

Изучение метаболических и морфо-гистохимических изменений ишемизированной печени после реперфузии

В.В.НОВОМЛИНСКИЙ

Studying metabolic and morfo-gistochemical changes of eshemized liver after reperfusion

V.V.NOVOMLINSKY

Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н.Бурденко
Дорожная клиническая больница на ст. Воронеж-1 ОАО «РЖД»

Восстановление портального кровотока в ишемизированной паренхиме печени приводит к резко выраженной прогрессии дистрофических изменений и большой потере ферментативной активности в гепатоцитах. Введение кислорода в перфузируемую портальную кровь не является фактором, улучшающим показатели паренхимы и не обеспечивает приемлемого уровня функционирования печени.

Ключевые слова: морфо-гистохимия печени, метаболические изменения печени

Restoration of a portal blood-groove in eshemized tussue of liver leads to sharply expressed progression of dystrophic changes and the big loss enzymatic activity in hepatocities. Oxygen introduction in perfused portal blood is not the fact improving the indicators of tussue and does not provide the comprehensible level of functioning of a liver.

Key words: morfo-gistochemical liver, metabolic changes of a liver

Хирургическое лечение ряда заболеваний печени требует выполнения обширных её резекций [1, 2, 5]. С целью уменьшения интраоперационной кровопотери, по показаниям, можно применять кратковременное пережатие печеночно-двенадцатиперстной связки (ПДС) [3, 4]. Однако, несмотря на достаточно высокую эффективность, указанная манипуляция может приводить к развитию негативных процессов в печеночной паренхиме.

Целью настоящего исследования явилось детальное изучение морфофункционального состояния ишемизированной печени после реперфузии.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 20 беспородных собаках обоего пола массой 10-14 кг. Было выполнено две серии опытов, в которых изучались результаты восстановления кровотока после ишемии печени различной длительности. В первой серии опытов (10 собак) выполняли реперфузию печени после 30-минутной ишемии без использования протектора; длительность наблюдения 5 минут и 60 минут. Во второй серии опытов (10 собак) выполняли реперфузию после 30-минутной ишемии на фоне введения оксигенированного раствора; длительность наблюдения 5 минут и 60 минут после восстановления кровотока.

Эксперименты проведены под общим обезболиванием внутривенным капельным введением раствора оксибутирата натрия. Премедикация включала подкожное введение смеси 1% раствора промедола (из расчета 2 мл/кг массы тела), 1-2 мл 1% раствора атропина и 1 мл 0,25% раствора ди-медрола. Вводный наркоз осуществлялся внутрибрюшинным введением 5% раствора этиминала натрия из расчета 0,5 мл/кг массы тела животного. При манипуляциях на элементах ПДС дополнительно вводили через каждые 30 минут по 1 мл 0,005% раствора фентанила.

Брюшную полость вскрывали послойно верхне-срединной лапаротомией, после чего выделяли элементы печеночно-двенадцатиперстной связки. Для получения материала для биохимических исследований и коррекции нарушений гемодинамики во время эксперимента катетеризировали поверхностные бедренные вены с обеих сторон. Через один катетер вводили раствор оксибутирата натрия, другой проводили до устья задней полой вены в место впадения печеночных вен.

Объем инфузии растворов во время эксперимента определялся значениями центрального венозного давления аппаратом Вальдмана. Артериальное давление регистрировали прямым методом. Перед реперфузией внутривенно вводили лазикс из расчета 1 мл/кг массы тела животного.

Забор крови для биохимического анализа проводили через катетер, установленный в поверхностной бедренной вене, для определения содержания средних молекул из портальной вены. Часть материала получали через катетер, установленный в задней полой вене.

Для морфологического и гистохимического исследования использовали фрагменты левой доли печени. Часть фрагмента печеночной паренхимы фиксировали в 10% забуференном формалине, а другую планировали для гистохимического анализа. Фиксированный в формалине материал использован для приготовления препаратов обзорной микроскопии с окрашиванием гематоксилин-эозином, по ван Гизону, фукселином по Харту, импрегнацией по Футу. Гистохимические исследования выполнены на криостатных срезах. Блок ткани замораживали в петролейном эфире при температуре жидкого азота. Блоки ткани размещали на насадках криостата и при температуре камеры не менее -18°C приготавливали срезы толщиной 7 мкм.

Серии криостатных срезов распределяли на группы согласно видам гистохимических методик. Фиксация срезов производилась адекватно задачам идентификации наличия метаболитов или выявления активности ферментов. Использовались смесь Россмана при температуре -18°C для выявления гликогена, пропанол при комнатной температуре - для исследования белка, НГП, рРНК. Для целей отсроченного исследования активности кислой и щелочной фосфатаз срезы обрабатывали 3 минуты при температуре -4°C в смеси равных объемов хлороформа и ацетона.

Особенностью выполнения гистохимического исследования помимо применения специализированных способов фиксации и подготовки материала явилось использование гель-сред по Э.Г.Быкову (1978, 1985), обеспечивающее стандартизацию результатов исследования. Кроме этого, были использованы модифицированные Э.Г.Быковым (1985) методики одновременного выявления активности КФ, ЩФ и ЭКК. Срезы после выявления активности дегидрогеназ и гидролитических ферментов окрашивали жировым красным «О» и заключали в глицерин-желатин. Микропрепараты изучали в проходящем свете при искусственном освещении на микроскопе «Studer».

Содержание гликогена, уровень активности дегидрогеназ гепатоцитов, кислой фосфатазы в микропрепаратах определяли одноволновым плаг-методом на установке «БИОЛАМ-УИ». Дли-

ны волн монохроматора выбирали соответственно максимуму спектров поглощения - 530 нм для гликогена и 620 нм для формазана и диазосоединений. Учитывая особенности распределения активности ферментов и различия содержания гликогена в отдельных зонах печеночных долек, измерения проводили в различных зонах долек.

Последствия реперфузии ишемизированной печени были прослежены в сроки от 5 до 60 минут. При исследовании действия короткой ишемии был использован следующий комплекс биохимических методик: активность АлАТ и АсАТ, γ -ГПТ, активность ЛДГ, содержание трех фракций билирубина, глюкозы и лактата.

Результаты и их обсуждение

Начало перфузии после 15-минутной ишемии сопровождалось существенным повышением уровня трансаминаз сыворотки - АлАТ и АсАТ, что было связано с быстрым развитием дистрофических и некробиотических изменений паренхимы печени. Одновременно происходило увеличение активности γ -ГПТ. Повышение уровней трансаминаз были наиболее выраженными уже к 5-ой минуте ишемии, на 60-й минуте после реперфузии их уровень снижался. Это снижение было наибольшим для АлАТ, напротив, активность γ -ГПТ по мере перфузии значительно нарастала. Увеличение уровня АсАТ на пятой минуте реперфузии было связано, прежде всего, с митохондриальной фракцией этой трансаминазы.

Исследования содержания билирубина показали снижение уровня свободного билирубина на пятой минуте реперфузии. Показатели общего билирубина и его связанной фракции изменялись незначительно. В то же время, определялось выраженное снижение уровня связанной фракции билирубина, наиболее значительное на 60-й минуте реперфузии (рис. 1).

Значимых изменений содержания глюкозы в периферической крови получено не было. На фоне некоторого повышения уровня лактата на пятой минуте после реперфузии отмечалось синхронное изменение уровня активности лактатдегидрогеназы, что было связано с ишемическими изменениями печеночной паренхимы и холестаза. На светооптическом уровне этим изменениям соответствовали дистрофические изменения гепатоцитов. На рис. 2 представлены основные показатели функции печени и состояния ее паренхимы после получасовой ишемии и реперфузии портальной кровью на 5-й и 60-й минутах. Все животные этой

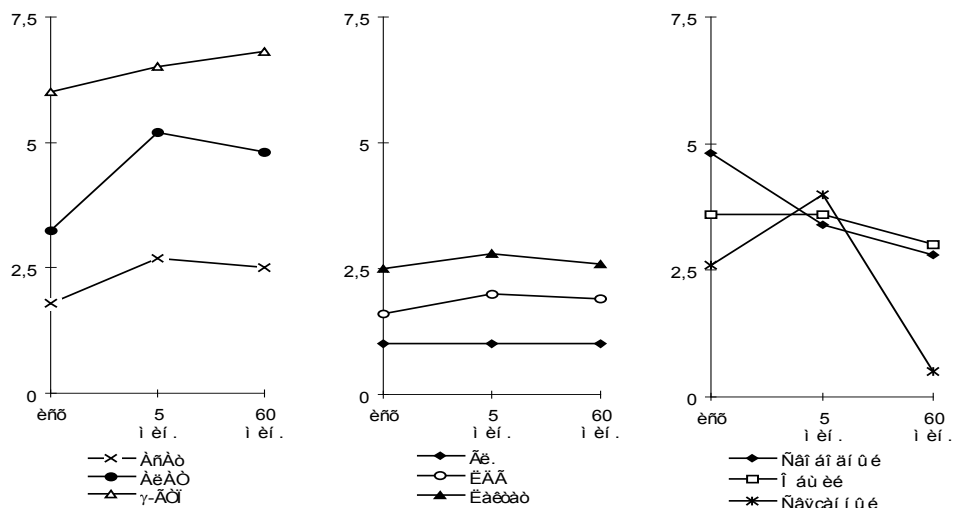


Рис. 1. Изменения биохимических показателей функции печени при восстановлении портального кровотока после 15-минутной ишемии. Обозначения: по оси абсцисс - время в значениях Лп, по оси ординат - значения тестов.

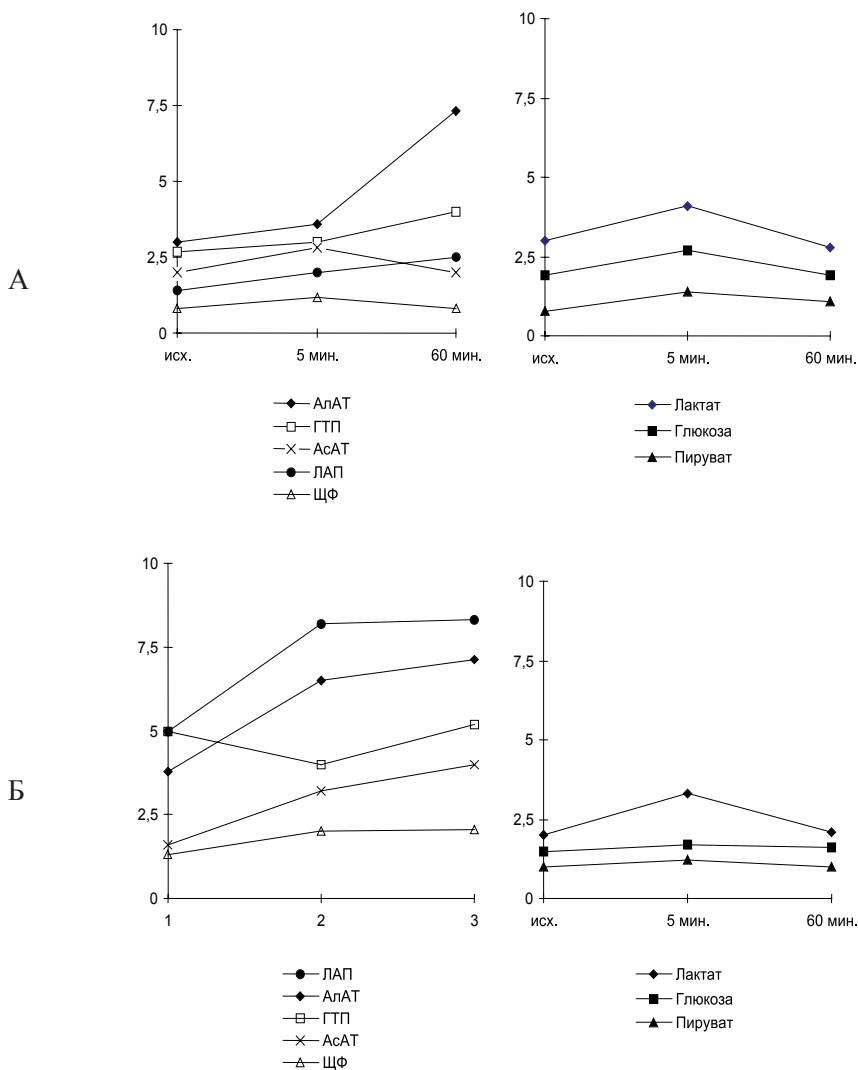


Рис. 2. Биохимические показатели функции печени после реперфузии неоксигенированной (А) и оксигенированной портальной кровью (Б). Обозначения: по оси абсцисс - время в значениях Лп, по оси ординат - значения тестов.

группы погибли в ближайшие часы после завершения эксперимента. Наибольший интерес представляют результаты, полученные при оценке биохимических показателей цитолиза гепатоцитов и, частично, связанных с холестазом.

Наиболее существенными оказались изменения уровня АлАТ. Величины активности трансаминаз являются отражением быстро прогрессирующих дистрофических изменений паренхимы печени по мере продолжения перфузии. На пятой минуте происходило незначительное повышение активности щелочной фосфатазы. Повышение уровня содержания лактата и пирувата замедлялось на 60-й минуте.

При исследовании показателей ОАА было выявлено их снижение на пятой минуте реперфу-

зии с тенденцией к увеличению в конце первого часа, что отражает начало реакций, тормозящих свободнорадикальное окисление липидов. Быстрое снижение уровня диеновых конъюгатов (ДК) гепатановой и изопропиловой фракций было связано с нарушением структуры плазматической мембраны, ядерной оболочки и внутриклеточных мембран гепатоцитов. Соответствующие данные были получены при гистохимическом исследовании фосфолипидов. В гомогенате печени наиболее выраженные изменения были выявлены для изопропиловой фракции ДК. В целом результаты, полученные при исследовании сыворотки крови, были более динамичными, чем данные гистохимического анализа паренхимы печени и определения ДК ее гомогената (рис. 3).

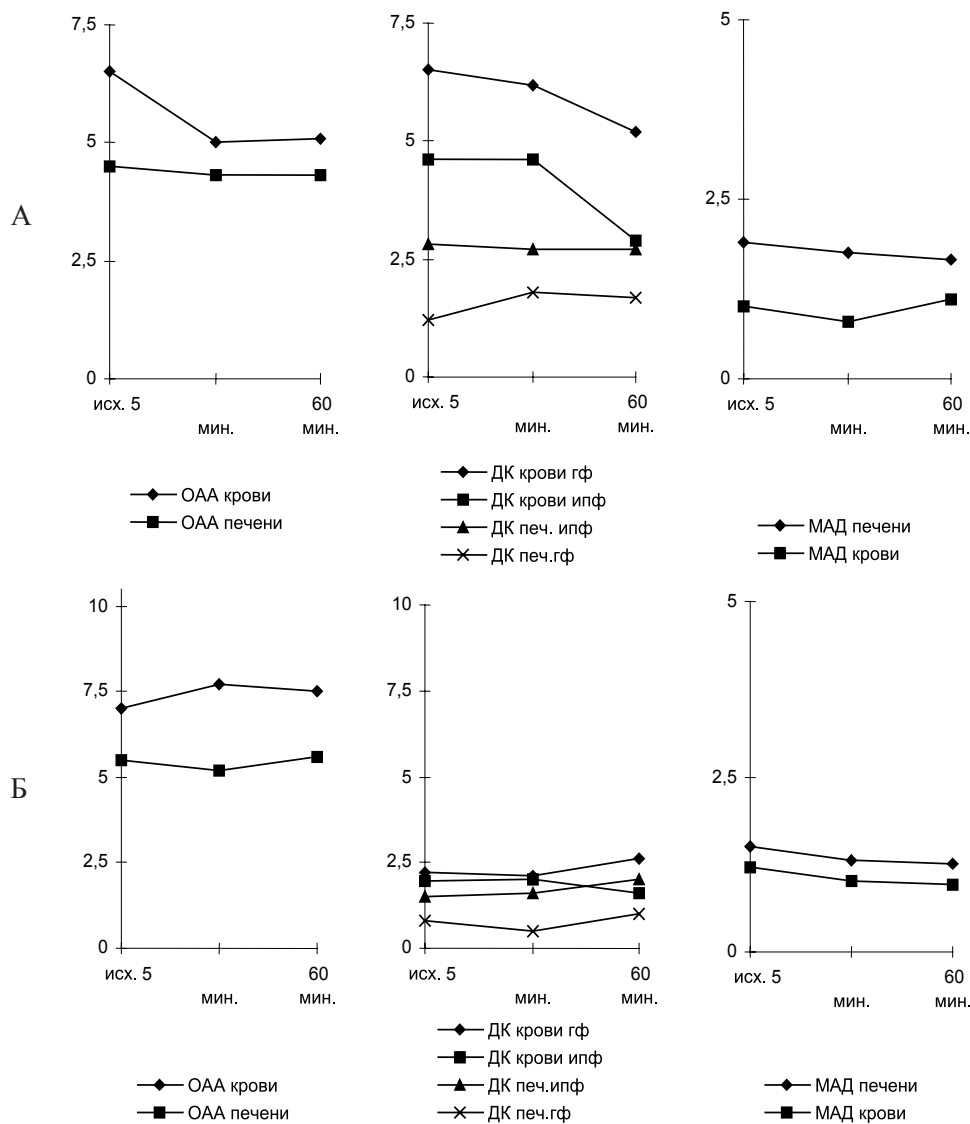


Рис. 3. Показатели функции антиоксидантных систем крови и гомогената печени после реперфузии портальной кровью без оксигенации (А) и с оксигенацией (Б) после получасовой ишемии. Обозначения: по оси абсцисс - время в значениях Ln, по оси ординат - величины показателей.

В следующей серии экспериментов во время реперфузии через катетер, поставленный в портальную вену, вводился оксигенированный физиологический раствор с целью определения возможности снижения уровня постишемических повреждений паренхимы печени во время реперфузии.

Изменения уровня трансаминаз, ЛАП, γ -ГПТ имели однонаправленный характер (рис. 3), указывающий на прогрессирование процессов цитолиза в паренхиме печени, при этом значения АлАТ на пятой минуте составили $692,8 \pm 169,0$; АсАТ - $333,7 \pm 68,1$. Эти показатели были существенно выше определяемых в опытах без оксигенирования портальной крови. Высокий уровень трансаминаз и лейцинаминопептидазы на 5-й минуте реперфузии указывали на быстро развивающийся цитолиз.

Эти результаты соответствовали картине распространения и отягощения дистрофических и некробиотических изменений паренхимы, определенных в морфологических исследованиях. Изменение активности кислой фосфатазы указывало на гибель гепатоцитов и развитие некротических изменений в ткани печени.

Характерные изменения были обнаружены также при исследовании концентрации лактата и пирувата в сыворотке крови. Непосредственно после восстановления кровотока на фоне незначительно выраженной гипергликемии, концентрация лактата увеличивалась не столь значительно, как в экспериментах без перфузии оксигенированной портальной крови ($2,13 \pm 0,24$, без оксигенации - $3,09 \pm 0,005$). Уровень лактата постепенно снижался без изменения содержания глюкозы и пирувата. Изменения общего билирубина и его фракций во время перфузии оксигенированной портальной кровью оказались статистически недостоверными.

Свидетельством изменения баланса процессов, связанных с антиоксидантной активностью, явились изменения общей антиоксидантной активности крови и гомогената печени. В опытах с перфузией оксигенированной кровью значения ОАА были выше ($75,83 \pm 6,32$, без оксигенации - $46,12 \pm 6,3$). Уровень индивидуально обусловленных вариаций также оказался ниже, чем после перфузии неоксигенированной кровью - 20,4%. На протяжении 60 минут значения ОАА крови существенно не менялись и оставались высокими. Уровень ОАА гомогената печени изменялся так же, как и в опытах без оксигенации.

Введение через портальную вену оксигенированного физиологического раствора существенно изменило количественные соотношения диеновых конъюгатов. Значения МАД в опытной и контрольной группах были статистически различными. Содержание МАД в сыворотке на протяжении часа снижалось от $9,42 \pm 0,9$ на пятой минуте до $8,64 \pm 1,2$ - через 60 минут. Эти значения были на 25% ниже полученных в опытах без оксигенации.

Наиболее статистически значимыми оказались показатели МАД гомогената печени (12501 ± 781 на пятой и 12189 ± 1000 на шестидесятой минуте). Полученные результаты указывают на уменьшение содержания конечных продуктов ПОЛ. Несмотря на то, что при применении оксигенированных растворов уровень ферментов, характеризующий процессы цитолиза был достоверно ниже, степень поражения гепатоцитов являлась несовместимой с сохранением функции печени. Таким образом, влияние на изменение паренхимы печени после реперфузии было возможно, однако, введение с портальной кровью оксигенированного физиологического раствора не предотвращало несовместимую с сохранением функции печени потерю паренхимы.

При морфо-гистохимическом исследовании печени после восстановления кровотока было выявлено, что в ближайшем периоде наблюдаются выраженные распространенные расстройства внутрипортального кровообращения. В части расширенных вен наблюдался разрыв стенок, в паренхиме печени - кровоизлияния и очаги плазморрагий. Наблюдалась дисконфлексация долек, интерстиция в зоне триад с признаками выраженного отека и формирования очаговых холестазов. В это же время наблюдались распространенные дистрофические изменения гепатоцитов в сочетании с фокальными некрозами и диссоциацией гепатоцитов в балках. В части клеток выявлялись ядра с признаками отека и лизиса хроматина. Через час после восстановления кровотока прогрессировал отек интерстиции, что сочеталось с дистрофическими изменениями паренхимы на больших площадях.

Коллагеновые волокна зоны триад были гомогенизированы с различным уровнем фуксинофилии, их изменения через 60 минут оставались теми же, что и на 5-й минуте. На фоне частично сохраненного анастомозирования после 5-й минуты восстановления кровотока в центральной и средней зонах печеночных долек формировались

локусы редукции анастомозов, лизиса волокон. В связи с прогрессирующим лизисом содержание РВ на 60-й минуте заметно снижалось. Аргирофильные волокна обычного калибра сохранялись в пределах пограничных пластинок, в зоне триад, несколько реже по периферии центральных вен. Выявлялись участки паренхимы, содержащие фрагменты РВ или интенсивно аргирофильный гранулярный материал. Изменения эластического компонента оболочек сосудов и интерстиция зоны триад соответствовали изменениям в контрольной группе.

Непосредственно после восстановления кровотока быстро редуцировался «метаболический жир» цитоплазмы гепатоцитов, липиды в эпителии желчных протоков сохранялись только в 40% случаев. Содержание цитоплазматических липидов смежных гепатоцитов резко изменялось, интенсивность окраски кислым гематином ядрышка и структур плазмолеммы существенно снижалась. Эти изменения всегда сочетались с диссоциацией гепатоцитов. В полученном материале было отмечено прогрессивное снижение базофилии в гепатоцитах центральных зон долек. Низкая базофилия была характерна для всех гепатоцитов на протяжении от центральной вены до портальной триады. В смежных территориях паренхимы отмечался различный уровень окрашивания БФС, такие же различия были характерными и для смежных гепатоцитов в пределах печеночных балок. Изменения базофилии, фосфолипидов и уровня реакционной способности белковых групп были схожими с изменениями в контрольной группе.

Более динамичные изменения после восстановления кровотока характерны для топохимии и содержания гликогена. На 5-й минуте эксперимента отмечалась редукция гликогена с формированием локусов потери полисахарида. Показатели содержания гликогена составили $0,095 \pm 0,008$ с относительно низкими уровнями индивидуальных различий в группах. Падение содержания гликогена прогрессировало к 60-й минуте за счет редукции мелкогранулярной цитоплазматической фракции при одновременном увеличении числа интенсивно окрашенных аморфным материалом гепатоцитов. К 60-ой минуте этот показатель составил $0,305 \pm 0,06$, что указывало на прогрессирование процессов углеводной и гидропической дистрофии гепатоцитов. Наблюдалось формирование все больших участков потери гликогена и локусов интенсивной окраски Шифф-реактивом,

полностью исчезали признаки центрального или равномерного распределения углевода в дольках, еще прослеживающиеся на 5-й минуте после восстановления портального кровотока.

Для митохондриально связанных дегидрогеназ и моноаминоксидазы типичным являлся низкий уровень активности, выраженные изменения внутريدольковой топохимии, а также потеря формазана на обширных участках паренхимы печени. На фоне снижения СДГ и ГДГ их повышенный уровень мог определяться в гепатоцитах по периферии центральной вены или вблизи портального комплекса. Активность ГДГ могла быть изменена столь значительно, что в криостатных срезах определялись лишь следы активности дегидрогеназы.

Для альдолазы и ферментов гликолиза определялись те же изменения внутريدольковой топохимии и соотношения митохондриальной и митохондриальной фракций диформазана. В центральных зонах печеночных долек сохранялись обе фракции активности альдолазы, в средних и периферических - митохондриальная. В смежных гепатоцитах и участках паренхимы определялись выраженные различия уровня ЛДГ. При этом, изменения гранул, по сравнению с активностью 3-ФГДГ были не столь выражены и распространены. Изменения такого рода формировали картину «метаболического профиля» исходного состояния печеночной паренхимы.

Следует считать, что для «исходного состояния» перед восстановлением портального кровотока характерен сниженный уровень метаболических процессов в паренхиме при существенном изменении кооперации ферментов цикла Эмбдена-Мейергофа, гликолиза и пентозофосфатного пути превращения глюкозы. Через пять минут после восстановления кровотока, как и через 60 минут не определялось выраженных изменений показателей дегидрогеназной активности паренхимы печени по сравнению с «исходными» данными. В изменении активности дегидрогеназ, моноаминоксидазы и альдолазы после реперфузии портальной кровью можно было отметить снижение активности альдолазы и 3-ФГДГ при некоторой стимуляции уровня ЛДГ. Сопоставляя эти данные с полученными при исследовании временных изменений ишемизированной печени, следует подчеркнуть, что реперфузия отягощает ишемические изменения, особенно в той части, которая касается соотношения ферментов гликолиза, пентозного шунта и синтеза СоА.

В серии экспериментов с использованием оксигенированного физиологического раствора при восстановлении портального кровотока не было получено результатов, указывающих на торможение морфологических изменений паренхимы печени и нормализации содержания в ней метаболитов. Эти результаты, указывают на сохранение активности ГДГ при малом изменении гранул диформаза. Вместе с тем было выявлено сохранение картины ишемического повреждения СДГ, МДГ, и-ЦДГ и МАО, выражающееся в формировании локусов потери активности этих ферментов. Восстановление кровотока с использованием кислорода приводило к снижению уровня МДГ, и-ЦДГ. В центральных зонах печеночных долек сохранялась активность ЛДГ, при этом выявлялись обе фракции диформаза. Во всех зонах долек определялись гепатоциты с неизменными гранулами.

Несомненно, что происходящие при оксигенировании портальной крови изменения не столь значимы, чтобы обеспечить поддержание функции печени, однако, данные, полученные при реперфузии портальной кровью без оксигенации, позволяют считать, что вводимый с портальной кровью кислород в определенной мере изменяет соотношения активности дегидрогеназ в ишемизированной печени. При проведении гистохимических исследований по изучению активности дегидрогеназ, было выявлено, что активность СДГ и МДГ достоверно снижалась во временном интервале от 5 до 60 минут. Это снижение активности затрагивало только эти ферменты, было ровным и менее выраженным по сравнению с результатами, полученными в опытах без перфузии оксигенированной крови.

Данных, которые свидетельствовали бы о коррекции ишемических изменений активности гидролаз, получено не было. На 5-й минуте восстановления кровотока при введении оксигенированного физиологического раствора активность щелочной фосфатазы соответствовала исходным показателям. Протяженные участки паренхимы не содержали окрашенных структур, часто активность фермента ограничивалась синусоидами и билиарными полюсами гепатоцитов в перипортальной зоне. На протяжении 60 минут эта картина не изменялась. Непосредственно перед восстановлением кровотока было выявлено различие в активности кислой фосфатазы. По периферии локусов потери активности КФ формировалась узкая зона интенсивного окрашивания за счет повышенной лизосомальной активности. Реакция эпителия желчных протоков и структур перилобулярных холангионов оставалась высокой. Перфузия приводила к резкому снижению активности кислой фосфатазы, редукции реакции в гепатоцитах, распределенных по периферии локусов и снижению активности кислой фосфатазы. На фоне формирования локусов потери активности эстеразы после начала перфузии отмечалось ее сохранение в гепатоцитах центральных и перипортальных зон.

Таким образом, восстановление портального кровотока в ишемизированной паренхиме печени приводило к резко выраженной прогрессии дистрофических изменений и большой потере ферментативной активности в гепатоцитах. Введение кислорода в перфузируемую портальную кровь не являлось фактором, улучшающим показатели паренхимы и не обеспечивало приемлемого уровня функций печени.

Список литературы

1. *Альперович Б.И.* Хирургия печени и желчных путей. Томск 1997; 318.
2. *Булыгин В.И., Глухов А.А.* Резекция печени с применением новых технологий. Воронеж: Изд-во ВГУ 1995; 103.
3. *Журавлев В.А.* Очаговые заболевания печени и глистные опухоли, осложненные механической желтухой. Киров 2000; 208.
4. *Lodge J.P.* Hemostasis in liver resection surgery. *Semin Hematol.* 2004. 41, 70-75.
5. *Fortner J.G., Shin M.N., Kinne D.W. et al.* Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion. *Ann. Surg.* 1974. 180. 4.

Поступила 19.11.08

Информация об авторе

1. Новомлинский Валерий Васильевич - доктор медицинских наук, заведующий кафедрой транспортной медицины ИПМО Воронежской государственной медицинской академии, главный врач Дорожной клинической больницы на ст. Воронеж - 1 ОАО «РЖД», e-mail: dkbprog@mail.ru