

<http://doi.org/10.17223/1814147/75/06>
УДК 616.34-002.44-021.6-092.9:57.084.1

НОВЫЙ СПОСОБ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДУОДЕНАЛЬНЫХ ЯЗВ У МЕЛКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.А. Полуэктов¹, В.Н. Никитин¹, Т.П. Храмых¹, В.П. Ефанов¹,
Е.А. Заблоцкая², В.М. Ситникова¹

¹ ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России,
Российская Федерация, 644043, г. Омск, ул. Ленина, д. 12

² БУЗОО «Клиническая медико-санитарная часть №9»,
Российская Федерация, 644018, г. Омск, ул. 5-я Кордная, д. 73

Экспериментальное моделирование дуоденальных язв не утратило своей актуальности.

Цель исследования: разработка и экспериментальная апробация нового способа моделирования язвы двенадцатиперстной кишки у мелких лабораторных животных.

Материал и методы. В эксперименте было задействовано 30 белых беспородных крыс-самцов. Моделирование язвы выполнялось инвазивным путем и включало: срединную мини-лапаротомию, инъекцию 70%-го раствора уксусной кислоты в подслизистый слой стенки дуоденума, ушивание лапаротомной раны. Инъекцию производили через пасть животного при помощи разработанного устройства для интраорганных внутрипросветных инъекций.

Результаты. Для получения язвы площадью 0,57 см² через 3 сут необходимо ввести 0,02 мл раствора уксусной кислоты, при введении 0,04 мл этого раствора возникает тотальный некроз стенки кишки.

Заключение. Разработанный способ моделирования дуоденальных язв обеспечивает новый подход к доставке повреждающего фактора в подслизистый слой стенки двенадцатиперстной кишки и является воспроизводимым.

Ключевые слова: дуоденальная язва, экспериментальное моделирование, уксусная кислота, крысы.

Конфликт интересов: авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Прозрачность финансовой деятельности: никто из авторов не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Для цитирования: Полуэктов В.А., Никитин В.Н., Храмых Т.П., Ефанов В.П., Заблоцкая Е.А., Ситникова В.М. Новый способ экспериментального моделирования дуоденальных язв у мелких лабораторных животных. *Вопросы реконструктивной и пластической хирургии*. 2020;23(4):51–57.
doi 10.17223/1814147/75/06

NEW METHOD OF EXPERIMENTAL MODELING OF DUODENAL ULCERS IN SMALL LABORATORY ANIMALS

V.L. Poluektov¹, V.N. Nikitin¹, T.P. Khramykh¹, V.P. Efanov¹,
E.A. Zablotskaya², V.M. Sitnikova¹

¹ Omsk State Medical University,
12, Lenin st., Omsk, 644043, Russian Federation

² City Clinical Hospital №9,
73, 5-ya Kordnaya st., Omsk, 644018, Russian Federation

The experimental modeling of duodenal ulcers has not lost its relevance.

The purpose of the study: experimental testing of a new method for modeling duodenal ulcer in small laboratory animals.

Material and methods. The experiment involved 30 rats. Modeling of the duodenal ulcer was performed by the methodology-invasive manner and included: median mini-laparotomy, the injection of 70% acetic acid into the submucosal layer of the duodenum wall, suturing laparotomic wound. The injection was made through the animal's mouth with the help of the developed device for intra-organ intraluminal injections.

The results. To obtain an ulcer with an area of 0.57 cm² after 3 days, it is necessary to enter 0.02 ml of an acid solution, with the introduction of 0.04 ml, total necrosis of the intestinal wall occurs.

Conclusion: the developed method of modeling duodenal ulcers provides a new approach to the delivery of the damaging factor to the submucosal layer of the duodenal wall and is reproducible.

Keywords: *duodenal ulcer, experimental modeling, acetic acid, rats.*

Conflict of interest: the authors are declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this paper.

Financial disclosure: no author has a financial or property interest in any material or method metioned.

For citation: Poluektov V.L., Nikitin V.N., Khramykh T.P., Efanov V.P., Zablotskaya E.A., Sitnikova V.M. New method of experimental modeling of duodenal ulcers in small laboratory animals. *Issues of Reconstructive and Plastic Surgery*. 2020;23(4):51–57. doi 10.17223/1814147/75/06

ВВЕДЕНИЕ

Многофакторная этиология пептических язв [1], а также кровотечения и перфорации, возникающие у значительной части пациентов [2, 3], диктуют необходимость фундаментальных, в том числе и экспериментальных, исследований с целью выявления механизмов формирования язв, коррекции лечебной программы и профилактики язвенной болезни и ее осложнений. Одним из подтверждений актуальности данной проблемы служит большое количество используемых в эксперименте моделей язв [4–7].

В настоящее время в экспериментальной хирургии наиболее востребован способ моделирования язвы двенадцатиперстной кишки (ДПК), предложенный S. Okabe и K. Amagase [8], однако он не лишен некоторых недостатков. Это создает предпосылки для поиска новых технических решений моделирования дуоденальных язв у лабораторных животных в условиях экспериментальной операционной.

Цель исследования: разработка и экспериментальная апробация нового способа моделирования язвы двенадцатиперстной кишки у мелких лабораторных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в условиях операционного блока кафедры топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава России (ОмГМУ, г. Омск). В эксперимент были включены 30 белых беспло-

дных крыс-самцов. Возраст животных составил 4 мес, масса тела 200–230 г. Работа проводилась с соблюдением морально-этических принципов в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований, и межгосударственным ГОСТ 33216-2014 [9]. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ОмГМУ (протокол №107 от 02.10.2018).

Моделирование язвы ДПК (патент на изобретение № 2689865 от 29.05.2019) производилось инвазивным путем и включало: срединную минилапаротомную рану длиной 1,5–2,0 см; выведение желудка и ДПК в рану; инъекцию повреждающего агента (70%-й раствор уксусной кислоты) в подслизистый слой стенки ДПК; ушивание лапаротомной раны. Операцию выполняли под эфирным наркозом. После минилапаротомии и выведения органов в операционную рану, через пасть, пищевод и желудок экспериментального животного в ДПК вводили тубус устройства для интраорганных внутрипросветных инъекций (далее УДИВИ) (рис. 1).

УДИВИ (рис. 2) представлено двумя различными по диаметру и длине полихлорвиниловыми трубками с радиусом изгиба около 140 мм (патент РФ №182779 от 31.08.2018). Наружная трубка (тубус) имеет внутренний диаметр 1,5 мм, наружный – 2,5 мм, длина ее меньше внутренней (инъектора) на 20 мм. Тубус предназначен для защиты слизистой оболочки органов, через которые проводится УДИВИ, от повреждения кислотой, а также служит проводником для инъектора, непосредственно доставляющего повреждающий фактор в заданный участок

стенки ДПК. Инъектор УДИВИ имеет наружный диаметр 1,5–0,25 мм и внутренний диаметр 1,0 мм, торец его оснащен фиксированной стандартной укороченной инсулиновой иглой, имеющей скос 45° и выступающей за просвет внутренней трубки на 4 мм (рис. 2, а). Проксимальная часть инъектора оснащена фиксированной стан-

дартной иглой для внутримышечных инъекций (рис. 2, б) и ограничителем хода (полихлорвиниловая прямоугольная пластина с прорезью в виде сужающегося конуса). Фиксация ограничителя хода на одной из насечек в проксимальной части инъектора позволяет ограничивать глубину введения повреждающего агента.

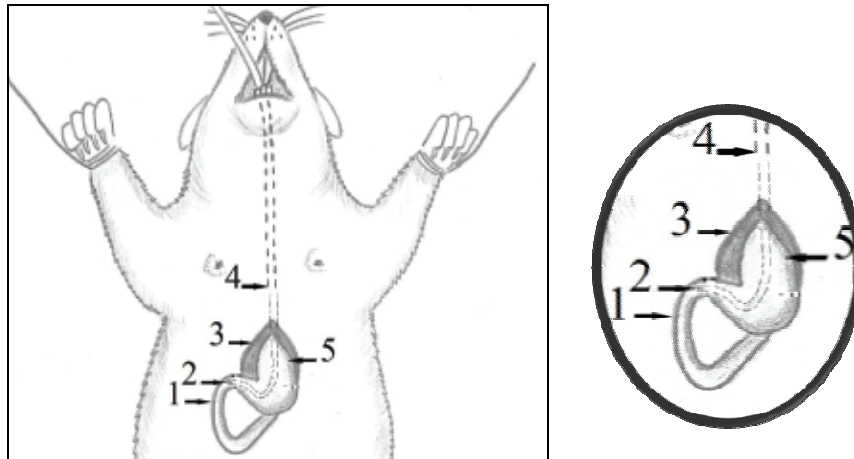
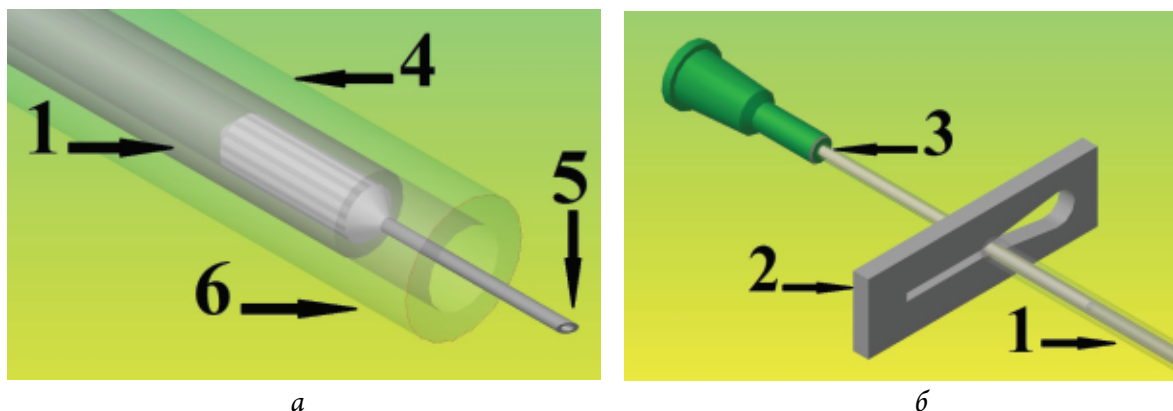


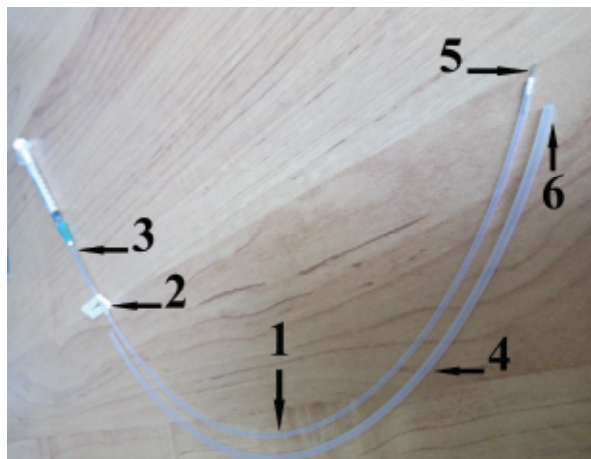
Рис. 1. Схема введения устройства для интраорганных внутрипросветных инъекций (УДИВИ) под контролем мини-лапаротомной раны: 1 – двенадцатиперстная кишка; 2 – торцевая часть УДИВИ, определяемая визуальным контролем; 3 – минилапаротомная рана; 4 – тубус (футляр) УДИВИ, проведенный через пасть крысы в ДПК; 5 – желудок

Fig. 1. Scheme of introduction of the device for intraorgan intraluminal injections (DIII) under the control of a mini-laparotomic wound: 1 – duodenum; 2 – end part of DIII, determined by visual control; 3 – mini-laparotomic wound; 4 – DIII tube (case) passed through the rat's mouth in the duodenum; 5 – stomach



а

б



в

Рис. 2. Устройство для интраорганных внутрипросветных инъекций (а, б - схемы, в - фото): 1 – инъектор; 2 – ограничитель хода; 3 – стандартная игла для внутримышечных инъекций; 4 – тубус; 5 – стандартная укороченная инсулиновая игла; 6 – торец тубуса

Fig. 2. Device for intraorgan intraluminal injections (а, б – diagrams, в – photo): where 1 – injector; 2 – travel stop; 3 – standard needle for intramuscular injection; 4 – tube; 5 – standard shortened insulin needle; 6 – end of the tube

Дистальный конец тубуса УДИВИ упирался со стороны слизистой в заданный участок стенки ДПК, контроль локализации торца тубуса осуществлялся со стороны минилапаротомной раны (рис. 3).

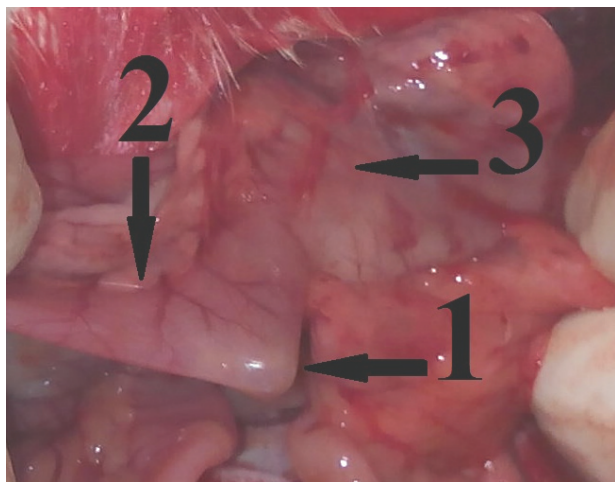


Рис. 3. Визуальный и тактильный контроль локализации торца тубуса (интраоперационное фото): 1 – торец тубуса УДИВИ; 2 – двенадцатиперстная кишка; 3 – желудок

Fig. 3. Visual and tactile control of localization of the end of the tube (intraoperative photo): 1 – end of the tube DPK; 2 – duodenum; 3 – stomach

Затем в просвет тубуса вводили инъектор, заполненный раствором 70%-й уксусной кислоты, ограничитель хода устанавливали на 0,5 мм, что обеспечивало введение заданного объема раствора в подслизистый слой передней стенки ДПК. Визуальный и тактильный контроль целостности серозной оболочки ДПК осуществлялся из минилапаротомной раны. Животные были разделены на четыре группы в зависимости от объема вводимого раствора: крысам первой группы вводили 0,01 мл, второй – 0,02 мл, третьей – 0,03 мл, четвертой группы – 0,04 мл. После введения раствора уксусной кислоты УДИВИ удаляли из просвета желудочно-кишечного тракта. Минилапаротомную рану послойно ушивали наглухо.

Послеоперационное наблюдение за каждым животным, находившимся в отдельной клетке, происходило в течение 6 ч. Крысы получали воду в неограниченном количестве, затем переводились в клетку с типовым рационом питания. Выведение животных из эксперимента с целью контроля за течением процесса заживления язвенного дефекта стенки ДПК осуществляли на 3-и, 5-е и 7-е сут после операции. Эвтаназию проводили путем передозировки диэтилового эфира, после чего производили релапаротомию с визуальной оценкой целостности и состояния стенки ДПК в зоне введения раствора уксусной кислоты, а также выражен-

ности спаечного процесса в брюшной полости. Выделяли и резецировали исследуемый орган. Проводили вскрытие просвета ДПК для оценки состояния слизистой оболочки, определения размеров язв. Затем производили иссечение макропрепарата язвы для морфологического исследования (рис. 4).

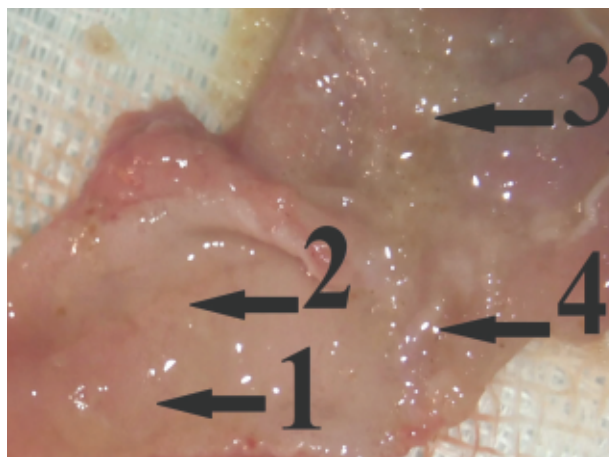


Рис. 4. Макропрепарат стенки ДПК с язвенным дефектом: 1 – рубцующийся язвенный дефект стенки ДПК через 7 сут после инъекции; 2 – фрагмент неизменной стенки ДПК; 3 – фрагмент неизменной стенки желудка; 4 – фрагмент пилорического отдела желудка

Fig. 4. Macrodrug of the duodenal wall with ulcerative defect: 1 – scarring ulcerative defect of the duodenal wall 7 days after injection; 2 – a fragment of the unchanged duodenal wall; 3 – a fragment of the unchanged stomach wall; 4 – a fragment of the pyloric stomach

Морфологическое исследование препаратов проводилось на базе патологоанатомического отделения БУЗОО «МСЧ №9» (г. Омск) с окрашиванием срезов гематоксилином и эозином. Микроскопическое исследование и фотопротоколирование выявленных изменений производилось с помощью микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия) с увеличением $\times 20$, оснащенного цифровой камерой Canon EOS 550D (Япония). При микроскопии оценивали тканевой и клеточный состав в зоне язвенного дефекта, динамику заживления.

Площадь язвенного дефекта (S , см^2) высчитывали при помощи формулы площади эллипса ($S = \pi ab$; где $\pi = 3,14$; a – величина большой полуоси, равная половине длины язвенного кратера; b – величина малой полуоси, равная половине ширины язвенного кратера).

Обработку полученных результатов проводили при использовании методов описательной статистики с помощью компьютерной программы Statistica 6.0. Поскольку количественные признаки не подчинялись нормальному распределению, для представления данных использовали непараметрический метод Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Зависимость размеров экспериментально полученных язв ДПК от объема введенного в подслизистый слой 70%-го раствора уксусной кислоты в различные сроки послеоперационного периода представлена в таблице.

Зависимость площади язвы ДПК от объема введенного 70%-го раствора уксусной кислоты и времени от момента введения, $Me [Q_1; Q_3]$

Dependence of the area of duodenal ulcer on the volume of injected 70% solution of acetic acid and time from the moment of administration, $Me [Q_1; Q_3]$

Время от момента введения раствора	Объем уксусной кислоты, мл		
	0,03 ($n = 3$)	0,02 ($n = 3$)	0,01 ($n = 3$)
3-и сут	$S = 0,75$ [0,63; 0,88]	$S = 0,57$ [0,47; 0,66]	$S = 0,31$ [0,28; 0,31]
5-е сут	$S = 0,66$ [0,55; 0,85]	$S = 0,39$ [0,31; 0,47]	$S = 0,24$ [0,19; 0,25]
7-е сут	$S = 0,38$ [0,31; 0,55]	$S = 0,25$ [0,19; 0,31]	$S = 0,13$ [0,09; 0,14]

Примечание. n – количество случаев, S – площадь язвенного дефекта, $см^2$.

В трех случаях при введении в подслизистый слой стенки ДПК 0,04 мл раствора 70%-й уксусной кислоты наблюдался тотальный некроз всех слоев с присоединением флегмоны кишки. Жи-

вотные погибли на 2-е сут от распространенного перитонита на фоне перфорации некротизированной стенки ДПК.

Морфологическая картина полученных язвенных дефектов через 3 сут после введения 70%-го раствора уксусной кислоты в подслизистый слой стенки ДПК (рис. 5, а) была представлена выраженным отеком подслизистой оболочки, наличием эозинофильных лейкоцитов и кровоизлияний. В области дна язвы наблюдались пропитывание разрушенных тканей массами фибрина, лейкоцитарная экссудация и диапедезные кровоизлияния.

Через 5 сут после операции (рис. 5, б) были выявлены морфологические признаки некроза тканей в дне язвенного дефекта со слабо выраженной лейкоцитарной экссудацией, дном являлась разрушенная мышечная оболочка. В подслизистой оболочке в области дна язвы определялась формирующаяся грануляционная ткань. На поверхности на зону дефекта с одной стороны напозала слизистая оболочка с минимальными изменениями.

В препаратах, полученных через 7 сут от начала эксперимента (рис. 5, в) определялись морфологические признаки гиперплазии покровно-язвенного эпителия регенераторного типа над зоной разрастания зрелой грануляционной ткани. В подслизистой оболочке сохранялся отек тканей, расширение и полнокровие сосудов, умеренно выраженная полиморфно-клеточная инфильтрация с наличием эозинофильных лейкоцитов.

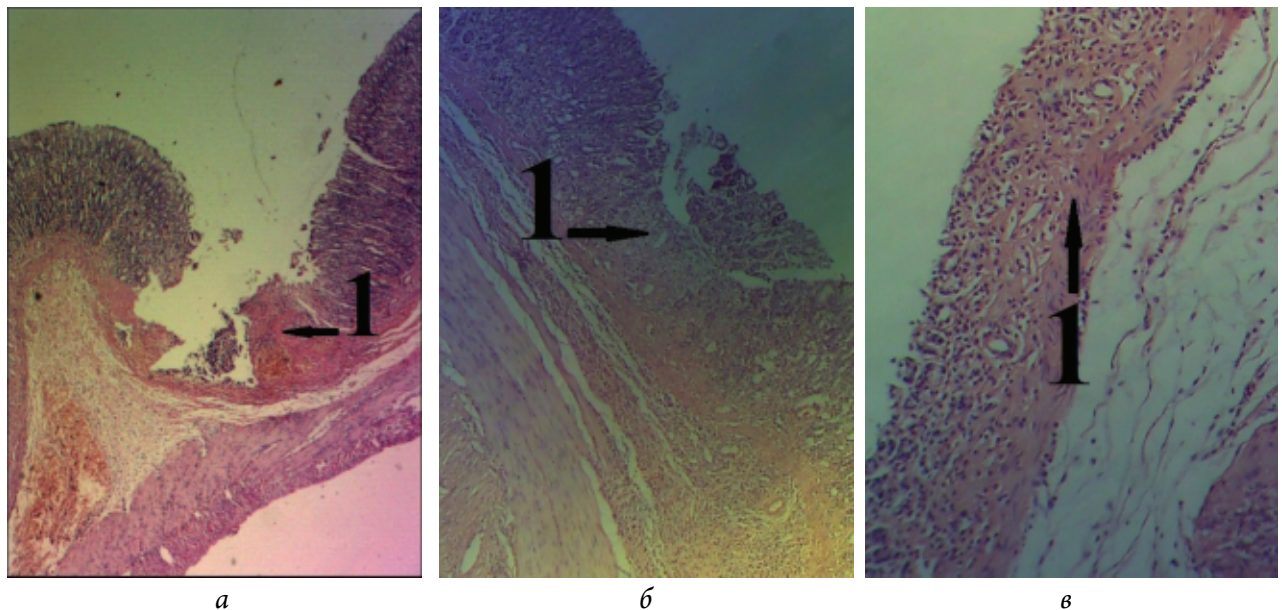


Рис. 5. Микропрепараты язвы ДПК крысы: 1 – язвенно-деструктивное поражение стенки ДПК (а – 3-и сут, б – 5-е сут, в – 7-е сут). Окрашивание гематоксилином и эозином. Ув. $\times 20$

Fig. 5. Microdrugs of rat duodenal ulcer: 1 – ulcerative-destructive lesion of the duodenum wall (а – 3rd day, б – 5th day, в – 7th day). Staining with hematoxylin and eosin. Increase $\times 20$

ОБСУЖДЕНИЕ

Ведущим патогенетическим звеном, запускающим каскад патологических реакций возникновения язвы ДПК у человека, является пептический фактор. Моделирование пептических язв, где процесс начинается с кислотного повреждения участка слизистой оболочки, определило направление нашего экспериментального исследования. Известен и наиболее часто применяется в различных модификациях [8] способ моделирования язвы ДПК, предложенный S. Okabe, включающий лапаротомию, нанесение 100%-й уксусной кислоты на серозную оболочку стенки ДПК с последующей экспозицией 30 с. Согласно данной модели, через 3 сут в зоне, обработанной уксусной кислотой, должен сформироваться язвенный дефект с вовлечением всех слоев стенки пораженного органа. Однако способ S. Okabe имеет некоторые недостатки: повреждение начинается со стороны серозной оболочки ДПК, далее за счет вовлечения в воспаление сосудистого русла возникают трофические нарушения в зоне поражения, при этом дефект слизистой оболочки формируется в последнюю очередь, что не соответствует процессу возникновения пептической язвы у человека, где серозная оболочка стенки кишки вовлекается последней.

Предлагаемый способ моделирования язвы ДПК у экспериментальных животных, в отличие от классических способов, имеет следующие преимущества: 1) инъекция заданного объема

раствора кислоты в стенку ДПК производится при помощи УДИВИ со стороны просвета органа, за счет этого язвенный дефект возникает в первые часы эксперимента; 2) осуществление инъекции возможно в строго заданную зону под минилапаротомным контролем и строго заданного объема за счет применения ограничителя хода УДИВИ, что позволяет моделировать язву запрограммированной локализации и величины.

Результаты проведенного исследования выявили пороговую дозу вводимого раствора уксусной кислоты (0,04 мл), превышение которой влечет за собой тотальный некроз стенки кишки с последующей перфорацией и гибелью животного, а также взаимосвязь между размерами моделируемой язвы ДПК, объемом вводимой кислоты и сроками заживления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Устройство для интраорганных внутрипросветных инъекций обеспечивает новый подход к доставке повреждающего фактора в подслизистый слой стенки органа-мишени, что позволяет моделировать язвы желудочно-кишечного тракта у мелких лабораторных животных, наиболее приближенные к пептическим язвам у человека.

Предложенный способ моделирования дуоденальных язв является воспроизводимым и может быть рекомендован к применению в экспериментальной хирургии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Malferttheiner P., Chan F.K., McColl K.E. Peptic ulcer disease. *Lancet*. 2009;374(9699):1449-1461. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60938-7
2. Мугатасимов И.Г., Баранов А.И., Серебренников В.В., Фаев А.А., Алексеев А.М., Дроздов С.С., Чернявский С.С. Малоинвазивная хирургия перфоративных дуоденальных язв (обзор литературы). *Хирургическая практика*. Профиль-2С (Москва). 2013;4:4-10 [Mugatasimov I.G., Baranov A.I., Serebrennikov V.V., Faev A.A., Alekseev A.M., Drozdov S.S., Chernyavskiy S.S. Maloinvazivnaya hirurgiya perforativnyh duodenal'nyh yazv (obzor literatury) [Minimally invasive surgery of perforated duodenal ulcers (literature review)]. *Hirurgicheskaya praktika – Surgical Practice*. Profile-2C (Moscow), 2013. № 4. P. 4-10] (In Russ.).
3. Алекберзаде А.В., Крылов Н.Н., Рустамов Э.А., Бадалов Д.А., Поповцев М.А. Ушивание перфоративной пептической язвы: лапароскопическое или открытое? *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова*. 2017; 2:45-50. doi: 10.17116/hirurgia2017245-50 [Alekberzade A.V., Krylov N.N., Rustamov E.A., Badalov D.A., Popovtsev M.A. Ushivaniye perforativnoy pepticheskoy yazvy: laparoskopicheskoye ili otkrytoye? [Perforated peptic ulcer closure: laparoscopic or open?]. *Khirurgiya. Zhurnal imeni N.I. Pirogova – N.I. Pirogov Russian Journal of Surgery*. 2017;2:P. 45-50. (in Russ.).] doi: 10.17116/hirurgia2017245-50
4. Brzozowski T. Experimental production of peptic ulcer, gastric damage and cancer models and their use in pathophysiological studies and pharmacological treatment – polish achievements. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2003;54, Suppl. 3:99-126. (http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/12_03_s3/articles/07_article.html)
5. Bahadır E., Özbeyli D., Mardinoğlu G. et al. Regular swimming before the induction of ulcer ameliorates oxidative gastric damage in rats: The anxiolytic effect of exercise. *Marmara Medical Journal*. 2016;29:135-144. DOI: 10.5472/MMJoa.2903.01
6. de Oliveira Cabral C., Campos A., da Silva L.M. et al. Gastroprotective potential of methanolic extract and dimethyl cardamomin from *Campomanesia reitziana* fruits in mice. *Archumacol Naunyn-Schmiedeberg's Archo*. 2017;390(6):661-666. (<https://doi.org/10.1007/s00210-017-1369-0>)

7. Okabe S., Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models-the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull.* 2005;Aug;28(8):1321-1341. (<https://www.pubfacts.com/detail/16079471>)
8. ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами. Введ. 2016.07.01. М.: СтандартИнформ, 2016. 15 с. (<http://docs.cntd.ru/document/1200127506>) [GOST 33216-2014. Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits. Enter. 2016.07.01. Moscow: StandartInform, 2016. 15 p. (<http://docs.cntd.ru/document/1200127506>) (in Russ.)]

Поступила в редакцию 28.04.2020, утверждена к печати 01.12.2020
Received 28.04.2020, accepted for publication 01.12.2020

Сведения об авторах:

Полуэктов Владимир Леонидович – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой факультетской хирургии, урологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (г. Омск).

Никитин Вячеслав Николаевич* – канд. мед. наук, доцент кафедры факультетской хирургии, урологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (г. Омск).

Тел.: 8-913-970-2195, 8 (381-2) 35-91-30

e-mail: nikitin-1966@inbox.ru

Храмых Татьяна Петровна – д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой топографической анатомии и оперативной хирургии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (г. Омск).

Ефанов Владимир Петрович – ординатор кафедры факультетской хирургии, урологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (г. Омск).

Заблоцкая Елена Александровна, врач-патологоанатом, БУЗОО МСЧ №9 (г. Омск).

Ситникова Валентина Михайловна – канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской хирургии, урологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России (г. Омск).

Information about authors:

Vladimir L. Poluektov, Dr. Med. sci., Professor, head of the Department of Surgery, Urology, Omsk State Medical University, Omsk, Russia.

Vyacheslav N. Nikitin*, Cand. Med. sci., associate Professor, the Department of Surgery, Urology, Omsk State Medical University, Omsk, Russia.

Tel.: +7-913-970-2195, +7 (381-2) 35-91-30

e-mail: nikitin-1966@inbox.ru

Tatyana P. Khramykh, Dr. Med. sci., Professor, head of the Department of Topographic Anatomy, Operative Surgery, Omsk State Medical University, Omsk, Russia.

Vladimir P. Efanov, resident, the Department of Surgery, Urology, Omsk State Medical University, Omsk, Russia.

Elena A. Zablotskaya, pathologist, City Clinical Hospital №9, Omsk, Russia.

Valentina M. Sitnikova, Cand. Med. sci., assistant, the Department of Surgery, Urology, Omsk State Medical University, Omsk, Russia.