

А.П. Кошель, В.А. Алексеев, С.С. Клоков, М.В. Завьялова, Е.А. Рыжова, С.А. Сиухина

СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ АХАЛАЗИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

A.P. Koshel, V.A. Alekseev, S.S. Klokov, M.V. Zavyalova, Ye.A. Ryzhova, S.A. Siukhina

METHOD OF MODELING ACHALASIA IN THE EXPERIMENT

ОГАУЗ «Медицинский центр им. Г.К. Жерлова», г. Северск
ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск

Представлен способ моделирования ахалазии кардии у крыс в эксперименте. Животным вводили раствор бензалкония хлорида 0,02% в область кардиального сфинктера объемом 0,2–0,3 мл в 4 точки: на 3, 6, 9 и 12 часах инсулиновым шприцом. Результаты оценивали макро- и микроскопически. Предлагаемый способ позволяет получить морфологический субстрат пригодный для исследований этиологии, патогенеза и методов лечения данной патологии.

Ключевые слова: пищевод, ахалазия, моделирование патологии, бензалкония хлорид.

Experimental method of esophageal achalasia modeling is described in the article. The solution of 0,02% benzalkonium chloride in the volume of 0,2–0,3 ml at 4 points: 3, 6, 9 and 12 hours using insulin syringe was introduced in cardiac sphincter of rats. The results obtained were evaluated in macro and microscopic way. The proposed method allows to receive a morphologic substrate suitable for studying etiology, pathogenesis and treatment methods of this pathology.

Key words: esophagus, achalasia, modeling of pathology, benzalkonium chloride.

УДК 616.333-007.272-021.6-092.9

ВВЕДЕНИЕ

Ахалазия кардии – нервно-мышечное заболевание пищевода, проявляющееся стойким нарушением рефлекторного открытия кардии при глотании, изменением перистальтики и ослаблением тонуса пищеводной стенки, и, соответственно, затруднением прохождения пищевых масс в желудок [1]. Заболевание встречается в любом возрасте, почти одинаково часто у мужчин и женщин, при этом хирургическое лечение выполняется только у 10–15% пациентов [5–8].

Выбор способа лечения ахалазии пищевода вызывает широкую дискуссию в литературе, что обусловлено, в первую очередь, отсутствием патогенетической терапии. Современное лечение данного заболевания направлено главным образом на устранение функционального барьера в виде нерасслабившегося нижнего пищеводного сфинктера и может осуществляться медикаментозно (с помощью лекарственных средств), эндоскопически (дилататоры, стенты и пр.), а также хирургическим путём (от пластики кардии до пластики пищевода).

Описанное в литературе большое количество способов коррекции при ахалазии свидетельствует лишь о том, что предлагаемые методики либо малоэффективны и не могут предотвратить рецидив заболевания, либо имеют опасные осложнения, ставящие под угрозу качество жизни больного и его жизнь. Всё вышеизложенное делает поиски новых методов диагностики и лечения ахалазии кардии по-прежнему открытой и актуальной проблемой.

Для поиска наиболее эффективного способа лечения ахалазии кардии необходима максимально достоверная экспериментальная модель патологии, сходная по своим морфологическим и клиническим признакам с исходным заболеванием. Однако в связи с трудностями создания «искусственной» ахалазии кардии описано мало способов моделирования данного заболевания. В доступной нам литературе мы встретили лишь несколько способов моделирования ахалазии [2–4]. Большинство из них имеют ряд недостатков. Так, например, при механическом воздействии на кардиоэзофагеальный переход формируется патологическое сужение зоны кардии

[6, 9], но при использовании данного метода не формируется морфологический субстрат ахалазии, а именно нет повреждения нервных ганглиев области кардии. Кроме того, для большинства экспериментальных работ используются собаки, что обуславливает высокую стоимость работы, связанную с их длительным содержанием в специально оборудованных клетках и виварии. Наконец, оперативные вмешательства для создания модели относительно сложны и длительны, что увеличивает операционный риск и повышает количество летальных исходов у экспериментальных животных.

Singaram C. et al. [10] описали способ денервации кардиального сфинктера путём воздействия на нервные ганглии ауэрбахова сплетения раствором бензалкония хлорида. Febrônio L.H. et al. [11] вводили раствор бензалкония хлорида в дистальный отдел пищевода опоссумам, в обоих случаях авторы получили повреждение нервных ганглиев пищевода животных и, как следствие, нарушение раскрытия кардиального сфинктера с супрастенотическим расширением пищевода. А.Г. Сабиров и соавт. [3] предложили прямое воздействие на область кардиоэзофагеального перехода методом аппликации марлевой турунды, смоченной в растворе 0,2% бензалкония хлорида. Авторам удалось доказать, что в стенке пищевода и нижнего пищеводного сфинктера (НПС) наблюдаются выраженные морфологические и функциональные нарушения: гиперплазия плоского эпителия, снижение количества нервных волокон, разрастание фиброзно-соединительной ткани, повышение сократительной активности НПС и снижение моторики продольного мышечного слоя. Наблюдаемые при экспериментальной ахалазии изменения в пищеводе крыс в значительной степени коррелируют с таковыми при ахалазии пищевода у человека, что позволяет использовать данный метод для отработки вариантов лечения ахалазии. Однако, по нашему мнению, данный способ имеет ряд недостатков:

- длительность проведения аппликации (до 30 мин), во время которой необходимо периодически смачивать тампон;
- не исключается вероятность попадания раствора на соседние органы и ткани, что, в свою очередь, может привести к возникновению ряда осложнений.

Таким образом, отсутствие простых и эффективных методов моделирования ахалазии кардии диктует необходимость поиска новых способов ее воспроизведения в эксперименте, что позволит не только получить новые сведения об этиологии и патогенезе этого заболевания, но и будет способствовать разработке новых методов лечения.

Целью данной работы явилась модификация общепринятой методики моделирования ахалазии кардии у крыс, максимально схожей морфологически с изучаемой нозологией, но при этом не требующей дорогостоящего оборудования или длительного и сложного оперативного вмешательства.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для создания экспериментальной модели ахалазии кардии использовали белых крыс линии Вистар массой тела 150–200 г. Анестезиологическое пособие обеспечивали введением анестетика «Золетил 100» и миорелаксанта «Рометар» в дозировке от 0,2 до 0,3 мл в зависимости от размеров и массы животного. После наркотизации животное фиксировали на операционном столе. Верхнесрединным разрезом осуществляли доступ к кардиальному отделу желудка. Гастроэзофагеальный комплекс выводили в операционную рану, отграничивали область интереса салфетками с целью предупреждения попадания нейротоксина на окружающие ткани и инсулиновым шприцом вводили раствор бензалкония хлорида 0,02% объёмом 0,2–0,3 мл внутримышечно в 4 точки: на 3, 6, 9 и 12 часах (рис. 1). Затем салфетки из брюшной полости удаляли, а рану ушивали послойно наглухо. Дозу, кратность и место введения подбирали эмпирически, что позволило снизить гибель животных и сократить время формирования модели. Доза ниже указанной была неэффективной.

Животных выводили из эксперимента на 1-е, 3-е, 15-е, 30-е, 60-е сут после первичного вмешательства путём внутримышечного введения «Золетил 100» в дозе 1,0. После введения анестетиков выполняли релапаротомию, визуально

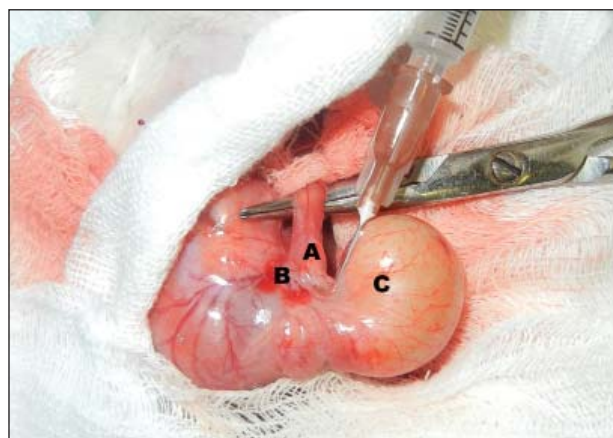


Рис. 1. Способ моделирования ахалазии в эксперименте: зона А – зона инфильтрации кардии раствором нейротоксина; зона В – зона кардии; зона С – желудок

оценивали и фиксировали с помощью фотоаппаратуры состояние верхнего этажа брюшной полости, затем извлекали органокомплекс, включающий в себя желудок с кардиоэзофагеальным переходом и н/3 пищевода.

Оценку полученных в ходе эксперимента результатов проводили на основании морфологического исследования на препаратах, изготовленных по стандартной методике и окрашенных гематоксилином и эозином. Макро- и микроскопические данные сравнивали с гистологической картиной пищеводно-кардиального перехода у двух интактных крыс, которые составили контрольную группу. При этом оценивали ряд признаков:

- состояние выстилающего эпителия, наличие и выраженность лимфоплазмочитарной инфильтрации стромы слизистой оболочки (нет, слабо, умеренно, резко выраженная);
- наличие и выраженность межэпителиальной лимфоидной инфильтрации (нет, слабо, умеренно, резко выраженная);
- количество подслизистых и межмышечных нервных ганглиев (при увеличении $\times 400$ в 10 полях зрения);
- наличие и выраженность дистрофических изменений в клетках нервных ганглиев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В группе контроля видимых изменений со стороны серозной оболочки желудка и адвентиции пищевода в зоне гастро-эзофагеального перехода выявлено не было. При изучении гистологической картины имелась слабо выраженная лимфоплазмочитарная инфильтрация стромы, межэпителиальной лимфоидной инфильтрации не наблюдалось. В подслизистом слое визуализировались 25 нервных ганглиев, в мышечном – 15. Подслизистые и межмышечные нервные ганглии без дистрофических изменений (рис. 2, а, б).

У оперированных крыс макроскопически при заборе материала обращал на себя внимание спайочный процесс в области кардиоэзофагеального перехода с вовлечением окружающих тканей, у одной из крыс в месте инъекции бензалкония хлорида обнаружена гранулёма до 0,5 см диаметром.

На 10-е сут в пищеводно-желудочном переходе выявлены гиперплазия эпителия, акантоз, дисплазия 2-й степени. Лимфоплазмочитарная инфильтрация выражена слабо, признаков межэпителиальной лимфоидной инфильтрации не выявлено. Нервные ганглии в подслизистом слое отсутствовали. В мышечном слое – один нервный ганглий с резко выраженными дистрофическими изменениями клеток (рис. 3 а, б).

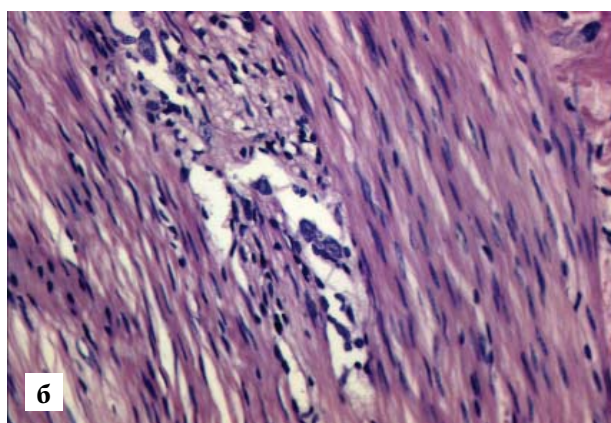
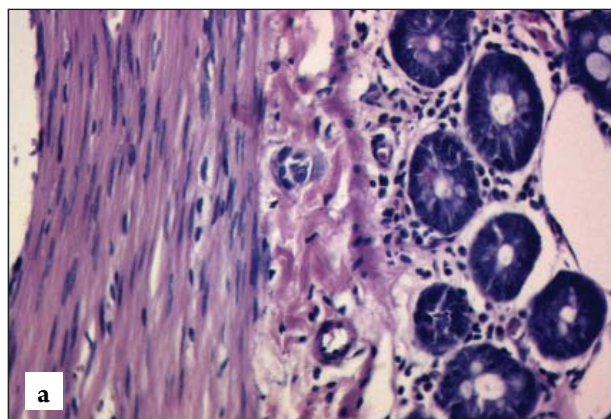


Рис. 2. Кардиоэзофагеальный переход крысы в норме

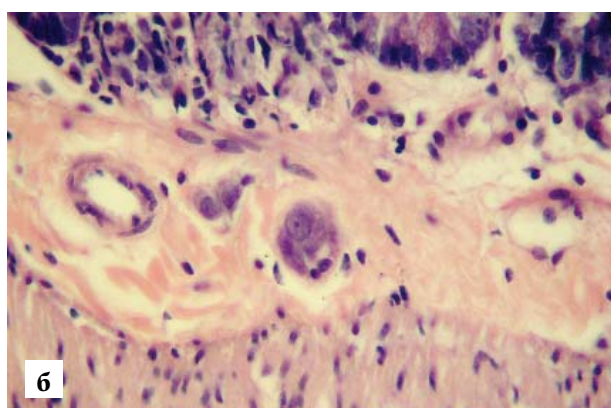
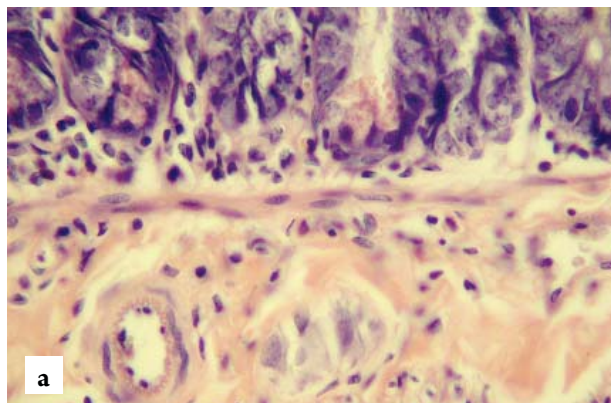


Рис. 3. Кардиоэзофагеальный переход крысы после воздействия (10-е сут)

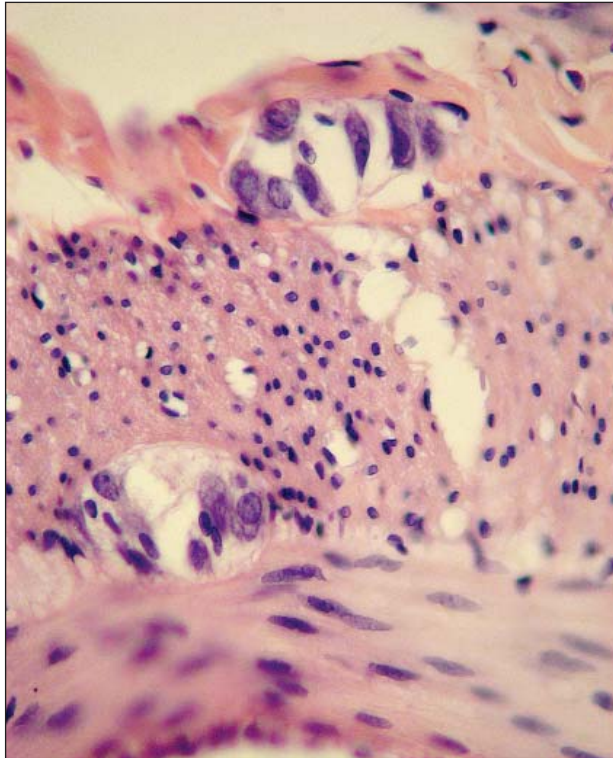


Рис. 4. Кардиоэзофагеальный переход крысы после воздействия (30-е сут)

Начиная с 30-х сут, пищевод был несколько расширен выше места инъекций: $3 \pm 0,47$ мм в сравнении с диаметром до операции ($2,66 \pm 0,38$ мм, $p=0,05$). В области пищевода-желудочного перехода эпителиальный слой без особенностей, слабо выраженная лимфоплазмоцитарная инфильтрация стромы, лимфоидной межэпителиальной инфильтрации не было. Визуализировался один нервный подслизистый ганглий с резко выраженными дистрофическими изменениями. Межмышечных нервных ганглиев не было (рис. 4).

На 60-е сут эпителий без особенностей, слабо выраженная лимфо-плазмоцитарная инфильтрация стромы, межэпителиальной лимфоидной инфильтрации и нервных подслизистых ганглиев не наблюдалось. Имелось два межмышечных нервных ганглия с резко выраженными дистрофическими изменениями (рис. 5 а, б, в).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предлагаемый нами метод моделирования ахалазии кардии обладает следующими преимуществами: техника операции не требует от хирурга специальных навыков, нет необходимости в сложном оборудовании и специальном хирургическом инструментарии. Благодаря интрамуральному введению нейротоксина к минимуму сведена вероятность осложнений, вызванных попаданием реагента на окружающие ткани, количество бензалкония хлорида, необхо-

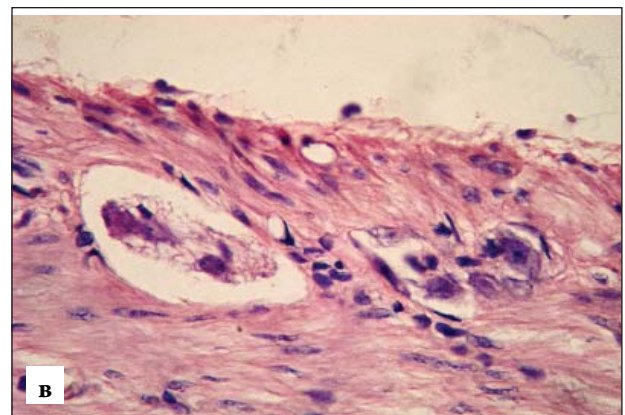
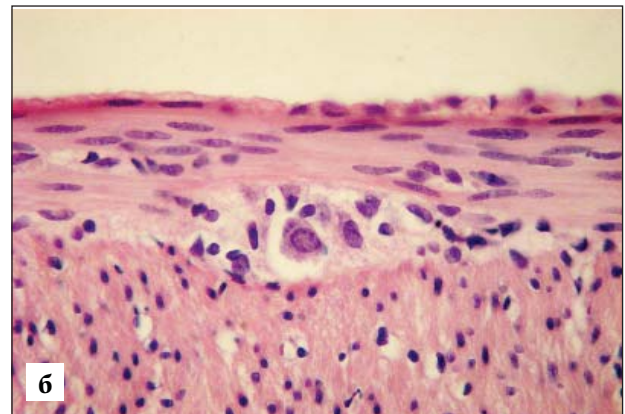
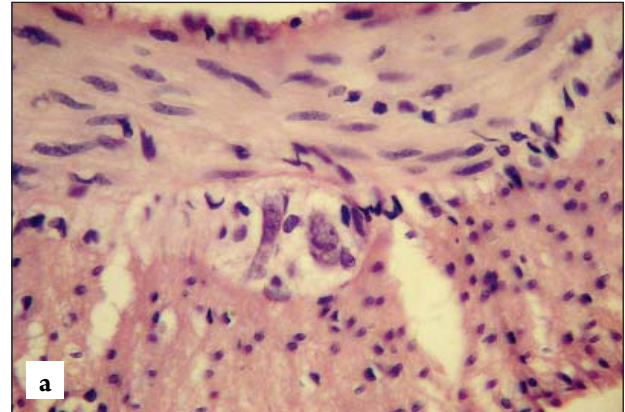


Рис. 5. Кардиоэзофагеальный переход крысы после воздействия (60-е сут)

димого для одной операции, не превышает 1,2 мл. Длительность операции не превышает 15 мин, что позволяет снизить количество анестетика и миорелаксанта, а уменьшение дозы используемых лекарственных средств уменьшает риск летального исхода от передозировки. Кроме того, весьма существенным фактом является снижение сроков создания экспериментальной модели до 30 сут, что значительно меньше по сравнению с ранее описанными способами. Усовершенствованная нами модель ахалазии кардии позволяет получить морфологический субстрат заболевания и является адекватной и перспективной для дальнейшего изучения этиологии, патогенеза и разработки подходов к лечению данной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Блажитко Е.М., Полякевич А.С. Хирургия, ч.2. – Новосибирск: Сибмедицдат НГМА, 2005 г. – 490 с.
2. Сабиров А.Г., Бурмистров М.В., Мухамедьяров М.А. и др. Модификация метода экспериментальной ахалазии у крыс и анализ его эффективности // Казанский медицинский журнал. – 2009. – № 2. – С. 282–284.
3. Сабиров А.Г., Рагинов И.С., Бурмистров М.В., Челышев Ю.А., Хасанов Р.Ш., Морошек А.А., Григорьев П.Н., Зефи-ров А.А., Мухамедьяров М.А. Морфофункциональный анализ экспериментальной модели ахалазии пищевода у крыс // Бюлл. эксперимент. биологии и медицины. – 2010. – № 4. – С. 452–456.
4. Тамулевичуте Д.И., Витенас А.М. Болезни пищевода и кардии. – М.: Медицина, 1986. – 224 с.
5. Черноусов А.Ф., Богопольский П.М., Курбанов Ф.С. Хирургия пищевода: Руководство для врачей. – М.: Медицина, 2000. – 352 с.
6. Шалимов С.А., Радзиховский Л.В., Кейсевич А.П. Руководство по экспериментальной хирургии. – М.: Медицина, 1989. – С. 169–171.
7. Goretcki P.J., Hinder R.A., Libbey J.S., Bammer T., Flosch N. Redio laparoscopic surgery for achalasia. Is it feasible? // Surg. Endosc. – 2002. – Vol. 16. – P. 772–776.
8. Gorodner M.V., Galvani C., Fishella P.M., Patti M.G. Preoperative lower esophageal sphincter pressure has little influence on the outcome of laparoscopic Heller myotomy for achalasia // Surg. Endosc. – 2004 – Vol. 18. – P. 774–778.
9. Sons H.U., Borchard F., Müller-Jäh K. Megaesophagus: induction by a simple animal experiment. Report on the method // Exp Pathol. – 1986. – V.30(4). – P. 193–201.
10. Singaram C., Sweet M.A., Gaumnitz E.A., Bass P., Snipes R.L. Evaluation of early events in the creation of amyenteric opossum model of achalasia // Neurogastroenterol Motil. – 1996. – V.8(4). – P. 351–361.
11. Febrônio LH, Britto-Garcia S, de Oliveira JS, Zucoloto S. Megaeso-phagus in rats // Res Exp Med (Berl). – 1997. – V.197(2). – P. 109–115.

REFERENCES

1. Blagitko Ye.M., Polyakevich A.S. Surgery, part 2. Novosibirsk, Sibmedizdat NGMA Publ., 2005, 490 p. (in Russian).
2. Sabirov A.G., Bourmistrov M.V., Moukhamedyarov M.A. et al. Kazan medical Journal, 2009, №2, p. 282–284 (in Russian).
3. Sabirov A.G., Raginov I.S., Bourmistrov M.V. et. al. Bulletin of experimental biology and medicine, 2010, № 4, p. 452–456. (in Russian).
4. Tamouleuvichuyte D.I., Vitenas A.M. Diseases of esophagus and cardia. Moscow, Meditsina Publ., 1986, 224 p. (in Russian).
5. Chernousov A.F., Bogopol'ski P.M., Kourbanov F.S. Surgery of the esophagus: handbook for the physicians. Moscow, Meditsina Publ., 2000, 352 p. (in Russian).
6. Shalimov S.A., Radzichovski L.V., Keissevich A.P. Handbook on experimental surgery. Moscow, Meditsina Publ., 1989, p. 169–171 (in Russian).
7. Goretcki P.J., Hinder R.A., Libbey J.S., Bammer T., Flosch N. Surg. Endosc., 2002, Vol. 16, p. 772 – 776.
8. Gorodner M.V., Galvani C., Fishella P.M., Patti M.G. Surg. Endosc., 2004, Vol. 18, P. 774 – 778.
9. Sons H.U., Borchard F., Müller-Jäh K. Exper. Pathol., 1986, V.30(4), P. 193–201.
10. Singaram C., Sweet M.A., Gaumnitz E.A., Bass P., Snipes R.L. Neurogastroenterol Motil., 1996, Vol. 8(4), P.351–361.
11. Febrônio LH, Britto-Garcia S, de Oliveira JS, Zucoloto S. Res Exp Med, (Berl), 1997, V.197(2), p. 109–115.

Поступила в редакцию 20.12.2013

Утверждена к печати 10.02.2014

Авторы:

Кошель Андрей Петрович – д-р мед. наук, профессор, главный врач ОГАУЗ «Медицинский центр им. Г.К. Жерлова», г. Северск.

Алексеев Владимир Александрович – аспирант кафедры хирургии ФПК и ППС ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Клоков Сергей Сергеевич – канд. мед. наук, зам. директора ОГАУЗ «Медицинский центр им. Г.К. Жерлова», г. Северск.

Завьялова Марина Викторовна – д-р мед. наук, доцент, зав кафедрой патологической анатомии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Рыжова Екатерина Андреевна – студентка лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Сиухина Светлана Александровна – студентка лечебного факультета ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Контакты:

Алексеев Владимир Александрович

тел.: 8-913-807-54-29, e-mail: alexejev14.sky@yandex.ru