

С.В. ДОРОШКЕВИЧ, Е.Ю. ДОРОШКЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА**УО «Гомельский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Применено локальное криовоздействие для моделирования патологии поджелудочной железы. Исследования проводились на нелинейных белых крысах с соблюдением правил предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов с участием экспериментальных животных разных видов. Применялись гистологические методы исследования поджелудочной железы, начиная с 5 минут до 90 суток после локальной гипотермии. Проведенное морфологическое исследование динамики тканевых изменений, позволило установить стадии патогенеза острого панкреатита в эксперименте. Получена отечно-геморрагическая форма острого панкреатита, сменяющаяся геморрагическим панкреонекрозом и завершающаяся хроническим панкреатитом с явлениями склероза и липоматоза органа. Выделенные стадии экспериментального панкреатита по своему морфологическому выражению аналогичны, описанным в клинике. Предложенная модель позволит решить ряд вопросов этиопатогенеза и апробировать новые лекарственные средства и тактики лечения острого панкреатита.

Ключевые слова: экспериментальная модель, белая крыса, поджелудочная железа, гипотермия, острый панкреатит.

Local cryoinfluence for modeling of the pancreas pathology has been applied. The researches have been performed on the nonlinear white rats with the observance of the rules stipulated by the European commission on supervision of carrying out of laboratory and other experiments with participation of experimental animals of different kinds. Histological methods of research of the pancreas from 5 minutes till 90 days after the local hypothermia have been applied. The conducted morphological research of the changes dynamics in the tissue allowed establishing the stages of pathogenesis of acute pancreatitis in the experiment. The edematous- hemorrhagic form of acute pancreatitis, replaced by hemorrhagic pancreatic necrosis and resulting in chronic pancreatitis with the phenomena of sclerosis and lipomatosis of the body has been received. The stages of the experimental pancreatitis, which have been singled out, according to their morphological expression are similar to those, described in clinic. The proposed model will allow to solve some questions of etiopathogenesis and to approve new medical products and tactics of treatment of acute pancreatitis.

Keywords: experimental model, white rat, pancreas, hypothermia, acute pancreatitis.

Острый панкреатит является одной из наиболее актуальных проблем хирургии. Это обусловлено тем, что количество больных, в том числе с тяжелыми формами этого заболевания, постоянно увеличивается [1, 2, 3, 4].

В связи с создавшейся ситуацией возникает необходимость в экспериментальных исследованиях, позволяющих решить

ряд вопросов этиологии и патогенеза. А также апробировать новые лечебные средства, разработать эффективные тактики лечения. Несмотря на многообразие предложенных экспериментальных моделей, большинство исследователей сходятся во мнении, что в основе острого панкреатита лежит единый процесс активации ферментов непосредственно в ткани поджелудочной железы [5].

С позиции современных представлений о патогенезе панкреатита представляет интерес моделирование с помощью гипотермии.

В механизме действия сверхнизких температур на живые ткани существенную роль играет образование кристаллов льда из воды. При образовании льда объем воды увеличивается примерно на 10%, что ведет к механическому повреждению клеточных мембран.

Разрушение клеточных мембран и структурных компонентов клетки приводит к осмотическим нарушениям, изменению концентрации электролитов и pH. Происходит также денатурация и изменение макромолекул, субклеточных структур и других компонентов клетки. Освобождающиеся при разрушении мембран лизосомальные ферменты обладают токсическим действием. В образовании очага деструкции играет роль прекращения кровообращения в замороженных тканях [6].

Цель исследования: создать экспериментальную модель острого панкреатита на основе повреждающего действия низких температур.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводились на нелинейных белых крысах весом 160–180 граммов. Их питание осуществлялось по обычной диете в условиях вивария. Крысам был обеспечен свободный доступ к пище и воде, их содержали в стандартных условиях с естественной 12-часовой сменой света и темноты. Работу проводили с соблюдением правил, предусмотренных Европейской комиссией по надзору за проведением лабораторных и других опытов, с участием экспериментальных животных разных видов.

Все животные были разделены на три группы: крысы, подвергнутые эксперимен-

тальной локальной гипотермии поджелудочной железы, ложнооперированные и интактные животные. Операции выполнялись с соблюдением правил асептики и антисептики. Под эфирным наркозом производили срединную лапаротомию. В разрез выводили селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой.

Для локальной гипотермии поджелудочной железы использовали криохирургический комплекс КСН 3А/В, применяемый для местного замораживания тканей. Криохирургический инструмент охлаждался путем испарения жидкого азота. Гипотермию железы осуществляли интраоперационно, путем непосредственного соприкосновения криохирургического наконечника собственной конструкции с определенными параметрами его рабочей части, позволяющей осуществить точечные воздействия.

Использовался температурный режим: минус 60°C. Воздействие низких температур осуществлялось в течение 20, 40 и 60 секунд. Выбор времени воздействия обусловлен, с одной стороны, теплопроводностью криохирургического наконечника, а с другой – анатомическими параметрами поджелудочной железы крысы.

При замораживании тканей в поджелудочной железе выявляется три зоны: зона замораживания или крионекроза, зона охлаждения и зона гипотермии. Температура на границе с зоной замораживания минус 20°C, а с зоной гипотермии плюс 5°C. Снижение температуры поджелудочной железы почти до плюс 5°C не оказывает заметного влияния на структуру, отмечено лишь обратимое угнетение экзокринной функции.

Охлажденный участок железы оттаивал в течение 30 секунд, после чего селезеночный сегмент поджелудочной железы вместе с сальником и селезенкой погружали в брюшную полость. Операционную рану

ушивали послойно, наглухо. Сразу после операции животные получали пищу и питье в неограниченном количестве.

Забой животных проводился спустя 5, 30 и 60 минут, через 3, 6, 12 и 24 часа, на 3, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 и 90 сутки после локальной гипотермии поджелудочной железы. Указанные сроки предусмотрены для того, чтобы более детально проследить динамику структурных изменений в поджелудочной железе с самого начала, после первичного экзогенного повреждения органа и запуска аутокаталитических процессов до их логического завершения.

Для гистологических исследований брали поджелудочную железу, фиксировали в 10% нейтральном формалине. После промывки в проточной воде проводили через спирты возрастающей концентрации, заливали в парафин с воском. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5 мкм, которые были окрашены гематоксилин-эозином; пикрофуксином по Ван Гизону и по Вейгерту.

Результаты и обсуждение

Охлажденный сегмент через 5 минут после криовоздействия гиперемирован и отечен. Определяются мелкоточечные субкапсулярные кровоизлияния.

Ацинарные клетки содержат диффузно-базофильную цитоплазму. Определяются группы вакуолизированных ацинарных клеток. Междольковая соединительная ткань отечна, капилляры расширены, полнокровны. В строме имеются эритроцитарные экстравазаты, кровоизлияния произошли в просвет отдельных ацинусов и межацинарное пространство. Степень выраженности снижается к периферии криовоздействия. На 30-ой минуте в зоне холодного воздействия поджелудочная железа отечна, багрово-красного цвета.

При гистологическом исследовании от-

мечается дискомплексация ацинусов. Цитоплазма ацинарных клеток оксифильна, лишена гранул зимогена. Ядра этих клеток гиперхромны. Определяются клетки с диффузно базофильной, бледноокрашенной цитоплазмой. Наблюдается вакуолизированные ацинарные клетки. Определяется внутридольковый и междольковый отек. В строме отмечаются форменные элементы крови в виде свежих неизмененных эритроцитов. Кровоизлияния распространились на обширные территории.

Спустя 60 минут после охлаждения, сохраняется багровая окраска резко набухшей поджелудочной железы. В брюшной полости после воздействия в температурном режиме минус 60°C и экспозиции 40 и 60 секунд определяется скудное количество геморрагической жидкости.

При микроскопическом исследовании в зоне повреждения выявляется резко выраженный отек междольковой и межацинарной соединительной ткани. Определяются кровоизлияния как в строму, так и в железистую ткань. Излившиеся эритроциты скопились в центральном отделе ацинуса и оттеснили ацинарные клетки к базальной мембране. Эритроциты расположены между ацинарными клетками и базальной мембраной, оттесняя ацинарные клетки к краю ацинуса. Отмечается резко выраженная дискомплексация ацинусов. Ацинарные клетки преимущественно с гомогенной эозинофильной цитоплазмой не содержат гранул зимогена. Ядра ацинарных клеток сохранились. Выявляются ядра набухшие, просветленные, пикнотичные и гиперхромные. Наблюдаются явления кариолизиса и кариорексиса. В части ацинусов клеточные границы не контурируются. Они принимают вид гигантской клетки с многочисленными ядрами, локализованными по окружности. Ацинарные клетки отдельных ацинусов лизированы, местами в состоянии зернистого распада.

По периферии зоны криовоздействия

встречаются группы ацинусов с диффузным распределением гранул зимогена. В относительно сохранившихся ацинарных клетках обнаруживаются аутофагосомы, резко выражена вакуолизация и лизис цитоплазмы. В отдельных ацинусах определяется светлая прослойка, отделяющая ацинарную клетку от базальной мембраны, что характерно для периацинарного отека. Вакуолизация цитоплазмы выражена преимущественно в базальном отделе ацинарных клеток.

Спустя 3 часа охлажденный сегмент поджелудочной железы отечен, пропитан кровью. В брюшной полости при экспозиции 20 секунд экссудат не определяется, при более длительном воздействии (40 и 60 секунд) выявляется геморрагическая жидкость.

При микроскопии выявляются некробиотические и некротические изменения в поджелудочной железе. Отдельные дольки приобретают вид гомогенной бледноокрашенной массы со свободно лежащими ядрами, находящимися на разных стадиях повреждения – от пикноза до кариолизиса. Некробиотически измененные ацинарные клетки представляют собой полиморфную гистологическую картину. Отмечаются участки, где цитоплазма ацинарных клеток резко вакуолизирована, местами лизирована полностью или находится в состоянии зернисто-глыбчатого распада.

По периферии зоны криовоздействия в ацинарных клетках отдельных ацинусов выявляется перераспределение гранул зимогена, с локализацией их в базальных отделах цитоплазмы. Эти гранулы мелкие и плохо контурируются. Среди ацинарных клеток, лишенных секреторных гранул, встречаются отдельные, содержащие гранулы зимогена. Обнаруживается очаговая десквамация уплощенных ацинарных клеток в просвет ацинуса. Некоторые ацинусы образованы уплощенными ацинарными клетками с расширенным центрoацинар-

ным просветом, в котором содержится клеточный детрит. В части ацинусов определяются гемолизированные эритроциты. Сосуды зон замораживания и охлаждения полнокровны, кровоизлияния локализовались в междольковой и межацинарной строме. Стенки отдельных мелких артерий и вен находятся в состоянии некроза. Элементы выводных протоков сохраняют свою структуру.

Через 6 часов наблюдается полнокровие брюшины и инъецированность сосудов брыжейки тонкой кишки. В брюшной полости после криовоздействия в течение 40 и 60 секунд обнаруживается геморрагический экссудат. Охлажденный участок поджелудочной железы отечен, багрового цвета.

Гистологически выявляются очаги коагуляционного некроза ацинарных клеток, цитоплазма вакуолизирована. Ядра ацинарных клеток гиперхромны и пикнотичны. Хорошо выражен междольковый и в меньшей степени пери- и межацинарный отек. Определяются очаги кровоизлияния, которые приобретают сливной характер. Эритроцитарные экстравазаты локализуются в строме. В просвете выводных протоков с хорошо сохранившимися стенками выявляется клеточный детрит.

В зоне охлаждения ацинарные клетки находятся в состоянии некробиоза. Выявляется выраженный отек стромы. Капилляры полнокровны. В отдельных сосудах имеются явления эритроцитарного стаза и микротромбоза.

К 12 часам эксперимента в брюшной полости после охлаждения в течение 40 и 60 секунд выявляется геморрагическая жидкость. Брюшина и брыжейка тонкой кишки умеренно отечны. Определяются мелкие, порядка 1 мм, белесые бляшки статонекрозов, рассеянные по брыжейке тонкой кишки. Их количество может быть единично при экспозиции 20 секунд и увеличиваться с возрастанием продолжительно-

сти криовоздействия. Очаг повреждения поджелудочной железы приобретает бурую окраску.

При гистологическом исследовании в центре криовоздействия выявляются некротизированные ацинарные клетки. Они уменьшены в размерах, их протоплазма и ядро окрашиваются диффузно. В зоне охлаждения на фоне кровоизлияний отмечаются группы ацинарных клеток в состоянии некробиоза. Ядра этих клеток сморщены и окрашиваются гематоксилином более интенсивно. Другие ядра, наоборот, плохо контурируются и имеют вид бледных теней из-за потери способности к окраске. По периферии в сохранившихся ацинусах отсутствует просвет, что обусловлено набуханием протоплазмы клеток. Отмечается полнокровие сосудов и отек стромы.

Спустя 24 часа в брюшной полости после экспозиции 40 и 60 секунд определяется наличие серозно-геморрагической жидкости. Выявляется отек серозных оболочек. Наблюдаются бляшки стеатонекрозов диаметром 1–2 мм, только после криовоздействия, в течение 40 и 60 секунд. Зона повреждения поджелудочной железы набухшая, бурого цвета.

При микроскопии в эпицентре криовоздействия клеточные элементы в строме преимущественно не обнаруживаются, встречаются единичные фибробласты. По периферии отмечается значительное число долек, ацинарные клетки которых находятся в состоянии некробиоза. Одновременно выявляются очаги коагуляционного и колликвационного некроза. Сохраняются отдельные мелкие выводные протоки, высланные дистрофичным эпителием. Наблюдается резко выраженный субкапсульный и междольковый отек. По периферии очага замораживания отмечается мелкоточечные кровоизлияния, которые представлены гемолизированными эритроцитами. В зоне охлаждения выявляются ацинусы, состоя-

щие из клеток с резко вакуолизированной цитоплазмой, или в состоянии некробиоза. Отмечается дисконфлексация ацинусов. Местами ацинарные клетки образуют скопления. В цитоплазме отдельных изолированных ацинарных клеток содержатся гранулы зимогена мелких размеров, которые диффузно распространились по всей цитоплазме. Отмечается отек междольковой и межацинарной стромы. Капилляры местами содержат эритроцитарные сладжи и микротромбы.

На 3-и сутки эксперимента при экспозиции 20 секунд патологических изменений со стороны серозных оболочек брюшной полости не обнаружено. Очаг повреждения приобретает серый цвет, отек не определяется. После криовоздействия в течение 40 и 60 секунд выявляется наличие фибринозно-геморрагического выпота. Сохраняется отек серозных оболочек. Обнаруживаются бляшки стеатонекрозов. Зона криовоздействия поджелудочной железы умеренно отечна, серовато-бурого цвета.

Гистологически в зоне повреждения преобладает процесс аутолиза ацинарной ткани. Очаги некробиоза чередуются с участками коагуляционного и колликвационного некроза. Отмечается очаговая сохранность межацинарных прослоек соединительной ткани. Междольковая строма железы находится в состоянии выраженного отека. Определяется инфильтрация палочкоядерными лейкоцитами некротизированной паренхимы железы. Инфильтрация распространяется на участки коагуляционного некроза и некробиоза ацинарной ткани. Демаркационный вал с участками некроза имеет расплывчатые границы. Сосуды крупного калибра полнокровны, в их стенке выявляются очаги фиброидного некроза. Выводные протоки с сохранившимися стенками содержат тканевой детрит.

По периферии зоны охлаждения обнаруживается грануляционная ткань с заклю-

ченными в ней дольками из реконструированных ацинусов, дольки которых разобщены широкими плоскими соединительными тканями. Ацинарные клетки дистрофичны. Гранулы зимогена распространяются диффузно, по всей цитоплазме. Отмечается полнокровие сосудов.

После повреждения на 7-е сутки продолжительностью 40–60 секунд в свободной брюшной полости содержится скудное количество фибринозного выпота. Серозные оболочки отечны. Выявляются единичные бляшки стеатонекрозов. В верхнем этаже брюшной полости сформировался инфильтрат. Поджелудочная железа в зоне повреждения приобретает грязно-серую окраску. При экспозиции 20 секунд изменения выявляются лишь в очаге криовоздействия, который на 7-е сутки имеет серый цвет.

Микроскопически в зоне замораживания среди очагов некроза обнаруживаются лейкоцитарные инфильтраты. Определяются в большом количестве пролиферирующие фибробласты, которые в виде язычков внедряются в зону некроза вслед за палочкоядерными лейкоцитами.

В зоне охлаждения ацинарные клетки полиморфны и характеризуются наличием скудного количества мелких, плохо контурируемых зимогенных гранул. Отмечается пролиферация эпителиальных выводных протоков. Интенсивно выражены ациноостровковые трансформации и панкреатические островки, состоящие из эпителия пролиферирующих мелких выводных протоков. Цитоплазма бета-клеток островков насыщена специфической зернистостью. В строме сохранились очаги дезорганизации соединительной ткани. Стенки отдельных сосудов в состоянии фибриноидного некроза. Выявляется фрагментация и очаговый лизис внутренней эластической мембраны некоторых сосудов.

После повреждения на 14-е сутки на

секции после криовоздействия продолжительностью 20, 40, и 60 секунд в брюшной полости свободной жидкости не содержалось. Отек серозных оболочек отсутствовал. Поврежденный участок поджелудочной железы приобрел вид сероватой массы.

Гистологически в зоне замораживания определяется обильная лейкоцитарная инфильтрация некротических масс. Выявляются как палочкоядерные лейкоциты, так и макрофаги и гигантские клетки инородных тел. Некротизированные ткани приобрели форму островков с четкими границами.

В зоне охлаждения сохранившиеся ацинарные клетки приобретают вытянутую форму и разрастаются в виде тяжелой недифференцированного эпителия. Определяются панкреатические островки различных размеров. В мелких островках цитоплазма бета-клеток насыщена специфическими гранулами, а в крупных наблюдается дегрануляция бета-клеток с обеднением их цитоплазмы специфической зернистостью. В междольковой строме присутствуют очаги мукоидного набухания и фибринозных изменений.

На 21 сутки эксперимента экссудата в брюшной полости не содержалось, отек серозных оболочек отсутствовал. Участок поджелудочной железы, подвергшийся криовоздействию серого цвета, не имеет четких границ.

При микроскопии в зоне замораживания наблюдается увеличение числа макрофагов. Определяется расплавление и элиминация некротических масс. Очаги некроза разделены прослойками соединительной ткани, в которой преобладали клеточные элементы.

В зоне охлаждения ацинусы отличались полиморфизмом, имели округлую, овальную, а иногда и удлинненную форму, многие из них уменьшены в размерах. В значительном числе ацинусов определяются явления дискомплексации. Наблюдаются признаки регенерации экзо- и эндокрин-

ной паренхимы железы. В поле зрения встречаются как реконструированные ацинусы, так и пролиферирующие выводные протоки и разного размера панкреатические островки.

Спустя 30 дней и в последующем в брюшной полости экссудат не обнаруживался. При экспозиции 20 секунд на месте криодействия сформировался рубец звездчатой формы, который определяется до конца исследования. При более продолжительной экспозиции (40 и 60 секунд) поврежденный участок поджелудочной железы имеет вид сероватой массы, которую сохраняет в дальнейшем.

При гистологическом исследовании на 30 сутки в зоне замораживания наблюдаются широкие прослойки соединительной ткани, паренхима поджелудочной железы атрофична. Выявляются разрозненные, локализованные в соединительной ткани регенерационные узлы, состоящие из недифференцированных эпителиальных трубок.

В зоне охлаждения значительное число ацинусов не содержало секрета, клетки их располагались более компактно. Выводные протоки расширены и заполнены гомогенным, интенсивно окрашенным содержимым белковой природы. Островки бета-клеток имели различные размеры. В стенках артерий выявляются очаги плазматического пропитывания и гиалиноза.

На 45 сутки эксперимента при гистологическом исследовании в зоне замораживания обнаруживаются широкие поля соединительной ткани. На ряду с явлениями склероза наблюдаются гиперпластические процессы в протоковой системе. Междольковые выводные протоки окружены широкими соединительнотканными прослойками, их стенки склерозированы, просвет местами кистозно расширен, эпителий уплощен с участками замещения многослойным. В крупных междольковых протоках обнаруживаются участки сосочковых раз-

растаний цилиндрического эпителия, в котором определяются дистрофические изменения, очаговая десквамация и замещение его кубическим эпителием.

В зоне охлаждения отмечается пролиферация соединительной ткани между дольками и отдельными ацинусами. Экзокринная паренхима имеет полиморфную картину. Ацинарные клетки отдельных долек загружены гранулами зимогена, в других ацинусах зимоген содержится в скудном количестве. Обнаруживаются группы ацинусов, где ацинарные клетки были в состоянии некробиоза с вакуолизацией цитоплазмы. В междольковой строме железы наблюдаются одновременно фибропластические и дистрофические процессы. Стенки артерий утолщены, просвет их сужен.

На протяжении с 60 по 90 сутки эксперимента морфологическая картина не претерпела существенных изменений. В зоне замораживания отмечается выраженный фиброз. Среди фиброзной волокнистой ткани наблюдаются кистозно расширенные выводные протоки с уплощенным эпителием. В зоне охлаждения дольки различных размеров окружены соединительной тканью. В ацинусах определяются явления дискомплексации. Наблюдается дистрофия инкреторных клеток. Соединительнотканная капсула островков утолщена. В строме железы выявляются очаговые скопления лимфогистиоцитов. Стенки артерий утолщены и гиалинизированы.

В настоящее время все экспериментальные модели объединяют в несколько групп: каналикулярно-гипертензионные, сосудисто-аллергические, токсико-инфекционные и травматические [5].

Все указанные способы технически достаточно сложны, так как некоторые требуют перевязки экстраорганных сосудов, главного выводного протока железы или точной дозировки повреждающего агента. Приведенные техники моделирования острого

панкреатита возможны только на крупных экспериментальных животных (собаки). Патогенетическая обоснованность обычных способов вызывает сомнения, так как изолированная перевязка главного выводного протока приводит к развитию фиброза органа без явлений острого панкреатита.

Предложенные сосудисто-аллергические модели, основанные на сочетании нескольких повреждающих факторов, также технически сложны и не воспроизводят реальную картину заболевания

Криогенный способ использовался для моделирования патологии поджелудочной железы на собаках [5]. Однако выбранные продолжительность и температурный режим воздействия не могут быть использованы в исследовании на мелких лабораторных животных.

В статье впервые представлены необходимые параметры криовоздействия для моделирования острого панкреатита на белых крысах.

Патоморфологические изменения поджелудочной железы экспериментального животного после локального охлаждения наиболее близки к таковому у человека при остром панкреатите, что выгодно отличает предложенный способ от имеющихся экспериментальных моделей.

Выводы

Предложенный экспериментальный

способ моделирования патологии на основе локального криовоздействия позволяет представить картину развития острого панкреатита и изменений в поджелудочной железе.

На первых этапах развития патологии наблюдается отечно-геморрагическая форма острого панкреатита, сменяемая геморрагической стадией заболевания. По мере прогрессирования процесса наблюдается некротический панкреатит, приводящий в конечном итоге к хроническому панкреатиту с явлениями склероза и липоматоза органа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Савельев, В. С. Острый панкреатит / В. С. Савельев, В. М. Буянов, Ю. В. Огнев. – М.: Медицина, 1983. – С. 31-88.
2. Surgical results for severe acute pancreatitis – comparison of the different surgical procedures / T. L. Hwang [et al.] // Hepatogastroenterology. – 1995. – Vol. 42. – P. 1026-1029.
3. Bradley, E. L. A clinical based classification system of acute pancreatitis / E. L. Bradley // Arch. Surg. – 1993. – Vol. 128. – P. 586-590.
4. Владимирова, В. Г. Острый панкреатит: Экспериментальное клиническое исследование / В. Г. Владимирова, В. И. Сергиенко. – М.: Медицина, 1986. – С. 59-86.
5. Шалимов, С. А. Руководство по экспериментальной хирургии / С. А. Шалимов, А. П. Радзиховский, Л. В. Кейсевич. – М.: Медицина, 1989. – С. 190-205.
6. Альперович, Б. И. Криохирurgia печени и поджелудочной железы / Б. И. Альперович, Л. М. Парамонова, Н. В. Мерзликин. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1985. – С. 17-40.

Поступила 28.01.2008 г.