

В. Л. Денисенко¹, Ю. М. Гаин², С. В. Шахрай², Э. И. Веремей³,
В. А. Журба³, В. М. Рукаль³, М. Ю. Гаин²

МОДЕЛИРОВАНИЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ОБТУРАЦИОННОЙ ТОЛСТОКИШЕЧНОЙ НЕПРОХОДИМОСТИ

¹УЗ «Вторая Витебская областная клиническая больница»;

²ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

³УО «Витебской ордена Знак Почёта государственная академия ветеринарной медицины»

Большинство авторов за последние десятилетия отмечают увеличение числа пациентов с раком ободочной и прямой кишки. По оценке ВОЗ, рак толстой кишки занимает 3-4 место в структуре онкологической заболеваемости, а количество больных с запущенными формами достигает 70% [1, 3, 9]. Ежегодно в мире регистрируется 600 тысяч новых случаев колоректального рака, половина из которых умирает [12]. Колоректальный рак составляет 15% от всех первично диагностированных опухолей всех локализаций (30% из их числа представлено раком прямой кишки), от которого ежегодно умирает порядка 100 000 человек [13, 16]. Развитые страны мира несут огромные экономические потери в связи с заболеваемостью колоректальным раком и его осложнений [4].

Общепризнанным подходом изучения патологических механизмов наиболее частого осложнения колоректального рака - острой толстокишечной непроходимости – и для отработки эффективных способов лечения осложнений являются исследование изменений в организме лабораторных животных и экспериментальная оценка эффективности тех или иных лечебных технологий на конкретной модели патологического состояния. В настоящее время имеется большое количество способов моделирования указанных патологических состояний. В экспериментальной хирургии известны способы моделирования обтурационной толстокишечной непроходимости путём лапаротомии и сужения просвета толстой кишки в её дистальных отделах (на уровне нисходящей ободочной или сигмовидной кишки, ректосигмоидного отдела толстой кишки) с использованием специальных колец, полосок материи, лигатур. Недостатками этих способов являются: сложность выполнения; длительность общей анестезии (наркоза); необходимость выполнения травматичной операции для создания модели – лапаротомии, существенно утяжеляющей состояние животного, с дальнейшей манипуляцией на толстой кишке; невозможность формирования препятствия на уровне прямой кишки (у человека опухолевая обтурация прямой кишки – один из вероятных и частых источников низкой обтурационной непроходимости кишечника); невозможность без релапаро-

томии и манипуляции на толстой кишке оборвать патологический каскад развития болезни. В настоящее время отсутствует способ, лишённый всех перечисленных недостатков [5, 6, 7, 11].

Хирургическая тактика при возникновении осложнений со стороны опухолей толстой кишки до настоящего времени продолжает оставаться предметом дискуссий. Наиболее частым осложнением колоректального рака является острая толстокишечная непроходимость [11, 14, 15]. Отсутствует единый подход хирургов и онкологов на вопросы хирургической тактики при различных формах осложнений колоректального рака, нет общепринятой тактики к выбору методов хирургического лечения и завершения операции, что требует дальнейшего научного поиска. Создание модели острой толстокишечной непроходимости, максимально приближенной к реальным клиническим условиям, будет способствовать созданию технологий, повышающих эффективность комплексного лечения осложнений колоректального рака.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования проведены с использованием 40 белых рандомбредных крыс (20 самцов и 20 самок) в возрасте от 1 до 2 лет, с массой от 300 до 320 г (в среднем $309,3 \pm 12,1$ г).

В первой группе крыс (первая опытная серия, 10 животных – 5 самцов и 5 самок) под ингаляционными изофлюрановым наркозом при помощи аппарата Vet Quip накладывали кишечный шов на сфинктер прямой кишки и фиксировали через пуговицу (путём завязывания) для предупреждения самостоятельного удаления лигатуры и облегчения устранения обтурации в определённые сроки (рисунок 1).

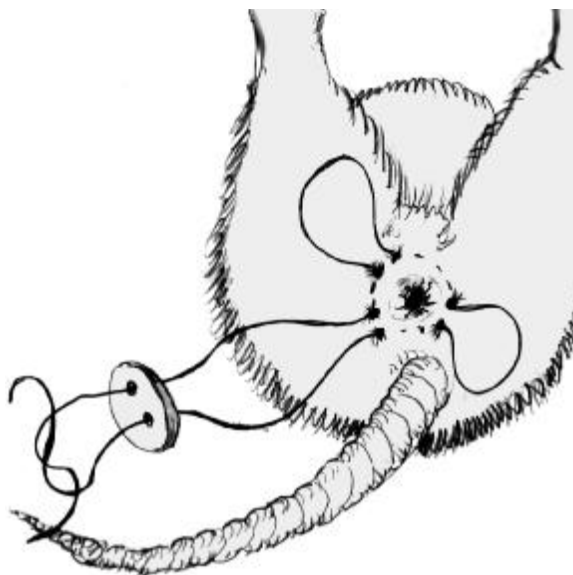


Рисунок 1. Схема наложения компрессирующего устройства на конечный отдел прямой кишки крысы.

В послеоперационном периоде за животными осуществляли динамическое наблюдение с фиксацией изменений двигательной активности, пищевого режима, других внешних проявлений патологического процесса. На 4-е сутки животных выводили из эксперимента под наркозом путём эвтанази, проводили морфологическое исследование внутренних органов и забор материала для гистологического и микробиологического исследования (всего взято 150 проб для исследования микрофлоры и оценки её чувствительности к антибиотикам из различных отделов брюшной полости, просвета тонкой и толстой кишки, а также из воротной вены).

Во второй группе крыс (вторая опытная серия, 10 животных- 5 самцов и 5 самок) под ингаляционным изофлюрановым наркозом при помощи аппарата Vet Quip накладывали компрессирующее устройство на дистальный отдел прямой кишки аналогично животным первой группы. Животным этой группы устраняли явления обтурации прямой кишки на 4-е сутки послеоперационного периода путём снятия кисетного шва и лёгкой дивульсии ануса. Срок выведения из эксперимента в первой и второй группах (4-е сутки) был определён на основании данных, полученных в третьей экспериментальной группе. При этом было установлено, что на 4-е сутки после моделирования илеуса выживает абсолютное большинство животных. К указанному сроку у всех животных имеют место клиничко-морфологические и лабораторные признаки обтурационной толстокишечной непроходимости, перитонита и абдоминального сепсиса. Устранение обтурации в этом сроке приводит к постепенному выздоровлению большинства животных данной группы с разрешением явлений кишечной непроходимости.

В третьей группе крыс (контрольная серия, 10 животных- 5 самцов и 5 самок) под ингаляционными изофлюрановым наркозом при помощи аппарата Vet Quip накладывали компрессирующее устройство на дистальный отдел прямой кишки аналогично животным первой и второй группы. В послеоперационном периоде за животными осуществляли динамическое наблюдение с фиксацией изменений двигательной активности, пищевого режима, других внешних проявлений патологического процесса, отмечали сроки гибели с изучением во время аутопсии морфологических изменений со стороны внутренних органов (при этом проведена множительная оценка функции выживания по Каплан-Мейеру) [8].

Крысы четвёртой группы (фоновая серия, 10 животных – 5 самцов и 5 самок) никакому вмешательству не подвергались, содержались в обычных условиях вивария (гематологические показатели и их поведенческая реакция служили контролем для сравнительной оценки с лабораторными данными животных других групп).

До операции из хвостовой вены всех животных брали кровь на гемограмму, а при снятии животных кровь на исследование брали из венозных сосудов шеи.

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 марта 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).

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с применением пакета прикладных программ «Statistica» (Version 6-Index, StatSoft Inc., США). Для выявления достоверных различий использовали непараметрический U критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Для сравнения достоверности изменения частот бинарного признака в двух независимых группах использовали χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность [8].

Результаты и обсуждение

Начиная в первые суток наблюдения за животными, поведенческая реакция их прогрессивно изменялась. В первые двое суток в основных и контрольной группах крысы выпивали $98,6 \pm 9,16$ мл воды в сутки с нарастанием объёма выпиваемой жидкости на 3-е сутки до $152,3 \pm 13,4$ мл (к этому сроку они съедали только $15,3 \pm 3,22$ г зерна). В первые трое суток постепенно отмечалось снижение их физической активности. В группе фоновых животных крысы выпивали $82,3 \pm 6,13$ мл воды ежедневно. На третьи сутки в первых трёх группах крысы стали менее активными, шерсть приобрела взъерошенный характер, употребление воды увеличилось. На четвёртые сутки в первых трёх группах животы крыс заметно увеличились в размерах, животные стали малоподвижные, агрессивные, употребление воды уменьшилось до $30,0 \pm 5,47$ мл ($p < 0,05$). До этого срока (через 74 часа после моделирования патологического процесса) пала одна крыса (из II группы). На аутопсии у неё выявлен распространённый фибринозно-гнойный перитонит, признаки сепсиса и полиорганной недостаточности.

Все животные третьей группы погибли на 5-6-е сутки послеоперационного периода от тяжёлого распространённого перитонита на фоне выраженной обтурационной толстокишечной непроходимости с явлениями сепсиса и полиорганной недостаточности. У 5 животных (50%) при этом отмечались множественные перфорации тонкой и толстой кишки с поступлением содержимого в свободную брюшную полость (рисунок 2). Микроскопически во

внутренних органах отмечались выраженные дистрофические, некротические и воспалительные изменения, а также изменения со стороны сосудов, характерные для септического шока.

У животных третьей группы после устранения у них явлений обтурации путём снятия кисетного шва отмечено постепенное восстановление общего состояния: через 1-1,5 сут. отмечено уменьшение живота в размерах, животные имели обильный стул, зарегистрировано восстановление физической и пищевой активности. В этой группе зарегистрирована гибель одной крысы (на 5-е сутки), при вскрытии которой отмечены явления неразрешившегося распространённого перитонита.

Таким образом, наиболее оптимальным сроком принятия решения при разработанном варианте моделирования непроходимости толстой кишки (в том числе, и для выполнения планируемых лечебных мероприятий) являются 4-е сутки после наложения обтурирующего устройства на прямую кишку. Именно в этом сроке у животных отмечаются все клиникo-морфологические признаки тяжёлой непроходимости кишечника с признаками развивающегося (развившегося) абдоминального сепсиса. Данное положение подтвердили морфологические исследования внутренних органов животных I группы, выведенных из эксперимента через 4 суток после моделирования патологического процесса.



Рисунок 2 – Изменения со стороны тонкой и толстой кишки, а также брюшной полости крысы, павшей на 5-е сутки после моделирования низкой обтурационной толстокишечной непроходимости. Отмечаются резкая дилатация тонкой и толстой кишки, признаки распространённого фибринозного перитонита, множественные перфорации толстой кишки с наличием её содержимого в брюшной полости.

У животных третьей группы после устранения у них явлений обтурации путём снятия кисетного шва отмечено постепенное восстановление общего состояния: через 1-1,5 сут. от-

мечено уменьшение живота в размерах, животные имели обильный стул, зарегистрировано восстановление физической и пищевой активности. В этой группе зарегистрирована гибель одной крысы (на 5-е сутки), при вскрытии которой отмечены явления неразрешившегося распространённого перитонита.

Таким образом, наиболее оптимальным сроком принятия решения при разработанном варианте моделирования непроходимости толстой кишки (в том числе, и для выполнения планируемых лечебных мероприятий) являются 4-е сутки после наложения обтурирующего устройства на прямую кишку. Именно в этом сроке у животных отмечаются все клинкоморфологические признаки тяжёлой непроходимости кишечника с признаками развивающегося (развившегося) абдоминального сепсиса. Данное положение подтвердили морфологические исследования внутренних органов животных I группы, выведенных из эксперимента через 4 суток после моделирования патологического процесса.

При этом печень всех животных была резко увеличена в размерах (мускатной окраски), а в брюшной полости содержался серозный, серозно-геморрагический или серозно-фибринозный экссудат. По результатам патогистологического исследования органов во внутренних органах крыс выявлены следующие изменения. В кишечнике определялась выраженная воспалительная инфильтрация в собственном слое слизистой, представленная преимущественно мононуклеарными (с примесью сегментоядерных нейтрофилов) лейкоцитами (рисунок 3).

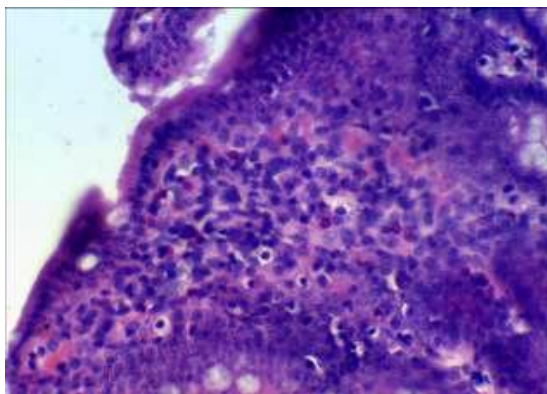


Рисунок 3 – Полиморфноядерноклеточная инфильтрация собственного слоя слизистой толстой кишки лабораторного животного на 4-е сутки после моделирования толстокишечной непроходимости. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 200$.

В печени при гистологическом исследовании отмечены выраженные дистрофические

изменения со стороны гепатоцитов, с десквамацией, некробиотическими изменениями слизистой протоковой системы и воспалительной инфильтрацией паренхимы, что соответствует острому гепатиту (рисунок 4).

В почках определили выраженное полнокровие мозгового вещества, дистрофию, некроз эпителия канальцев (рисунок 5).

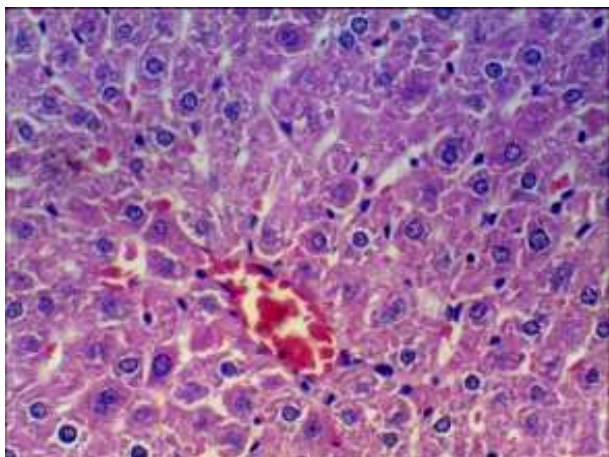


Рисунок 4 – Дистрофические изменения и некроз гепатоцитов лабораторного животного на 4-е сутки после моделирования толстокишечной непроходимости. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

Животным второй группы на 4-е сутки снимали кисетные швы. Из второй группы одна крыса погибла на 5-е сутки и одна крыса погибла на 7-е сутки от острой толстокишечной непроходимости, являющейся причиной развития сепсиса и перитонита.

За время эксперимента было исследовано 150 биопроб из брюшной полости, тонкой, толстой кишки и воротной вены крыс, у 90% которых визуальными зарегистрированы признаки распространённого перитонита. Определение видового состава микрофлоры проводили по общепринятым бактериологическим методикам.

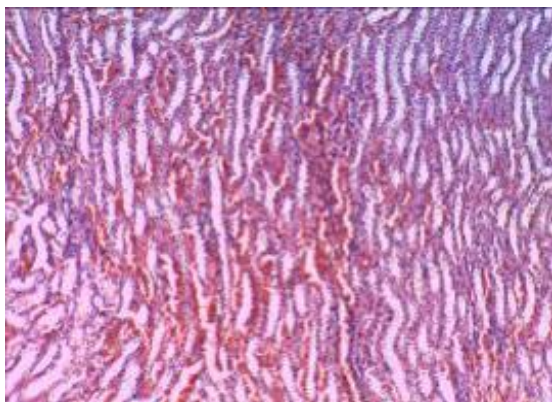


Рисунок 5 - Полнокровие мозгового вещества лабораторного животного на 4-е сутки после моделирования толстокишечной непроходимости. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

При микроскопии в посевах из брюшной полости обнаружены грамположительные кокки (диаметр 0,5-1,5 мкм), располагающиеся небольшими гроздьевидными скоплениями. Некоторые располагались в цитоплазме лейкоцитов. Часть микроорганизмов имела капсулу (*S. aureus*), а часть - нет (*S. epidermidis*). При микроскопии экссудата брюшной полости идентифицированы грамположительные стрептококки, которые в мазках из гноя располагались в форме длинных или коротких цепочек (*S. pyogenes*). Также обнаружены полиморфные грамотрицательные палочки с закругленными концами (длиной 1-3, шириной 0,3-0,6 мкм), располагающиеся одиночно и реже попарно, спор не образующие, подвижных и неподвижных сероваров (некоторые выделенные микроорганизмы образовывали капсулу). Мазки из экссудата и полых органов также содержали мелкие грамотрицательные палочки длиной 1,0-3,0 мкм, шириной 0,4-0,6 мкм, не образующие капсул и спор (*Proteus spp.*). При микроскопии мазков из исходного патологического материала, окрашенных по Граму и метиленовой синью по Лёффлеру, обнаруживали короткие с закругленными концами овоидные палочки-биполяры (отмечалось преимущественное окрашивание бактерий по полюсам) и мелкие грамотрицательные коккобактерии размером от 0,3 до 5,0 мкм, шириной от 0,15 до 1,2 мкм. Идентичные микроорганизмы (в значительно большей концентрации) выявлены в просвете кишечника и получены при посевах из воротной вены, подтверждая феномен бактериальной транслокации при развитии абдоминального сепсиса. Из всех указанных зон выделены патогенные микроорганизмы из рода *Staphylococcus* - золотистый (*S. aureus*) и эпидермальный (*S. epidermidis*), *S. pyogenes*, *Proteus spp*, *Pseudomonas spp*. Последние были чувствительны к амикацину, зивоксу, левофлоксацину, ванкомицину, гентамицину, тивомеру, цефотаксиму и цефтриаксону. *E. coli* была чувствительна к амикацину, зивоксу и левофлоксацину. Выделенная во всех посевах из воротной вены *E. coli* была чувствительна к амикацину, зивоксу и левофлоксацину.

На четвертые сутки у подопытных крыс на фоне острой толстокишечной непроходимости выявлены следующие достоверные изменения со стороны «белой крови»: отмечено увеличение числа лейкоцитов периферической крови с $4,52 \times 10^9/\text{л} \pm 1,01 \times 10^9/\text{л}$ до $17,9 \times 10^9/\text{л} \pm 0,926 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$), со сдвигом «влево» со стороны палочкоядерных лейкоцитов - с $0,32 \times 10^9/\text{л} \pm 0,07 \times 10^9/\text{л}$ до $2,2 \times 10^9/\text{л} \pm 1,28 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$).

Таким образом, в результате проведенного эксперимента создана оригинальная модель острой обтурационной толстокишечной непроходимости у лабораторных животных без

вскрытия брюшной полости, с высокой воспроизводимостью на мелких лабораторных животных. Созданная модель максимально приближена к условиям, с которыми сталкиваются клиницисты, оказывающие помощь больным с острой обтурационной толстокишечной непроходимостью раковой этиологии. При этом создаются условия максимального воспроизведения не только непроходимости кишечника, но и моделирования тяжёлого абдоминального сепсиса с признаками бактериальной кишечной транслокации, перитонита, бактериемии. Способ относительно прост для выполнения, гуманен, исключает подготовительные манипуляции и предварительные хирургические вмешательства, достоверно воспроизводим на мелких лабораторных животных. Кроме того, малоинвазивные манипуляции по снятию компрессирующего устройства и восстановлению проходимости прямой кишки позволяют моделировать используемые в клинических условиях эндоскопические способы реканализации опухолевого сужения с малоинвазивными внутрикишечными манипуляциями и применением лазерных, ультразвуковых, плазменных систем и электрорезекционной техники.

Выводы

1. Для экспериментальной и клинической хирургии предлагается простая модель низкой обтурационной толстокишечной непроходимости, создаваемая без вскрытия брюшной полости с высокой степенью воспроизводимости патологического процесса.
2. Созданная модель максимально приближена к реальным условиям, с которыми сталкиваются клиницисты, оказывающие помощь больным с низкой обтурационной толстокишечной непроходимостью раковой этиологии. Она позволяет максимально воспроизвести не только непроходимость кишечника, но и моделировать тяжёлый абдоминальный сепсис с признаками бактериальной кишечной транслокации, перитонита и бактериемии.
3. Способ относительно прост для выполнения, гуманен, исключает подготовительные манипуляции и предварительные хирургические вмешательства, достоверно воспроизводим на мелких лабораторных животных.
4. Малоинвазивные манипуляции по снятию компрессирующего устройства и восстановлению проходимости прямой кишки позволяют моделировать используемые в клинических условиях эндоскопические способы реканализации опухолевого сужения с малоинвазивными внутрикишечными манипуляциями и применением лазерных, ультразвуковых, плазменных систем и электрорезекционной техники.

Литература

1. Аксель, Е. М. Колоректальный рак (заболеваемость, смертность, социально-экономический ущерб) / Е. М. Аксель, Н. М. Барулина // Рос. онкологический журнал. 1999. № 6. С. 40–46.
2. Бетшарт-Вольфенсбергер, Р. Ветеринарная анестезиология: учебное пособие / Р. Бетшарт-Вольфенсбергер, А. А. Стекольников, А. Ю. Нечаев. СПб.: СпецЛит, 2010. 270 с.
3. Колоректальный рак. Выбор хирургического лечения при толстокишечной непроходимости / М. Д. Ханевич [и др.]. СПб.: Аграф+, 2008. 136 с.
4. Кохнюк, В. Т. Колоректальный рак / В. Т. Кохнюк. Минск: Харвест, 2005. 384 с.
5. Мустафина, А. Р. Морфофункциональное состояние ободочной кишки и толстокишечных анастомозов при обтурационной кишечной непроходимости и её коррекции (анатомио-экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.02 / А. Р. Мустафина. Алматы: Казахск. нац. мед. ун-т им. С. Д. Асфендиярова, 2010. 289 с.
6. Сурлевич, И. Е. Выбор метода хирургического лечения при острой толстокишечной непроходимости: дис. ... канд. мед. наук: 14.00.27 / И. Е. Сурлевич. Бишкек: Рос. Слав. ун-т им. Б.Н. Ельцина на базе науч. Центра реконструкт.-восстан. хирургии МЗ КР, 2008. 160 с.
7. Уголев, А. М. Энтеринная (кишечная гормональная) система / А. М. Уголев. Л.: Наука, 1978. С. 315.
8. Боровиков, В. П. STATISTICA – Статистический анализ и обработка данных в среде WINDOWS / В. П. Боровиков, И. П. Боровиков. М., 1998. 592 с.
9. Adenocarcinoma of the colon and rectum / В. Т. Motwani [et al.] // In «Cancer Medicine»; eds. J. F. Holland [et al.]. 1997. P. 2029–2072.
10. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual / S. B. Edge [et al.]. 7th ed. New York: Springer, 2010. 143 p.
11. Cancer of the rectum – palliative endoscopic treatment / K. D. Rupp [et al.] // Eur. J. Surg. Oncol. 1995. Vol. 21. P. 644–647.
12. Dunlop, M. Colorectal cancer / M. Dunlop // Br. Med. J. 1997. Vol. 314. P. 1882–1885.
13. Follow-up in colorectal cancer patients: a cost-benefit analysis / R. A. Audisio [et al.] // Ann. Surg. Oncol. 1996. № 3. P. 349.
14. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: clinical features and survival / Т. Myrhyo [et al.] // Progr. Colorect. Cane. 1998. Vol. 2. P. 1–12.
15. Related Prospective evaluation of laparoscopic surgery for rectosigmoidal and rectal

carcinoma / S. Yamamoto [et al.] // Dis. Colon Rectum. 2002. Vol. 45. № 12. P. 1648–1654.

16. *Risk* factors for morbidity and mortality after colectomy for colon cancer / W. E. Longo [et al.] // Dis. Colon. Rectum. 2000. Vol. 43. P. 83–91.