

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСТРАСФИНКТЕРНОГО СВИЩА ПРЯМОЙ КИШКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
Республика Беларусь

Задачей настоящей работы являлось создание простого и эффективного способа моделирования экстрасфинктерного параректального свища (хронического парапроктита) в эксперименте на мелких лабораторных животных (белых рандомбредных крысах). Поставленная задача достигалась следующим образом: после взвешивания лабораторного животного (белой рандомбредной крысы) под внутримышечным наркозом в параректальной области (отступя от анального отверстия 1-1,5 см) подкожно шприцем вводилась микробно-каловая суспензия. Последняя готовилась накануне эксперимента из содержимого прямой кишки животного путём разведения его с физиологическим раствором поваренной соли и фильтрации. При введении микробно-каловой взвеси в подкожную клетчатку вначале вводился воздух и в сформированный воздушный пузырьёк медленно вводился инфекционный агент. Через 7 суток после начала эксперимента (после формирования подкожного абсцесса) под внутримышечным наркозом через просвет прямой кишки выше верхней границы анального жома хирургической иглой с продетой в неё синтетической плетёной нитью с высокой фитильностью производился прокол стенки прямой кишки по направлению к околопрямокишечному гнойнику. Игла с нитью проводилась через просвет гнойника и выводилась через кожу. Лигатура нетуго завязывалась над областью промежности хирургическим узлом. После этого животные находились в индивидуальных клетках для предотвращения выгрызания лигатур и нанесения дополнительных травм друг другу со свободным доступом к пище и воде. Через 2 недели (14 суток) после манипуляции формировался точечный свищ на коже вблизи заднепроходного отверстия с умеренным гнойным отделяемым, который сообщался с просветом прямой кишки животного выше анального жома. Формирование эффективной модели прямокишечного свища подтверждено гистологически.

Эксперимент повторён на 22 животных (рандомбредных белых лабораторных крысах обоего пола массой $215,7 \pm 17,7$ г). При этом только в 1 случае (4,5%) развился нелокализованный гнойно-некротический процесс (гнилостная флегмона) в области инвазии с быстрой гибелью животного от септического шока. В остальных наблюдениях у всех животных отмечено однотипное формирование точечного свища на коже вблизи заднепроходного отверстия с умеренным гнойным отделяемым с патологическим сообщением с гнойной полостью и просветом прямой кишки животного выше анального жома. Проведенные гистологические исследования подтвердили наличие морфологических признаков экстрасфинктерного свища прямой кишки с формированием очага хронического гнойного воспаления в параректальной клетчатке. При проведении экспериментов всех животных содержали на стандартном рационе вивария. Все исследования проводили в полном соответствии с современными принципами биоэтики.

Техническим результатом проведенных исследований является создание приближенной к клиническим ус-

□ Оригинальные научные публикации

ловиям модели экстрасфинктерного гнойного свища прямой кишки с высоким уровнем его воспроизводимости. Модель по своей сути является простой и лёгкой для выполнения, достоверно воспроизводима на мелких лабораторных животных (беспородных белых лабораторных крысах).

Ключевые слова: хронический парапроктит, свищ прямой кишки, экспериментальная модель.

S. V. Shakhrai

MODELING OF EKSTRASFINKTERNY FISTULA OF A RECTUM IN EXPERIMENT

Problem of the present work was creation of a simple and effective way of modelling extrasphincteric fistulas in experiment on small laboratory animal (not purebred white laboratory rats). The task in view was reached as follows: after weighing of a laboratory animal (white rats) under an intramuscular narcosis in peri-ano-rectal area hypodermically the syringe entered suspension of excrements. Last prepared on the eve of experiment from contents of a rectum of an animal by its cultivation with a physiological solution of table salt and a filtration. At introduction suspension of excrements in hypodermic клетчатку air in the beginning was entered and the infectious agent slowly was entered into the generated air vial. In 7 days after the experiment beginning (after formation of a hypodermic abscess) under an intramuscular narcosis through a gleam of a rectum above the top border sphincter the surgical needle with the synthetic wattled thread passed in it with high matching made a puncture of a wall of a rectum in a direction to pararectal abscess. The needle with a thread was spent through a gleam of an abscess and deduced through a skin. The thread was fastened over an operation zone in surgical knot. After that animals were in individual cages and drawings of additional traumas each other with an easy approach to food and water. In 2 weeks (14 days) after manipulation the dot fistula on a skin close anal apertures with moderate purulent separated which was informed with a purulent cavity and a gleam of a rectum of an animal above sphincter was generated. Formation of effective model extrasphincteric fistulas is confirmed histological researches.

Experiment is repeated on 22 animal (white laboratory rats of both sexes in mass 215,7±17,7). Thus only in 1 case (4,5 %) the process non-local purulent (a putrefactive phlegmon) in the field of an invasion with fast destruction of an animal from a septic shock has educed. In other observations at all animals the same formation of a punctual fistula on a skin near to an anal orifice with moderate purulent abjoined with the pathological report with a purulent lumen and a lumen of a rectum of an animal above a proctal constrictor is noted. The carried out histological researches have confirmed presence of morphological characters extrasphincteric fistulas of a rectum with formation of the locus of a chronic purulent inflammation in a pararectal fat. At carrying out of experiments of all animals contained on a standard ration of a vivarium. All researches spent in full conformity with modern principles of bioethics.

Technical result of the spent researches is building of the model approached to clinical conditions extrasphincteric a purulent fistula of a rectum with high level of its reproducibility. The model inherently is simple and easy for performance, is authentically replicated on fine laboratory animal (not purebred white laboratory rats).

Key words: chronic paraproctitis, anal (rectum) fistula, experimental model.

Моделирование на животных в лабораторных условиях приближенных к реальной клинической ситуации патологических моделей в хирургии является важной компонентной оставляющей в алгоритме разработки и внедрения в практику новых способов лечения заболеваний. Для внедрения в клиническую практику малоинвазивных методик лечения ректальных свищей нами разработана новая экспериментальная модель данной патологии.

Известен ряд способов формирования гнойно-воспалительного процесса, локализованного в мягких тканях вблизи заднепроходного отверстия [1-4]. Одни авторы в бедренно-ягодичной области крысы создают шаблонную рану (глубиной до поверхностной фасции), кожные края которой и подлежащие мышцы раздавливаются зажимом. К краям раны подшивается пластмассовое кольцо с крышечкой. Рана заражается 2 мл 24-часовой взвесью микробов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* и *Clostridium difficile*, взятых в равных объёмах), содержащей в 1 мл 10⁹ микробных тел (концентрация определяется по стандарту мутности), и накрывается марлевым шариком. Крышечка закрывается путём подшивания её к кольцу отдельным узловым швом. Признаки гнойного воспаления развиваются через 48 часов после манипуляции [1, 2].

Другие авторы [3] после воспроизведения раны на бедре задней лапки крысы, раздавливания её краёв и дна зажимом Кохера, инфицируют рану путём размещения в ней марлевого тампона с взвесью суточной культуры *Staphylococcus aureus* с концентрацией 10¹⁰ микробных тел в 1 мл 0,9%-ного раствора NaCl, на рану накладывают адаптирующие кожные швы. На 3-е сутки от начала эксперимента в ране развиваются явления острого гнойного воспаления.

Третьи авторы [4] для воспроизведения гнойного воспаления имплантируют в рану контейнер, содержащий активные микробные ассоциации (в качестве контейнера используют гра-

нулы сорбента «Силикагель»). Гранулы сорбента предварительно насыщают жидкой питательной средой - мясопептонным бульоном, после чего в среду вносят культуры стафилококков, стрептококков и кишечной палочки. Для стимуляции размножения микробной флоры обсемененные ею гранулы выдерживают при постоянной температуре 35^oC в течение суток. Подготовленные таким образом гранулы сорбента имплантируют в рану экспериментального животного. Кожу над имплантированным «микробным резервуаром» ушивают. Гнойное воспаление в ране развивается через 24 часа после моделирования [4].

Недостатками описанных способов являются:

а) морфологические изменения мягких тканей при таком варианте моделирования процесса характерны для острого гнойного воспаления (по типу острой гнойной раны) без проявлений хронического воспаления (признаков пролиферации, склероза и фиброза);

б) для индуцирования микробного воспаления берётся культура (микробная смесь) «музейных» штаммов бактерий, которые (хотя эмпирически и соответствуют возбудителям данного патологического процесса у человека), однако не являются для конкретного экспериментального животного аутохтонной микробной флорой его прямой кишки (т.е. в полной мере не соблюдается принцип этиотропности и патогенетичности воспроизведения патологического процесса);

в) создаётся изолированный гнойник в мягких тканях, не имеющий патологического сообщения с просветом прямой кишки (именно процесс эндогенного реинфицирования и непрерывного воздействия на полость гнойника микрофлоры и других компонентов содержимого прямой кишки лежит в основе хронизации воспалительного процесса в параректальных тканях);

г) у некоторых животных, как это отмечается авторами метода [1, 2], при таком способе моделирования воспалительно-

го процесса развивается не локализованная гнилостная инфекция в области раны, и даже - гангрена задней конечности с генерализацией инфекционного процесса и быстрой гибелью животных от септического шока и полиорганной недостаточности.

Наиболее близкого способа моделирования хронического гнойного воспаления в параректальной клетчатке с наличием наружного (кожного) гнойного свища и патологического сообщения с просветом экстрафинктерного отдела прямой кишки (прототипа) в доступной литературе нами не было обнаружено.

Целью работы является разработка эффективной экспериментальной модели экстрафинктерного свища у лабораторных животных максимально приближенной к патогенетическим механизмам формирования аналогичного процесса у человека для последующей разработки малоинвазивных методов лечения.

Материалы и методы.

Способ моделирования прямокишечного свища включал в себя следующие этапы: после взвешивания лабораторного животного (белой рандомбредной крысы) под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчёта 0,35 мл на 100 г веса) в область пахово-бедренной области (отступая от анального отверстия 1-1,5 см) подкожно шприцем вводилась микробно-каловая суспензия (из расчёта 0,5 мл на 200 г веса животного (рисунок 1). Последняя готовилась накануне эксперимента из содержимого прямой кишки животного (кала) путём разведения его в соотношении 1:4 физиологическим раствором поваренной соли и фильтрации через 5 слоёв медицинской марли. При введении микробно-каловой взвеси в подкожную клетчатку вначале вводился воздух в объёме 1,0 мл и в сформированный воздушный пузырёк медленно вводился инфекционный агент. Через 3-е суток в области инъекции формировался воспалительный инфильтрат 3,2±1,1 см в диаметре, к 7-м суткам отмечалось центральное размягчение инфильтрата с формированием в этой зоне подкожного гнойника со средними размерами 1,8±0,5 см (рисунок 2). Через 7 суток после начала

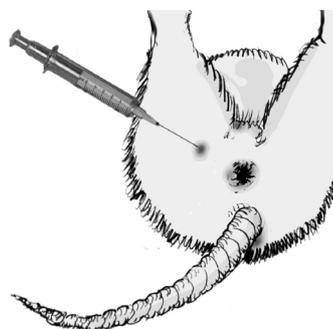


Рисунок 1 – Введение микробно-каловой взвеси в подкожную клетчатку.



Рисунок 2 – Формирование воспалительного инфильтрата с гнойником в подкожной клетчатке вблизи от анального отверстия.

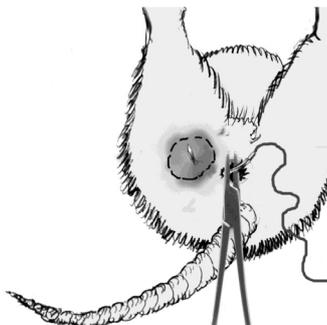


Рисунок 3 – Проведение иглы с хирургической нитью через прямую кишку (вне сфинктера) и полость гнойника.

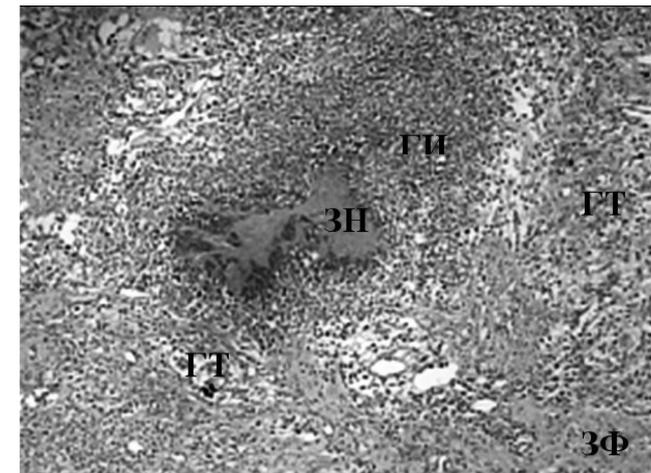


Рисунок П 1.1 – Зональное разделение стенки свищевого хода подкожно-жировой клетчатки крысы (окраска - гематоксилин и эозин, увеличение x100)

эксперимента (после формирования подкожного абсцесса) под внутримышечным наркозом (введением комбинации 2 мл 0,25%-ного раствора дроперидола и 1 мл 0,005%-ного раствора фентанила из расчёта 0,35 мл на 100 г веса) через просвет прямой кишки выше верхней границы анального жома хирургической иглой с продетой в неё синтетической плетёной нитью с высокой фитильностью (капрон № 6) производился прокол стенки прямой кишки по направлению

к околопрямокишечному гнойнику. Игла проводилась через просвет гнойника и выводилась через кожу (рисунок 3). Вслед за иглой проводилась и толстая хирургическая нить (рисунок 4). Лигатура нетуго завязывалась над областью промежности хирургическим узлом, избыток её иссекался (рисунок 5). После этого животные находились в индивидуальных клетках для предотвращения выгрызания лигатур и нанесения дополнительных травм друг другу со свободным доступом к пище и воде. Через 2 недели (14 суток) после манипуляции формировался точечный свищ на коже вблизи заднепроходного отверстия с умеренным гнойным отделяемым, который сообщался с гнойной полостью и просветом прямой кишки животного выше анального жома. Животных выводили из эксперимента на 17-е сутки с изъятием тканей параректальной области в зоне формирования свища для гистологического исследования.

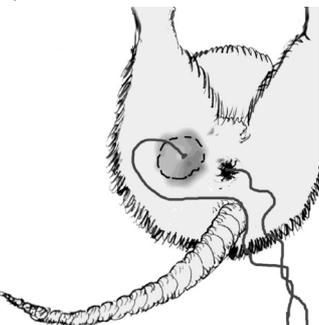


Рисунок 4 – Хирургическая нить, проведенная через просвет прямой кишки, полость параректального гнойника и выведенная на кожу промежности.

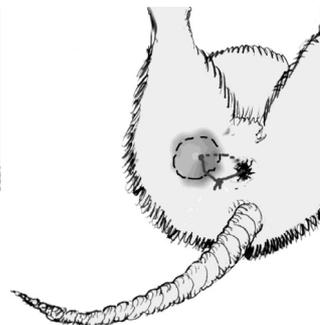


Рисунок 5 – Окончательный вид промежности лабораторного животного после проведения хирургической нити и завязывания лигатуры.

❑ Оригинальные научные публикации

ла, затем проводились по спиртам возрастающей концентрации, после чего промывались в дистиллированной воде и окрашивались гематоксилином в течение 1 часа и 30 минут. Затем проводилась промывка в проточной воде (2-3 минуты) и помещение срезов в эозин на 40 секунд. После промывки в спиртах и проведения в ксилолах (две смены по 20 минут, третья – в течение 1 часа) срезы заключали под покровное стекло с помощью бальзама. На светооптическом уровне при изучении гистологических препаратов с помощью микроскопа фирмы «Zeiss» (увеличение x100, x200, x400) оценивали воспалительные и репаративные особенности в зоне вмешательства: характер формирования и организации свищевых ходов.

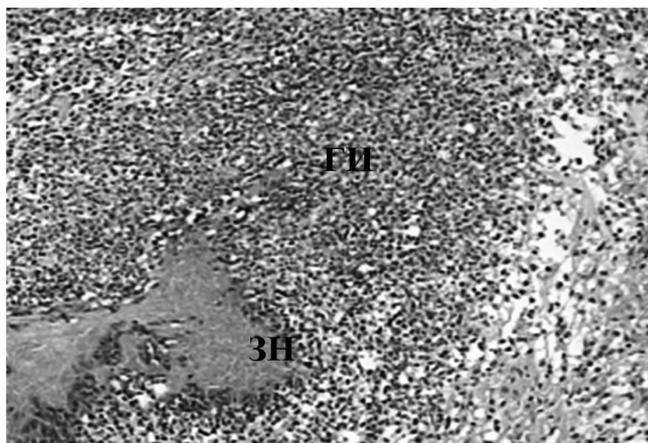


Рисунок П 1.2 – Центральная зона некроза свищевого хода, окружена выраженной гнойной инфильтрацией (окраска - гематоксилин и эозин, увеличение x200)

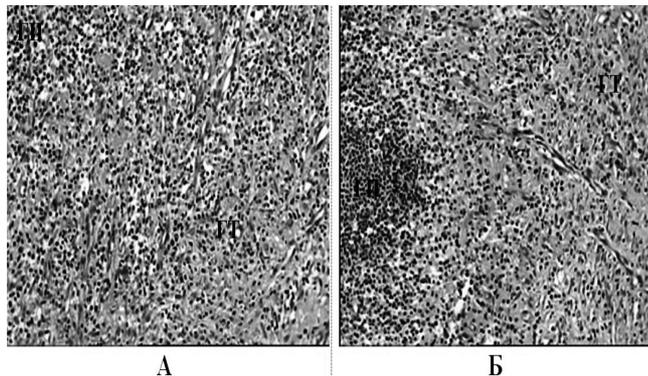


Рисунок П 1.3 – Разрастания грануляционной ткани с параллельной (А) и перпендикулярной (Б) ориентацией сосудов по отношению к центральной зоне некроза (окраска - гематоксилин и эозин, увеличение x200)

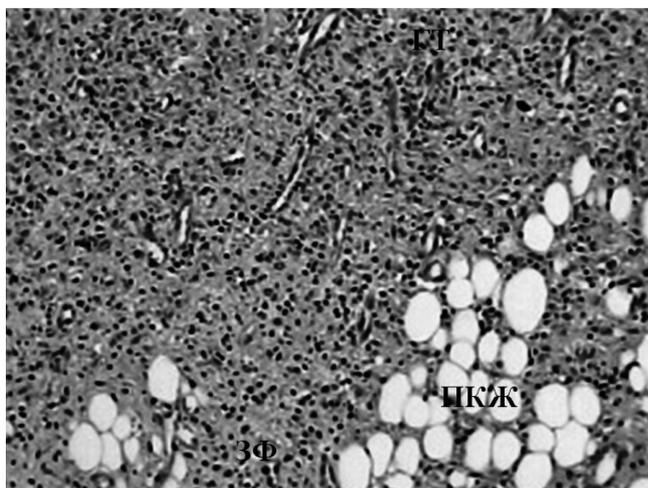


Рисунок П 1.4 – Зона фиброобразования (ЗФ) в стенке свищевого хода (окраска - гематоксилин и эозин, увеличение x200)

При проведении экспериментов всех животных содержали на стандартном рационе вивария. Все исследования проводили в полном соответствии с современными принципами биоэтики, в том числе «Европейской конвенцией по защите прав позвоночных животных» (принятой в г. Страсбурге 18.03.1986 г.) и «Всемирной декларацией прав животных» («Universal Declaration of Animal Rights», принятой Международной Лигой Прав Животных в 23 сентября 1977 года в Лондоне и объявленной 15 октября 1978 года в штабе ЮНЕСКО в г. Париже) после согласования плана эксперимента на комиссии по биоэтике государственного учреждения образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования». Моделирование свища прямой кишки, содержание животных, выведение их из эксперимента и забор материала проходили в условиях операционной вивария и выделенном специальном помещении, соответствующем всем правилам и нормам при работе с условно-патогенными микроорганизмами, с соблюдением всех правил асептики и антисептики [Республиканские санитарно-гигиенические и санитарно-противоэпидемические правила и нормы. Безопасность работы с микроорганизмами 3 и 4 групп патогенности и гельминтами. Санитарные правила СП 17-129 РБ 2000. – Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2002. - 52 с.; Республиканские санитарные нормы, правила и гигиенические нормативы. Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев). Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006. - Минск: Министерство здравоохранения Республики Беларусь, 2006. -19 с.]

Результаты и обсуждение.

Эксперимент повторён на 22 животных (рандобредных белых лабораторных крысах обоего пола массой 215,7±17,7 г). При этом только в 1 случае (4,5%) развился нелокализованный гнойно-некротический процесс (гнилостная флегмона) в области инвазии с быстрой гибелью животного от септического шока. В остальных наблюдениях у всех животных отмечено однотипное формирование точечного свища на коже вблизи заднепроходного отверстия с умеренным гнойным отделяемым с патологическим сообщением с просветом прямой кишки животного выше анального жома. Проведенные гистологические исследования подтвердили наличие морфологических признаков экстрасфинктерного свища прямой кишки с формированием очага хронического гнойного воспаления в параректальной клетчатке

При морфологическом исследовании в стенке свищевого хода в зоне подкожно-жировой клетчатки параректальной области у всех выживших крыс выделены следующие зоны: центральная (собственно зона свища), представлена зоной некроза (ЗН), которая окружена перифокальной гнойной инфильтрацией (ГИ); затем отмечена зона грануляционной ткани (ГТ) с полиморфноядерно-клеточной инфильтрацией, представленной лимфоцитами, макрофагами и фибробластами с примесью сегментоядерных нейтрофилов; за грануляционной тканью выделена зона фиброобразования (ЗФ) – поля формирования фиброзной ткани (рисунок П 1.1).

Центральная зона свищевого хода представлена бесструктурными гомогенными некротическими массами, окрашенными в голубовато-розовый цвет. Некротические массы окружены зоной выраженной гнойной инфильтрацией, сформированной сегментоядерными нейтрофилами. Плотность гнойной инфильтрации уменьшается по мере удаления от зоны некроза (рисунок П 1.2).

По периферии некроза и перифокальной инфильтрации в наружных слоях свищевого хода определяется формирование грануляционной ткани, представленной отёчной, густо васкуляризированной тканью с полиморфноядерно-клеточной инфильтрацией, среди которой, наряду с единичными нейтрофилами, определяются лимфоциты и макрофаги, отмечается пролиферация фибробластов (рисунки П1.3А и П 1.3Б).

В наружных отделах свищевого хода определяется уменьшение количества сосудов, снижение отёка, уменьшение плотности воспалительной инфильтрации с отсутствием среди клеток вос-

паления сегментоядерных нейтрофилов и формирование фиброзной ткани (рисунок П 1.4).

Формирование свищевого хода в параректальной области крыс приводит к замещению подкожно-жировой клетчатки (ПКЖ) и других тканевых структур данной области фиброзной тканью (рисунок П 1.4).

Выводы

1. Техническим результатом проведенных исследований является создание приближенной к клиническим условиям модели экстрасфинк-терного гнойного свища прямой кишки с высоким уровнем его вос-производимости.

2. Созданная модель параректального свища по своей сути является простой и лёгкой для выполнения, достоверно воспроизводима на мелких лабораторных животных (беспородных белых лабораторных крысах).

Литература

1. Гинюк, В. А. Методика моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса у лабораторных животных и проведения эксперимента по лечению полученных гнойных ран с помощью

Оригинальные научные публикации

фоторегуляторной и фотодинамической терапии / В. А. Гинюк. – Медицинский журнал. – 2009. – № 1. – Электронный доступ: <http://www.bsmu.by/files/mj/1-2009/12.pdf>. – Дата доступа: 12. 04. 2012 г.

2. Гинюк, В. А. Методика моделирования острого местного гнойно-воспалительного процесса у лабораторных животных / В. А. Гинюк. – Электронный доступ: <http://www.medocenka.ru/metodika-modelirovaniya-ostrogo-mestnogo-gnoyno-vozpалitel'nogo-protsessа-u-laboratornyih-zhivotnyih-1342.html>. – Дата доступа: 12.04.2012 г.

3. Изменения в нейронах спинномозговых узлов крысы в процессе моделирования глубоких ран кожи, осложнённых гнойной инфекцией / Н. Т. Алексеева [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 12. – С. 35–36.

4. Мацнева, Е. Н. Опыт моделирования острой гнойной раны у крыс линии Vistar / Е. Н. Мацнева // Сб. мат. 55-й Итоговой студенческой научной сессии Студенческого научного общества МГМСУ / под ред. Заслуженного деятеля науки Российской Федерации, проф. И. Ю. Лебеденко. – М.: МГМСУ, 2007. – 65 с. – Электронный доступ: http://stud.integron.ru/?mainer=matsneva&cell_one=science. – Дата доступа: 12.04.2012 г.

Поступила 11.06.2012