УДК 616.348-007.61

МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ ГИРШПРУНГА

Кивва А.Н., Чепурной Г.И., Панченко С.Н.

ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», Ростов-на-Дону, Россия (344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29), e-mail: okt@rostgmu.ru

Для создания модели болезни Гиршпрунга у крысы рассекают наружный футляр толстой кишки, удаляют на необходимом протяжении серозно-мышечную оболочку вместе с ауэрбаховским нервным сплетением, а на подслизистую основу обнаженного участка наносят 5%-ный раствор нитрата серебра (повреждая мейснеровское нервное сплетение) и на внутренний футляр кишечной стенки накладывают, фиксируя, полихлорвиниловую трубку. Создание аганглионарного, неперистальтирующего, ригидного, но жизнеспособного участка кишки путем повреждения ауэрбаховского и мейснеровского нервных сплетений дает право считать разработанную модель патогенетически обоснованной и пригодной для дальнейшего изучения патогенеза болезни Гиршпрунга, а также позволяет использовать результаты экспериментов, выполненных с применением этой модели в клинической практике. Кроме того, предложенный способ прост, легко воспроизводим и позволяет осуществить моделирование любой анатомической формы болезни Гиршпрунга.

Ключевые слова: болезнь Гиршпрунга, моделирование, крысы.

A MODEL OF THE HIRSCHSPRUNG'S DISEASE

Kivva A.N., Chepurnoy G.I., Panchenko S.N.

Ministry of Health and Social Development of Russia [1] Rostov State Medical University (Russia, Rostov-on-Don 344022, Nakhichevansky St.29).Email: okt@rostgmu.ru

To initiate the Hirschsprung's disease, the outer compartment of the large intestine in rats was incised to remove, along the required length, the seromuscular tunic together with the Auerbach's plexus, and 5% solution of silver nitrate was applied on the submucous layer of the exposed area (damaging the Meissner's plexus). A PVC tube was imposed and fixed on the inner compartment of the intestinal wall. Formation of an aganglionic, non-peristaltic, rigid, but viable section of the intestine by damaging of the Auerbach's and the Meissner's plexuses allows us to regard this model as pathogenetically valid and suitable for further study of the Hirschsprung's disease, and to apply the results of the experiments carried out using this model to the clinical practice. Besides, the proposed technique is simple, easily reproducible, and makes it possible to simulate any anatomic form of the Hirschsprung's disease.

Keywords: Hirschsprung's disease, simulation, rats.

Введение

В основе болезни Гиршпрунга лежит наличие неперистальтирующего участка толстой кишки, обусловленное отсутствием или дефицитом интрамуральных ганглиев в кишечной стенке этого участка [2]. Неперистальтирующая часть кишки при болезни Гиршпрунга служит препятствием для нормального пассажа кишечного содержимого, что приводит к усиленной перистальтике супрастенотических отделов и гипертрофии, а в последующем и атрофии мышечных волокон с замещением их соединительной тканью [4]. Несмотря на длительный период изучения, в патогенезе болезни Гиршпрунга сохраняется множество вопросов, не получивших должного разрешения [5], а результаты лечения этой патологии из-за значительного числа послеоперационных осложнений удовлетворяют не в полной мере [3; 6; 7]. Для более полного изучения патогенеза болезни Гиршпрунга,

позволившего улучшить результаты лечения, за счет применения патогенетически обоснованных методов коррекции, необходимо выполнение экспериментальных исследований, в том числе с использованием модели этого заболевания.

Цель исследования

С целью создания простой, воспроизводимой и приближенной к клинико-анатомической природе заболевания модели нами разработан способ моделирования болезни Гиршпрунга, защищенный патентом РФ на изобретение № 2144699.

Материал и методы исследования

Для более полного изучения отдельных звеньев патогенеза болезни Гиршпрунга нами проведены экспериментальные исследования на 117 крысах с использованием предложенного способа. Контрольную группу составили 30 крыс. Животные исследовались с 7 по 28 сутки после моделирования болезни Гиршпрунга. Экспериментальный материал оценивался макроскопически, гистологически (окрашивание срезов гематоксилином – эозином и по ван Гизону), а также выполнялось определение концентрации молекул средней массы. Достоверность различий данных, полученных при исследовании биохимических показателей, после обнаружения различий выборок с помощью непараметрического критерия Крускала-Уоллиса определяли, используя для множественного сравнения непараметрический критерий Данна.

При выполнении экспериментальных исследований мы придерживались «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенными исследованиями по патентной и научно-медицинской литературе выявлен способ моделирования болезни Гиршпрунга [1].

Данный способ осуществляется путем пересечения толстой кишки в нисходящем ее сегменте и вшивания между проксимальным и дистальным отрезками пересеченной кишки сосудистого протеза длиной 35 мм и шириной 15 мм.

Однако рассматриваемый метод имеет ряд существенных недостатков. Прежде всего, он не отвечает клинико-анатомическим признакам болезни Гиршпрунга. При этом способе с помощью сосудистого протеза формируется искусственный участок пищеварительной трубки, структура которого совершенно не соответствует послойному строению кишечной стенки. В частности, данный участок не покрыт изнутри слизистой оболочкой, что является существенным недостатком способа, так как это не отвечает физиологии кишки как в норме,

так и при болезни Гиршпрунга, и в силу этого обстоятельства не обеспечивает соответствия клинического течения болезни Гиршпрунга и клиники модели. Прочное герметичное сшивание сосудистого протеза с кишечной стенкой технически сложно и, кроме того, влечет за собой развитие несостоятельности анастомоза, так как соединяются разнородные ткани, что приводит часто к гибели животного. Из-за этого данный способ трудновоспроизводим.

Обязательное, по мнению авторов, обрабатывание зоны анастомоза клеем КЛ-3 и укрытие сальником усложняет выполнение моделирования, вызывает развитие спаечного процесса в брюшной полости и не соответствует клиническому течению болезни Гиршпрунга.

К недостаткам способа можно отнести и то, что размеры протеза строго обусловлены. Так, авторы вынуждены всегда использовать протез длиной 35 мм, так как при длине протеза меньше 35 мм возникают трудности сшивания протеза с кишкой, возникают условия негерметичности швов и несостоятельности анастомоза, что ведет к гибели животного. Применение протеза длиной больше 35 мм вызовет затруднение прохождения химуса по протезированному участку. А использование протеза такой ограниченной длины не позволяет моделировать сегментарную, субтотальную, тотальную формы болезни Гиршпрунга, а также форму с суперкоротким неперистальтирующим сегментом. Кроме того, всегда применяется сосудистый протез диаметром 15 мм, так как это, по мнению авторов, соответствует диаметру левых отделов толстой кишки собаки. Использование протеза другого диаметра сопряжено с техническими трудностями при сшивании протеза с кишкой. Однако не у всех собак диаметр левых отделов толстой кишки одинаков и равняется именно 15 мм. Следовательно, использовать эту методику можно только у тех животных, у которых просвет дистальных отделов толстой кишки равен 15 мм, а подбор собак с таким строго определенным диаметром толстой кишки создает дополнительные трудности при воспроизведении модели. Проведение эксперимента на собаках в настоящее время дорого, также дорого до- и послеоперационное содержание собак. В то же время выполнение оперативных вмешательств на крысах технически проще, а материальное обеспечение эксперимента обходится несравненно дешевле. Поэтому целесообразно использовать для моделирования не собак, а других более дешевых животных, в частности крыс, что значительно удешевляет и упрощает выполнение моделирования.

Вышеизложенное обусловило необходимость разработать простой, воспроизводимый, и самое главное, более приближенный к клиническому течению патологического процесса новый способ моделирования болезни Гиршпрунга.

Предложенный нами способ моделирования болезни Гиршпрунга осуществляется следующим образом. Крысе под эфирным наркозом выполняется нижняя срединная

лапаротомия. Находят конечный отдел толстой кишки. Рассекают наружный футляр по всей окружности на участке дистального отдела толстой кишки и на необходимом протяжении (в зависимости от моделируемой формы заболевания) удаляют серозную и мышечную оболочки на этом участке. При иссечении серозно-мышечной оболочки удаляется ауэрбаховское нервное сплетение и повреждается мейснеровское. Затем на оставшийся внутренний футляр наносят 5%-ный раствор нитрата серебра для более полного повреждения мейснеровского сплетения, накладывают и закрепляют полихлорвиниловую трубку, создавая тем самым ригидный неперистальтирующий аганглионарный, но жизнеспособный участок кишки. Рана брюшной полости послойно ушивается.

Наблюдающиеся после создания модели у экспериментальных животных изменения соответствуют клинической симптоматике болезни Гиршпрунга. Уже с 7 суток после моделирования у крыс на фоне хронического прогрессирующего запора увеличиваются размеры живота и отмечается уменьшение выраженности подкожно-жировой клетчатки. При проведении биохимических исследований определяется значительный прирост по сравнению с показателями контрольной группы содержания в крови молекул средней массы, что свидетельствует о наличии эндогенной интоксикации. При анализе спектрограммы плазмы отмечается увеличение высоты кривой, указывающее на возрастание количества метаболитов в плазме. Обращает на себя внимание некоторый подъем значений экстинции в начальном отделе спектра, что свидетельствует об увеличении содержания в крови веществ катаболического происхождения. В связи с этим закономерно повышается до 17% величина катаболического пула. Концентрация молекул средней массы в плазме = $11,29 \pm 0,28$ у.е., что статистически значимо ($p < 0,01$) на 36,68% превышает нормальное значение. Выявленные изменения дают право утверждать об имеющейся эндотоксемии на 7 сутки после моделирования болезни Гиршпрунга.

На вскрытии выявляется застой кишечного содержимого и расширение участка толстой кишки, расположенного выше ригидной зоны. Особенно сильно расширена кишка в области, расположенной сразу над ригидной зоной. Ниже этой зоны кишечник пустой, хотя и проходим.

Следовательно, проведенные наблюдения свидетельствуют о воспроизводимости болезни Гиршпрунга в эксперименте при использовании разработанной методики.

Предложенный способ позволяет достаточно продолжительное время использовать модель для изучения заболевания. Так, при наблюдении за животными в течение 28 суток после моделирования болезни Гиршпрунга отмечалось появление хронического запора и увеличение окружности живота у крыс. Проведенное исследование позволило установить у животных с моделью болезни Гиршпрунга на 28 сутки эксперимента высокую степень

эндогенной интоксикации. Концентрация молекул средней массы в плазме равна 20,8±0,5 у.е., что существенно превышает значения нормы ($p<0,01$). Спектрограмма плазмы крови у крыс в этот срок эксперимента приобрела вид нисходящей кривой с величиной стояния максимума 0,426 у.е. при длине волны 238 нм. Величина катаболического пула равна 47%. Выявленное смещение пика кривой и высокое содержание молекул средней массы в начальном отделе спектра свидетельствует о значительном поступлении в кровь продуктов микробной жизнедеятельности, веществ катаболического происхождения. Обнаруженные изменения указывают на значительный уровень эндогенной интоксикации, обусловленной высокой концентрацией в крови молекул средней массы, и прежде всего веществ катаболического происхождения, ксенобиотиков, токсических компонентов полостных сред, продуктов распада тканей и микробной жизнедеятельности.

При вскрытии животных на 28 сутки визуализировалась слабая выраженность подкожно-жировой клетчатки. При осмотре брюшной полости выявлено, что большая часть толстой кишки выше ригидного участка заполнена кишечным содержимым и расширена. Особенно выраженное расширение наблюдалось в области, расположенной сразу над ригидной зоной. Ниже этой зоны кишечник пустой, но просвет сохранен. При гистологическом исследовании в области ригидного участка имеется типично устроенная слизистая оболочка. В подслизистой оболочке выявляется соединительная ткань с наличием фуксинофильных коллагеновых волокон. Подслизистое и межмышечное сплетения здесь же не определяются. В расширенной части толстой кишки слизистая оболочка характеризуется более глубокими криптами. Мышечная пластинка слизистой несколько утолщена. Мышечная оболочка расширенной части толстой кишки утолщена, гладкомышечные клетки гипертрофированы, однако некоторые из них имеют светлые ядра с маргинально расположенным хроматином, отдельные миоциты отличаются резко выраженной эозинофилией, что свидетельствует об их гибели. Наружный слой мышечной оболочки дает более выраженное окрашивание по ван Гизону, что является показателем продолжающегося склерозирования мышечной ткани. Эта гистологическая картина свидетельствует о компенсаторной гипертрофии мышечной ткани и наступлении атрофического процесса в мышечном слое расширенного участка толстой кишки. Выявленные изменения вызваны недостаточной интрамуральной иннервацией и сходны с патологическими нарушениями, регистрируемыми при болезни Гиршпрунга у людей. Следовательно, и на 28 сутки эксперимента имеются все характерные признаки моделируемого заболевания.

Выполненные исследования подтвердили, что новый способ моделирования технически прост, воспроизводим и позволяет осуществлять моделирование любой анатомической формы болезни Гиршпрунга. По сравнению с прототипом способ обладает

следующими преимуществами.

1. Внутренний футляр кишечной трубки сохраняется, что физиологично и более соответствует клинико-анатомическим признакам болезни Гиршпрунга.

2. Возможно моделирование любой анатомической формы болезни Гиршпрунга.

3. Предложенный способ моделирования проще, так как проводится на крысах, не требует выполнения технически сложных оперативных приемов, не сопровождается сшиванием разнородных тканей, и нет необходимости подыскивать животных со строго определенным диаметром кишки.

4. Способ легко воспроизводим из-за его простоты и отсутствия послеоперационных осложнений. При моделировании по сравниваемому способу существует реальная опасность развития перитонита, так как кишка пересекается и сшиваются разнородные ткани (кишка с сосудистым протезом), что может приводить к несостоятельности анастомоза. Такое осложнение обычно приводит к гибели животного, вследствие чего моделирование болезни Гиршпрунга по сравниваемому способу не всегда осуществимо. Предложенный способ лишен этих недостатков: просвет кишки не вскрывается, наложение анастомоза не требуется. Поэтому воспроизводимость разработанного способа выше, чем у прототипа.

5. Предложенный способ требует меньших материальных затрат, так как позволяет использовать более дешевых в содержании животных и не предусматривает использования таких дефицитных материалов, как клей КЛ-3 в прототипе.

Заключение

Таким образом, принимая во внимание то обстоятельство, что в основе болезни Гиршпрунга лежит наличие аганглионарного неперистальтирующего участка толстой кишки, мы моделировали болезнь Гиршпрунга, создавая неперистальтирующий ригидный участок кишки путем повреждения ауэрбаховского и мейснеровского нервных сплетений. Это дает право считать разработанную модель патогенетически обоснованной и пригодной для дальнейшего изучения патогенеза болезни Гиршпрунга, а также позволяет использовать результаты экспериментов, выполненных с применением этой модели в клинической практике. Кроме того, предложенный способ прост, легко воспроизводим и позволяет осуществить моделирование любой анатомической формы болезни Гиршпрунга.

Список литературы

1. А.с. 1509980 СССР. Способ моделирования болезни Гиршпрунга / Яремчук А.Я. [и др.] // Бюллетень. – 1989. – № 35.

2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. – М. : Триада-Х, 1998. – 484 с.
3. Быков Н.И., Чепурной Г.И., Кивва А.Н. Результаты хирургического лечения болезни Гиршпрунга у детей // Детская хирургия. – 2007. – № 5. – С. 10-12.
4. Лёнюшкин А.И. Хирургическая колопроктология детского возраста. – М. : Медицина, 1999. – 365 с.
5. Чубовский А.И. Обоснование к применению однорядного шва колоректального анастомоза у детей : автореф. дис. … канд. мед. наук. – Ростов н/Д, 2006. – 18 с.
6. Menezes M., Corbally M., Puri P. Long-term results of bowel function after treatment for Hirschsprung's disease: a 29-year review // Pediatr. Surg. Int. – 2006. – Vol. 22. – № 12. – P. 987-990.
7. Schweizer P., Berger S., Schweizer M. et al. Repeated pull-through surgery for complicated Hirschsprung's disease-principles derived from clinical experience // J. Pediatr. Surg. – 2007. – Vol. 42. – № 3. – P. 536-543.

Рецензенты

Бабич И.И., д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней № 4 ФПК и ППС по курсу детской хирургии ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», г. Ростов-на-Дону.

Татьянченко В.К., д.м.н., профессор кафедры хирургических болезней № 4 с курсами детской хирургии; колопроктологии и эндоскопической хирургии; оперативной хирургии, клинической анатомии; патологической анатомии и судебно-медицинской экспертизы; сердечно-сосудистой хирургии; торакальной хирургии; по курсу оперативной хирургии и клинической анатомии ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», г. Ростов-на-Дону.