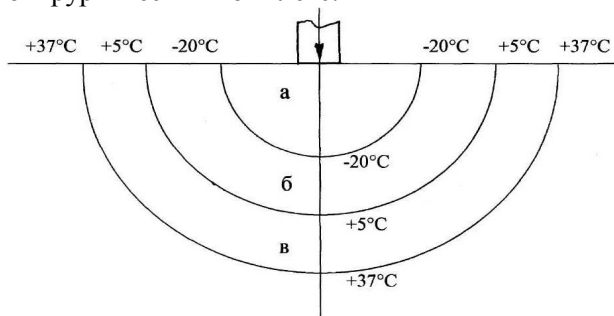
Использовались температурные режимы:  $-20^\circ\text{C}$ ,  $-60^\circ\text{C}$ ,  $-100^\circ\text{C}$ ,  $-140^\circ\text{C}$  и  $-180^\circ\text{C}$ , позволяющие в совокупности полно изучить воздействие низких температур в диапазоне отрицательных значений.

Рабочий режим инструмента, а также мгновенную и предельную температуру измеряли с помощью контрольных вкальвываемых термометров.

Воздействие температур свыше  $-180^\circ\text{C}$  не изучалось из-за технических возможностей используемого криохирургического комплекса.

При замораживании тканей в поджелудочной железе выделяют три зоны: зону замораживания или крионекроза, зону охлаждения и зону гипотермии. Температура на границе с зоной замораживания  $-20^\circ\text{C}$ , а с зоной гипотермии  $+5^\circ\text{C}$  «рисунок».

Визуально после криовоздействия хорошо определяется ледяное пятно. На границе с ледяным участком температура  $0^\circ\text{C}$ . Диаметр образовавшегося ледяного пятна измеряли штангенциркулем с игольчатыми губками (рацпредложение № 521, зарегистрирован ГГМУ 28.04.2001). Морфологические изменения в центральной части ледяного пятна характеризуют зону замораживания, а периферические отделы – зону охлаждения. Время замораживания задавали таймером, встроенным в криохирургический комплекс.



а – зона замораживания; б – зона охлаждения; в – зона гипотермии

Рисунок – Схема градиентов температур в очаге криовоздействия

Снижение температуры поджелудочной железы почти до  $+5^\circ\text{C}$  не оказывает заметного влияния на структуру, отмечено лишь обратимое угнетение экзокринной функции.

Величина участка замораживания зависит от температуры и размера рабочей части криохирургического наконечника, площади и массы замораживаемого участка, его температуры, вида ткани, ее гидрофильности и кровоснабжения. Диаметр сферы замороженной ткани определяется температурой криохирургического наконечника, согласно формуле:

$$\frac{D_b}{D_p} = 1 + \frac{K_s(T_i - T_p)}{K_t(T_t - T_i)}$$

где  $D_b$  – диаметр ледяного шарика в см;  $D_p$  – диаметр криохирургического наконечника;  $K_s$  – температурная проводимость замороженной ткани;  $K_t$  – температурная проводимость незамороженной ткани;  $T_i$  – точка замораживания ткани  $0^\circ\text{C}$ ;  $T_p$  – температура криохирургического наконечника;  $T_t$  – температура ткани, удаленной от места криовоздействия.

Охлажденный участок железы оттаивал в течение 30 секунд, после чего селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой погружали в брюшную полость. Для манипуляций на поджелудочной железе использовали пинцет собственной конструкции (Патент РБ № 4891 «Пинцет». Зарегистрирован 01.09.2008г.).

Операционную рану ушивали послойно наглухо. Для наложения швов применяли иглодержатель собственной конструкции, использование которого позволило существенно оптимизировать проведение оперативного вмешательства (Патент РБ № 4451 «Иглодержатель». Зарегистрирован 17.03.2008г.).

Сразу после операции животные получали пищу и питье в неограниченных количествах.

Чтобы дифференцировать патоморфологические изменения, развивающиеся под воздействием эфирного наркоза и лапаротомии в поджелудочной железе, была проведена II серия экспериментов – «ложная» операция. В этой серии в стерильных условиях под эфирным наркозом проводилась аналогичная срединная лапаротомия, в оперированную рану так же выводили селезеночный сегмент поджелудочной железы, вместе с сальником и селезенкой. После 60-секундной экспозиции вне брюшной полости возвращали обратно. Рану наглухо зашивали.

Забой животных во всех сериях проводился путем декапитации. Животных I группы забивали спустя 5, 30 и 60 минут, через 3, 6, 12 и 24 часа, на 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 и 90 сутки после локальной гипотермии поджелудочной железы. Указанные сроки забоя предусмотрены для того, чтобы детально проследить динамику патологического процесса после первичного экзогенного повреж-

дения органа и запуска аутокаталитических процессов до их логического завершения.

Во всех группах крыс забивали в промежутке от 10 до 12 часов утра, что давало возможность стандартизировать данные патоморфологических исследований.

Для гистологических исследований брали поджелудочную железу с парапанкреатической жировой клетчаткой, брыжейку тонкой и толстой кишки, большой сальник. Фиксацию проводили в 10% нейтральном формалине. После промывки в проточной воде проводили через спирты возрастающей концентрации, заливали в парафин с воском. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5 мкм. В работе использованы следующие гистологические методики: 1 – гематоксилин-эозин; 2 – пикрофуксин по Ван Гизону; 3 – окраска эластических волокон резорцин-фуксином по Вейгерту.

Полученные результаты обработали с помощью пакета компьютерных программ статистического анализа «Microsoft Excel 2003» и «Statistica 6.0».

### Результаты и обсуждение

Локальное охлаждение ткани поджелудочной железы в температурных режимах:  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-60^{\circ}\text{C}$ ,  $-100^{\circ}\text{C}$ ,  $-140^{\circ}\text{C}$  и  $-180^{\circ}\text{C}$  в течение 60 секунд вызывает образование ледяного пятна соответственно диаметрами:  $3,99 \pm 0,11$  мм,  $5,98 \pm 0,11$  мм,  $8,00 \pm 0,12$  мм,  $9,00 \pm 0,12$  мм и  $10,02 \pm 0,12$  мм. Структурные изменения, вызванные криовоздействием, могут быть определены как отечно-геморрагическая форма острого панкреатита. Последовательность развития экспериментального острого панкреатита, вызванного локальным криовоздействием, включает стадии: отечно-геморрагическую; некротическую; расплавления и элиминации; стадию склерозирования и атрофии.

Отечно-геморрагическая стадия (5 мин – 3 часа) характеризуется отеком соединительной ткани железы, дистрофическими изменениями панкреатитов различной степени выраженности и кровоизлияниями.

Морфологические проявления некротической стадии (6 – 24 часа) заключаются в наличии различной величины участков паренхиматозного некроза при слабо выраженной лейкоцитарной реакции.

На стадии расплавления и элиминации (3-14 сутки) выявляется лейкоцитарная инфильтрация очагов некроза, наблюдается рассасывание некротизированной ткани железы макрофагами, определяется разрастание молодой соединительной ткани.

Стадия склерозирования и атрофии (21-90 сутки) характеризуется пролиферацией соединительной ткани. Вторичная дифференцировка трубчатых эпителиальных структур поджелудочной железы неполноценна и завершается преимущественно атрофией.

Морфологическая картина острого экспериментального панкреатита зависит от температурного режима криовоздействия. Патоморфологические изменения после охлаждения в температурном режиме  $-20^{\circ}\text{C}$  являются локальными, ограниченной областью криовоздействия и завершаются рубцовой атрофией.

Морфологические изменения после воздействия холодом от  $-60^{\circ}\text{C}$  до  $-180^{\circ}\text{C}$  более выражены, что обусловлено увеличением площади криогенного повреждения поджелудочной железы.

Локальное криовоздействие в температурном режиме  $-60^{\circ}\text{C}$  приводит к развитию отечно-геморрагической формы острого панкреатита с исходом в хронический панкреатит с явлениями склероза и липоматоза органа. В патологический процесс вовлекается парапанкреатическая клетчатка. Очаги некроза в ней подвергаются лейкоцитарной инфильтрации и рассасыванию. К завершению эксперимента здесь выявляются скопления зрелой соединительной ткани.

Локальная гипотермия в температурных режимах  $-100^{\circ}\text{C}$  и  $-140^{\circ}\text{C}$ , кроме развития острого деструктивного панкреатита, более выраженного при криовоздействии  $-140^{\circ}\text{C}$ , приводит к формированию распространенных жировых некрозов в парапанкреатической клетчатке.

Охлаждение в температурном режиме  $-180^{\circ}\text{C}$  вызывает геморрагический панкреонекроз, сочетающийся с поражением парапанкреатической клетчатки, клетчатки брыжейки тонкой и толстой кишки и большого сальника. Развитие серозно-геморрагического перитонита приводит к гибели животных на 1-3 сутки после начала эксперимента.

В настоящее время все известные способы моделирования патологии поджелудочной железы разделяют на четыре группы [5]: 1) каналикулярно-гипертензионные; 2) сосудисто-аллергические; 3) травматические; 4) токсико-инфекционные.

Каналикулярно-гипертензионные модели предусматривают легирование главного выводного протока. Перевязку панкреатического протока у крыс обычным способом производить нельзя, так как у них протоки отдельных участков поджелудочной железы самостоятельно впадают в общий желчный проток. Вместе с тем, часто задача эксперимента требует использования мелких лабораторных животных: изучение эффективности терапии, серийные морфологические исследования и др.

Сосудистые модели относительно сложны для воспроизведения. Это связано с тем, что перевязка экстраорганных сосудов поджелудочной железы очень редко сопровождается развитием острого панкреатита.

Аллергические модели основаны на воспроизведении местного феномена Артюса или Санарелли – Швартцманна. В настоящее время считают,

что иммунизация животного тканевыми антигенами или введение панкреатотоксических сывороток без дополнительных воздействий вызывает в железе лишь хронический процесс. Кроме того, эти модели не позволяют объяснить большинство клинических проявлений и требуют более длительного времени.

Токсико-инфекционные модели предусматривают введение в протоки или (и) паренхиму поджелудочной железы желчи, бактерий, оливкового масла, скипидара, спирта, ферментов, токсинов и т.д. Эти способы пригодны для работы на мелких лабораторных животных и вызывают тяжелые поражения поджелудочной железы. К отрицательным свойствам этих методов следует отнести неблагоприятные влияния вводимых веществ на другие органы и системы и на весь организм в целом.

В определенной степени аналогичным предлагаемой модели является способ П.С. Симаворян [3], основанный на охлаждении поджелудочной железы крыс хлорэтилом. Предложенная методика не исключает общего и местного химического воздействия хлорэтила, она не позволяет изучить особенности локальных морфологических изменений в зависимости от температуры охлаждения.

Указанные модели могут быть использованы в большей степени для изучения эффективности лечения панкреатита, и в меньшей мере для исследования отдельных сторон его патогенеза.

### Заключение

Наблюдаемые после локального криовоздействия стадии течения панкреатита по своему морфологическому выражению аналогичны описанным в клинике.

Патогенез панкреатита в эксперименте складывается из последовательно развивающихся стадий: отечно-геморрагической, геморрагической и некротической с исходом в склероз и липоматоз органа.

Данная модель позволяет изучать патогенез и патоморфологию панкреатитов.

### Литература

1. Владимиров, В.Г., Острый панкреатит: Экспериментальное клиническое исследование / В.Г. Владимиров, В.И. Сергиенко. – М.: Медицина, 1986. – С. 59–86.
2. Дмитриев, А.В. Этиология, патогенез и лечение панкреатита / А.В. Дмитриев, В.А. Юдин, Н.А. Арапов // Клиническая медицина. – 1989. – Т. 67, № 7. – С. 66–69.
3. Канаян, А.С. Влияние тиосульфата натрия на поджелудочную железу при экспериментальном панкреатите / А.С. Канаян, П.С. Симаворян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1978. – № 11. – С. 548–552.
4. Савельев, В.С., Острый панкреатит / В.С. Савельев, В.М. Буянов, Ю.В. Огнев. – М.: Медицина, 1983. – С. 31–89.
5. Шалимов, С.А. Руководство по экспериментальной хирургии / С.А. Шалимов, А.П. Радзиховский, Л.В. Кейсевич. – М.: Медицина, 1989. – С. 190–205.
6. Bradley, E.L. A clinical based classification system of acute pancreatitis / E.L. Bradley // Arch. Surg. – 1993. – Vol. 128. – P. 586–590.
7. Surgical results for severe acute pancreatitis – comparison of the different surgical procedures / T.L. Hwang [et al.] // Hepatogastroenterology. – 1995. – Vol. 42. – P. 1026–1029.

Поступила 16.01.08