

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



УДК 616.36—005.1—092.4—089.811—089.163

РОЛЬ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ИШЕМИЧЕСКОЙ ПОДГОТОВКИ В ВОЗНИКНОВЕНИИ ИШЕМИЧЕСКИ—РЕПЕРФУЗИОННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В. В. Бойко, М. Э. Писецкая, А. М. Тищенко, Д. И. Скорый, Т. В. Козлова, Н. И. Горголь, И. В. Волченко
Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины, г. Харьков

THE ROLE OF PRELIMINARY ISCHEMICAL PREPARATION IN OCCURRENCE OF ISCHEMICALLY—REPERFUSIONAL HEPATIC AFFECTION IN EXPERIMENT

V. V. Boyko, M. E. Pisetskaya, A. M. Tishchenko, D. I. Skoriy, T. V. Kozlova, N. I. Gorgobl, I. V. Volchenko

РЕФЕРАТ

В эксперименте изучен оптимальный режим предварительной ишемической подготовки, при котором окклюзия сосудов обуславливает минимальные патологические изменения в печени без угнетения ее регенераторных способностей. В рандомизированном экспериментальном исследовании на 40 кролях моделировали ишемически—реперфузионное повреждение печени путем пережатия гепатодуоденальной связки в различных режимах. Проводили морфологическое исследование фрагментов печени животных, взятых сразу после пережатия связки и на 3-и сутки после операции. Установлено, что степень выраженности и обратимость повреждения ткани печени различались в зависимости от продолжительности ишемии и длительности реперфузии. Режим окклюзии сосудов с предварительной ишемической подготовкой явился наиболее щадящим для ткани печени, без грубых структурных повреждений и функциональных нарушений, что позволило рекомендовать его для клинического применения в качестве оптимального при выполнении резекции печени в сочетании с афферентной васкулярной эксклюзией.

Ключевые слова: резекция печени; васкулярная эксклюзия печени; ишемически—реперфузионный синдром; маневр Прингла; эксперимент.

SUMMARY

The optimal regimen of preliminary ischemic preparation, in which the vessels occlusion causes minimal pathohistological hepatic changes without inhibition of its regeneration capacities, was studied in experiment. The ischemic—reperfusional damage of liver, using hepatoduodenal ligament crossclamping in various regimens, was modeled on 40 rabbits in a randomized experimental investigation. Morphological investigations of the animals liver fragments, taken immediately after ligament crossclamping and on the third postoperative day, were performed. There was established, that severity and reversibility of the hepatic tissue affection have differed, depending on the ischemia duration and reperfusion period. The vessels occlusion regimen with preliminary ischemic preparation was the most safe for hepatic tissue, without rude structural injuries and functional disorders, permitting to recommend it for clinical application as the optimal one while performance of hepatic resection in combination with afferent vascular exclusion.

Key words: hepatic resection; vascular hepatic exclusion; ischemically—reperfusional syndrome; Pringle maneuver; experiment.

Афферентная васкулярная окклюзия — сложный и действенный прием борьбы с интраоперационной кровопотерей при резекции печени [1, 2]. Возникающее при этом ишемически—реперфузионное повреждение паренхимы печени негативно влияет на состояние и функциональные возможности остающейся части органа, что особенно важно при обширной резекции и наличии диффузных заболеваний печени (гепатит, фиброз, цирроз) [1, 3–5]. Учитывая это, некоторые хирурги отказываются от применения окклюзии сосудов печени. Одним из методов уменьшения проявлений ишемически—реперфузионного синдрома (ИРС) является предварительная ишемическая подготовка [6–8].

Целью исследования было определение в эксперименте оптимального режима предварительной ишемической подготовки, при котором окклюзия сосудов обуславливает минимальные патологические изменения в печени без угнетения ее регенераторных способностей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн эксперимента. Экспериментальное исследование включало острые и хронические опыты на 40 кролях породы "белый великан" массой тела 3,5–4,2 кг. Животные рандомизированы на 4 группы (по 10 животных в каждой) в зависимости от режима афферентной окклюзии сосудов. В I группу включены кроли, которым после лапаротомии осуществляли пережатие гепатодуоденальной связки на 30 мин; во II группу — кроли, у которых связку пережимали прерывисто, в режиме 15 мин ишемии/5 мин реперфузии/15 мин ишемии; в III группу — кроли, у которых также применяли прерывистое пережатие гепатодуоденальной связки, но в режиме 5 мин ишемии/5 мин

реперфузии/10 мин ишемии/5 мин реперфузии/15 мин ишемии. У 5 кролей из каждой группы на 3-и сутки после оперативного вмешательства выполнена релапаротомия, взяты биоптаты для изучения репаративных процессов в паренхиме печени. В IV группе (сравнения) окклюзию сосудов не применяли.

После лапаротомии гепатодуоденальную связку пережимали мягким сосудистым зажимом до прекращения пульсации артерии на ранее определенные промежутки.

Для микроскопического исследования иссекали кусочки края печени, фиксировали их в течение 48 ч в 10% растворе нейтрального формалина, материал проводили по общепринятой методике гистологических исследований, изготавливали серийные парафиновые срезы толщиной 5–6 мкм.

Обзорные препараты, окрашенные гематоксилином и эозином, использовали для общей оценки со-

стояния исследованных тканей и морфометрического исследования.

Для оценки морфофункциональной активности гепатоцитов применяли комплекс гистохимических методик: для выявления гликогена — ШИК-реакцию в модификации Мак Мануса — Хочкиса с контролем амилазой; дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) — реакцию Фельгена — Россенбека (контроль — гидролиз с HCl).

Степень повреждения гепатоцитов оценивали с помощью морфометрического метода по соотношению неизмененных клеток (НГ) с умеренной функциональной активностью, и необратимо поврежденных (ПГ) клеток. На микрофото при увеличении $\times 400$ в случайно выбранных 5 полях зрения оценивали по 30 клеток (150 клеток в одной печени). Индекс повреждения гепатоцитов (ИПГ) рассчитывали по формуле: $ИПГ = НГ/ПГ$.

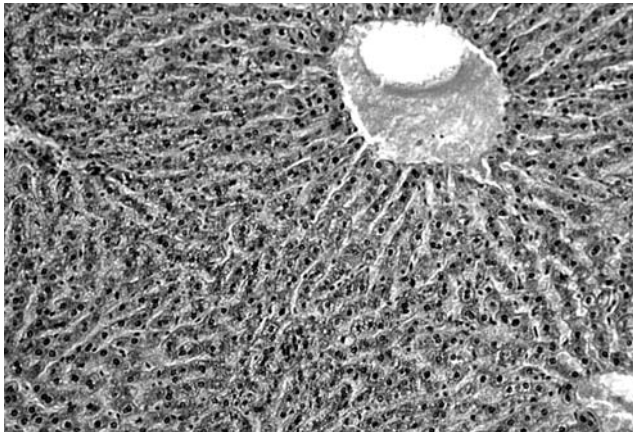


Рис. 1. Цитоплазма гепатоцитов содержит гликоген. Ядра с хорошо выраженной кариолеммой и глыбчатой структурой кариоплазмы. Определяются диплоидные клетки. IV группа (контроль). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

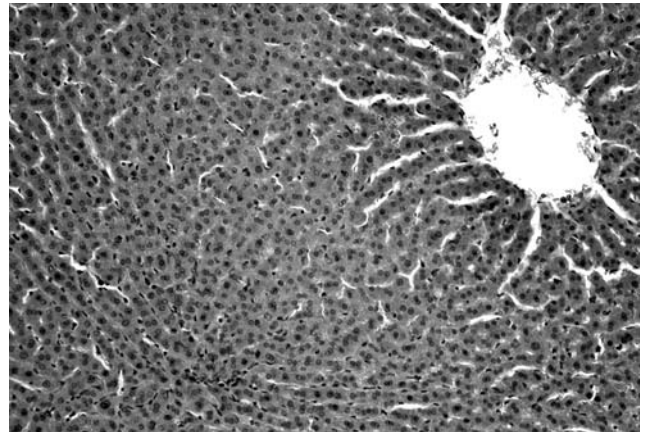


Рис. 3. Чередование зон клеток с выраженными альтеративными изменениями с участками клеток с малым количеством поврежденных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. II группа. $\times 200$.

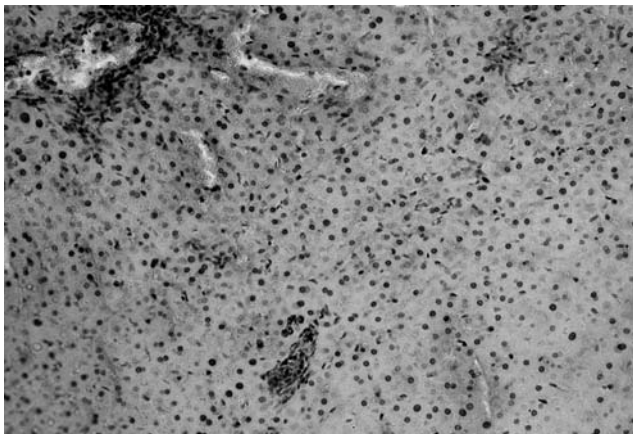


Рис. 2. Трабекулярная дисконкомплексация и диффузные некробиотические и некротические изменения гепатоцитов. I группа. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

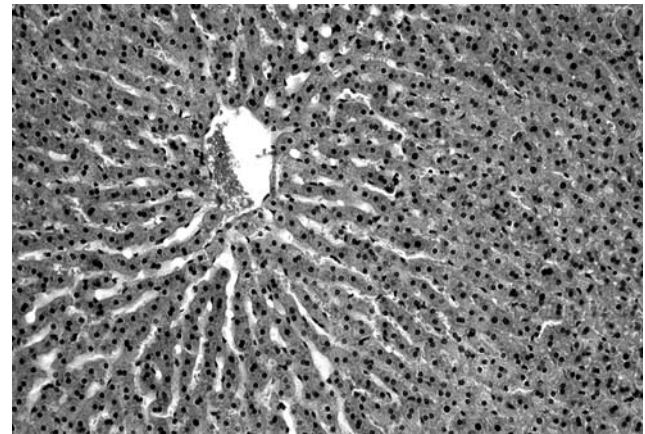


Рис. 4. Центральная зона дольки с большим количеством сохраненных клеток, а периферическая - с признаками трабекулярной дисконкомплексации и альтеративно измененными гепатоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. III группа. $\times 200$.

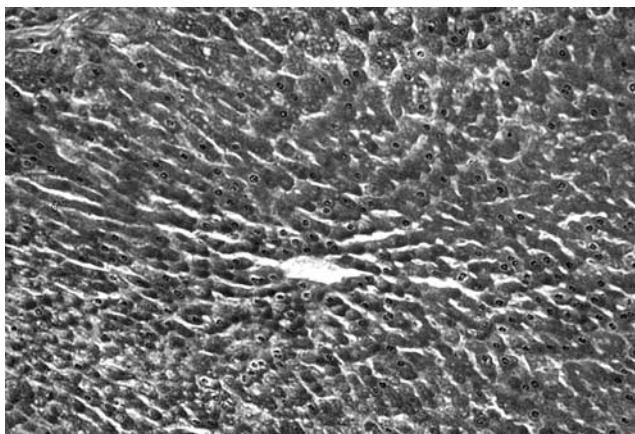


Рис. 5. Цитоплазма гепатоцитов содержит гликоген в виде глыбчатых отложений красно-малинового цвета. IV группа (контроль). ШИК-реакция. $\times 200$.

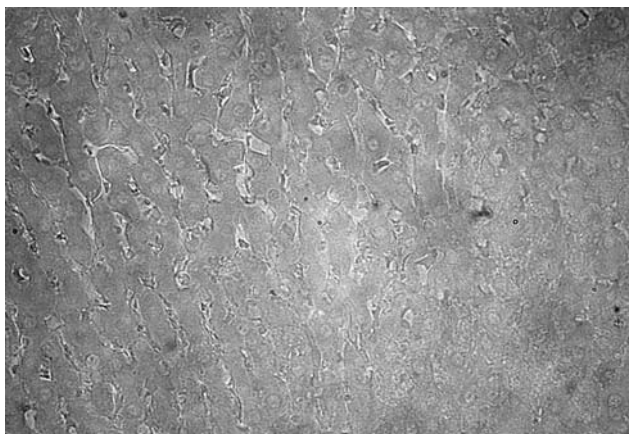


Рис. 7. Полное отсутствие окрашивания ядер гепатоцитов. I группа. Окраска по Фельгену-Россенбеку на ДНК. $\times 400$.

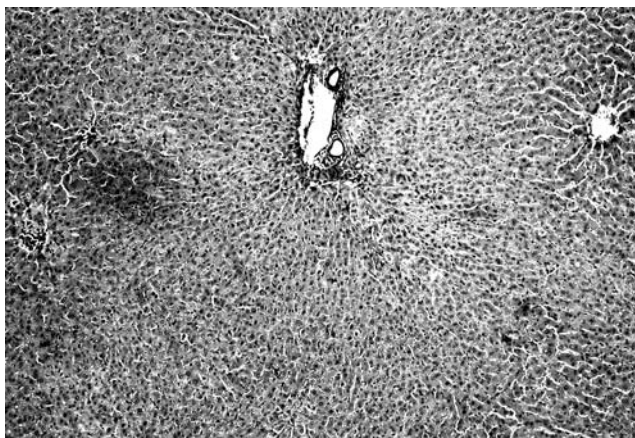


Рис. 6. Гликоген в цитоплазме гепатоцитов не определяется или имеет характер следов. I группа. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$.

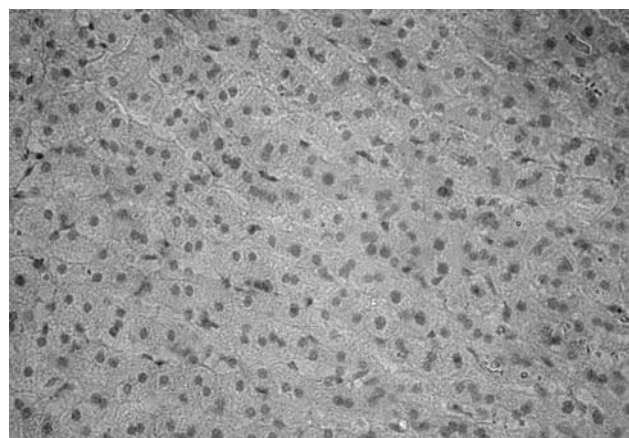


Рис. 8. Умеренное окрашивание ядер гепатоцитов. Ядра Купферовских клеток интенсивно окрашены. III группа. Окраска по Фельгену-Россенбеку на ДНК. $\times 400$.

Полученные результаты обрабатывали с использованием методов математической статистики. Вычисляли среднюю арифметическую, среднюю ошибку (ошибку репрезентативности), среднее квадратическое отклонение, относительные величины и среднюю ошибку относительных величин.

Определяли тип распределения в полученных массивах данных. Для нормальных распределений достоверность различия показателей определяли по критерию Стьюдента. При определении степени вероятности допускали минимальную точность $P < 0,05$, что соответствует 95% вероятности безошибочного прогноза.

Статистическая обработка результатов выполнена на РС IBM Acer Extensa 5220 с использованием статистической программы Stat Plus 2009 Professional 5.8.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные и морфологические изменения. При изучении препаратов печени животных IV группы от-

мечено, что клетки организованы в дольки, в центре которых расположены венулы, на периферии — печеночные триады, состоящие из венул, артериол, лимфатических сосудов и желчных протоков. Центральные вены и сеть синусоидных сосудов умеренно полнокровны. Во всех наблюдениях строение долек печени характеризовалось радиальной ориентацией трабекул. Цитоплазма гепатоцитов эозинофильная, неоднородная вследствие наличия в ней "пустот" с неровными контурами, которые соответствуют отложениям гликогена. Ядра синие, с хорошо выраженной кариолеммой и глыбчатой структурой кариоплазмы (рис. 1).

В образцах печени животных I группы повреждение ткани проявлялось в виде диффузного межатрабекулярного отека, расширения вокругсинусоидных пространств, дисконфлексии трабекул, диффузных некробиотических и некротических изменений гепатоцитов. Цитоплазма гепатоцитов слабо окрашена, резко базофильна (признак распада РНК). Отмечены

кариопикноз и кариолизис (рис. 2). В большей части клеток признаки цитолиза. Сохранные гепатоциты в виде небольших групп расположены в перипортальных зонах или центральных отделах долек, вокруг центральных вен. Во II группе определяются гепатоциты с выраженным отеком, расширенными вокругсинусоидными пространствами. Синусоидные сосуды также расширены, переполнены кровью. Центральные вены и воротные каналы выражено полнокровны. Дискомплексация трабекул, по сравнению с таковой при 30-минутной ишемии, менее выражена. Отмечено неоднородное повреждение ткани печени: зоны с большим количеством клеток и выраженными альтеративными изменениями (некробиотически измененные и некротизированные клетки) мозаично чередуются с участками клеток с умеренной функциональной активностью и небольшим количеством поврежденных клеток (рис. 3). В III группе выявлено мозаичное нарушение гистоархитектоники органа в виде дисконкомплексации трабекул. Синусоидные сосуды расширены, полнокровны. Центральные вены и воротные каналы полнокровны. Распространенные очаги некроза отсутствуют. Зоны с относительно высокой частотой сохранных клеток с умеренной функциональной активностью и небольшим количеством дистрофически измененных и некротизированных клеток мозаично чередуются с участками выраженных альтеративных изменений. В зонах, не подвергшихся некрозу, определяются гепатоциты с обратимыми дистрофическими изменениями, отеком и гранулярностью цитоплазмы. В гидропически измененных гепатоцитах выявляли гиперхромные ядра, многие в состоянии кариопикноза (признаки необратимого ПГ) (рис. 4).

Гликоген. У животных I группы гликоген в цитоплазме гепатоцитов отсутствовал или определяли его следы (рис. 5), что свидетельствовало о значительном снижении морфофункциональной активности клеток. Лишь в единичных гепатоцитах определяли слабое красно-малиновое диффузное окрашивание цитоплазмы. В цитоплазме звездчатых ретикулоэндоте-

лиоцитов небольшое количество мелких гранул гликогена, что свидетельствовало о большей резистентности к гипоксии этих клеток. Во II группе гликоген практически не обнаружен, в ткани печени видны лишь его следы в виде скудного диффузного красно-малинового окрашивания цитоплазмы. В III группе глыбчатые отложения гликогена в цитоплазме гепатоцитов в большинстве долек печени были умеренно окрашены, что свидетельствовало о сохранении обменно-синтетических процессов в клетках. При этом характер и количество отложений гликогена аналогичны таковым в IV группе (рис. 6).

ДНК. При окрашивании по Фельгену — Россенбеку в I группе отмечено полное отсутствие окрашивания ядер гепатоцитов, что свидетельствовало о необратимом повреждении клеток (рис. 7). Во II группе наблюдали слабое окрашивание ядер гепатоцитов вплоть до его отсутствия. В III группе выявлено слабо положительное или умеренное сине-фиолетовое окрашивание ядер гепатоцитов. Ядра звездчатых ретикулоэндотелиоцитов интенсивно окрашены (рис. 8).

По данным морфометрического анализа ИПГ наиболее наглядно иллюстрировал различия степени повреждения печени животных трех групп (рис. 9).

При сопоставлении структурных изменений печени при различных режимах ишемического повреждения установлено, что во всех экспериментальных моделях (острая ишемия и режимы чередования ишемии и реперфузии) в органе выявляли аналогичные изменения, в частности, дисциркуляторные, дистрофические и некротические процессы с реакцией на них макрофагов и лимфоцитов.

Морфологическими признаками альтерации паренхимы печени при ишемическом повреждении были дистрофические изменения от зернистой до вакуольной дистрофии, а также некротические изменения в виде цитолиза гепатоцитов. Характерно исчезновение гликогена из цитоплазмы гепатоцитов, что является отражением их повреждения. При этом уменьшение количества ШИК-положительных продуктов (гликогена) в гепатоцитах строго ориентировано — от печеночных триад к центральной вене.

Наиболее ранние и выраженные повреждения обнаружены в перипортальной области, наиболее поздние и менее выраженные — в околоцентральной зоне печеночной дольки, то есть дистрофическое повреждение клеток первоначально локализуется перипортально, затем распространяется на другие зоны дольки. Таким образом, можно проследить распространение повреждений из области интенсивного кровотока в менее кровоснабжаемую зону.

Выраженность и обратимость повреждения различны в зависимости от продолжительности ишемии и длительности реперфузии. Минимальные изменения отмечены в модели ишемического повреждения

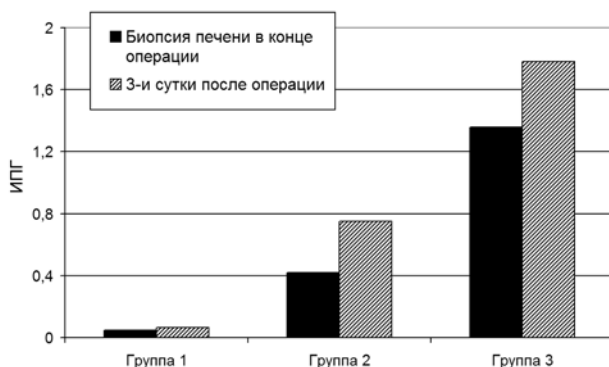


Рис. 9. Индекс повреждения гепатоцитов (ИПГ).

в группе III, наиболее выраженные — в группе I. Выраженность морфологических изменений в группе II занимает промежуточное положение.

Сравнительный морфологический анализ структурных изменений в печени при различных моделях ишемии также подтвердил это положение.

Гиперплазия звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и лимфогистиоцитарная инфильтрация воротных каналов являются ответной реакцией на повреждение, обусловленное острой ишемией печени.

В отсроченном периоде ишемии (3–и сутки) у животных III группы, хотя и сохранялись патологические изменения гепатоцитов, одновременно наблюдали признаки их регенерации, что проявлялось увеличением количества диплоидных гепатоцитов и их полиплоидией и свидетельствовало о сохранении репаративного резерва печени.

Таким образом, режим окклюзии сосудов с предварительной ишемической подготовкой является наиболее щадящим для ткани печени, без грубых структурных повреждений и функциональных нарушений, что позволяет рекомендовать его для клинического применения в качестве оптимального при выполнении резекции печени в сочетании с афферентной васкулярной эксклюзией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pringle's maneuver and selective inflow occlusion in living donor liver hepatectomy / H. Imamura, N. Kokudo, Y. Sugawara [et al.] // *Liver Transplant.* — 2004. — Vol. 10, N 6. — P. 771 — 778.
2. Abu-Amara M. Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia-reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion / M. Abu-Amara, K. Gurusamy // *HPB.* — 2010. — N 12. — P. 4 — 14.
3. Способ обширных резекций печени / В. В. Бойко, Д. И. Скорый, А. М. Тищенко [и др.] : XVI междунар. конгр. хирургов гепатологов России и стран СНГ "Актуальные проблемы хирургической гепатологии" (16–18 сент. 2009 г., г. Екатеринбург) // *Анналы хирург гепатологии.* — 2009. — № 3. — С. 5.
4. Бойко В. В. Синдром хвостатой доли печени. Особенности клинического течения, хирургическая тактика / В. В. Бойко, Д. И. Скорый // *Клін. хірургія.* — 2010. — №4. — С. 5 — 8.
5. Lau W.—Y. Methods of vascular control technique during liver resection: a comprehensive review / W.—Y. Lau, E. C. H. Lai, S. H. Y. Lau // *Hepatobil. Pancr. Dis. Int.* — 2010. — Vol 9, N 15. — P. 473 — 481.
6. Ischaemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study / D. Azoulay, V. Lucidi, P. Andreani [et al.] // *J. Am. Coll. Surg.* — 2006. — Vol. 202. — P. 203 — 211.
6. Kwan M. Tolerance of the liver to intermittent Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors / M. Kwan, Sheung-Tat Fan, I. O. L. Ng // *Arch. Surg.* — 1999. — Vol. 134, N 5. — P. 533 — 539.
7. Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury / M. Kume, Y. Yamamoto, S. Saad [et al.] // *J. Lab. Clin. Med.* — 1996. — Vol. 128. — P. 251 — 258.
8. Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis / S. Q. Li, L. J. Liang, J. F. Huang, Z. Li // *World J. Gastroenterol.* — 2004. — N 10. — P. 2580 — 2584.

