

Влияние усилителя регенерации печени на течение реперфузионного повреждения *in vivo*

Э. Искендеров*, А. Кандога, К. Менде

*Научный центр хирургии имени акад. М.А.Топчибашева, Баку, Азербайджан;

Университетская клиника Гроссхадерн, Мюнхен, Германия

Нарушение микроциркуляции является главной мишенью в поражении печени при реперфузионном повреждении. Авторы изучили эффективность препарата ALR на синусоидальную перфузию.

Исследования проводились на мышах типа C57BL/6, весом 18-25 грамм, в экспериментальных условиях. Подопытных животных подразделили на 3 группы, по 6 особей в каждой. В первой (основной) группе создавали модель лобарной тёплой ишемии. После 90 минут ишемии, 100 мкг ALR вводился в организм животного, после чего начиналась реперфузия. Во второй группе вместо ALR вводили тёплый физраствор, а в 3-й группе производилась только лапаротомия. В основной группе микроциркуляторные нарушения выглядели намного мягче, а интенсивность кровообращения заметно отличалась от ситуации в печени мышей из контрольной группы.

При вычислении интенсивности синусоидального кровообращения, выяснилось, что процент неперфузированных синусоидов равен $22 \pm 4\%$ и статистически достоверно отличается от показателя в группе, где предварительного лечения не проводилось. На биохимических анализах крови активность АсАТ и АлАТ была соответственно на 50% и 28% ниже по сравнению с показателями в контрольной группе.

Результаты доказали благоприятное воздействие ALR на процесс восстановления нарушенного печёночного кровотока и на функциональную активность печени после ишемии и реперфузии.

Ключевые слова: печень, трансплантация, реперфузионное повреждение, микроциркуляция, синусоидальная перфузия

Введение. Единственным радикальным методом лечения тяжёлых поражений печени является трансплантация, которая выполняется в основном путём изъятия печени от больных в состоянии мозговой смерти или одной доли у живого донора. У больных с объёмными поражениями печени, для профилактики кровотечения при её резекциях, применяется пережатие магистральных сосудов печени. В обоих случаях происходит разъединение органа от кровоснабжения. В зависимости от объёма проведённой операции, через различные интервалы времени кровоснабжение печени восстанавливается. Комплекс расстройств – микроциркуляторные нарушения, агрегация форменных элементов крови, усиление процесса перекисного окисления липидов, угнетение антиоксидантной защиты, повышенный синтез медиаторов воспаления, замедление клеточного обмена, цитолиз гепатоцитов и др., которые начинаются после восстановления кровоснаб-

жения печени и вскоре прогрессируют, называются реперфузионным повреждением. Реперфузионное повреждение является грозным осложнением и у 10% больных с пересаженной печенью приводит к отторжению трансплантата. После обширных резекций печени реперфузионное повреждение влияет на морфофункциональное состояние оставшейся части органа и считается одним из причин печёночной недостаточности в послеоперационном периоде [1-4].

Нарушение микроциркуляции является главной мишенью в поражении печени при реперфузионном повреждении. Следствием нарушения микроциркуляции является патология паренхимы печени, недостаток микроциркуляторной перфузии, приводящий к no-reflow и связанный с реперфузией воспалительный ответ, который включает активацию и дисфункцию лейкоцитов и купферовских клеток. Безусловно,



нарушение микроциркуляции связано со сдвигом в гемокоагуляции [5-8].

Предложено много методов терапии реперфузионного повреждения печени фармакологическими препаратами, среди которых можно выделить антиоксиданты, гормональные препараты, лекарственные средства, влияющие на гемореологию, гепатопротекторы, витамины и др. Несмотря на целый арсенал лекарственных препаратов, профилактика и лечение реперфузионного повреждения после резекций печени остаётся актуальной проблемой в гепатобилиарной хирургии.

R.McJunkin и H.Breuhaus [9] первыми в 1931 году опубликовали статью о стимулирующем влиянии экстрактов печени крыс на регенерацию печени после её резекции. В 1975 г. D. LaBrecque и L. Pesch [10] описали получение вещества, названного HSS (hepatic stimulator substance – стимулирующее вещество печени), которое входило в состав супернатанта из печени новорождённых крысят и обладало способностью увеличивать синтез ДНК в печени крыс после её резекции. В 1987 г. A. Francavilla и соавт. [11] сообщили о 830 000-кратной очистке HSS. Полученное в результате очистки вещество было названо усилителем регенерации печени (augmenter of liver regeneration — ALR). Исследования проводимые *in vitro* показали, что ALR как специфический протеин важен для функционирования гепатоцитов, способный повлиять на основные ферментные системы оксидативного стресса, такие как сульфгидрил-оксидаза и цитохром-С редуктаза, тем самым защищая клетку от реперфузионного повреждения.

Цель исследования: изучить эффективность применения препарата ALR на фоне экспериментальной модели реперфузионного повреждения печени *in vivo* и выявить влияние данного препарата на синусоидальную перфузию.

Материал и методы. Исследования проводились на мышах типа C57BL/6, весом 18-25 грамм, в экспериментальных условиях, соблюдая кодексы законодательства Германии по охране подопытных животных.

Для анестезии использовали ингаляционный наркоз со смесью кислорода 30%, N₂O - 68,5% и 1,5% изофлурана (Forene; Abbott, Wiesbaden, Germany). Под сорокократным увеличением объектива микроскопа с помощью микрохирургических инструментов производился маленький разрез на шее и проводилась катетеризация (внутренний диаметр – 0,28mm;

Portex, Hythe, Англия) левой сонной артерии с целью регистрации сдвигов в центральной гемодинамике и для введения ALR.

Подопытных животных подразделили на 3 группы, по 6 особей в каждой. В первой (основной) группе брюшная полость открывалась срединным разрезом и, накладывая маленький сосудистый клип на ножку большой правой доли печени, создавали модель лобарной тёплой ишемии. После 90 минут ишемии, до начала реперфузии, 100 µg ALR вводился в организм животного, после чего начиналась 60-минутная реперфузия.

Вторая группа (контрольная) – где все манипуляции проводились как в основной, за исключением того, что вместо ALR вводили тёплый физиологический раствор того же объёма. Третья группа была Sham – где вся процедура заканчивалась открытием и закрытием брюшной полости, с перерывом в несколько секунд.

После 40 – 45 минут с момента начала реперфузии, применяя эффект иллюминации методом интравитальной флюоресцентной микроскопии, изучали микроциркуляцию печени. Микроскопия проводилась в темноте. Полученные изображения с помощью CCD видеокамеры передавались в видеосистему, где всё записывалось на ленту. Изучали кровообращение в синусоидах на нескольких участках поверхности печени и отток крови от них к центрально расположенным печёночным венам. После этого, соблюдая особую методику краситель Rodamin 6G - 0,05% (Sigma-Aldrich, Diesenhofen, Germany) в дозе 0,15 мкг/кг вводили в сонную артерию для пометки лейкоцитов и их визуализации. Меченые лейкоциты можно наблюдать в постсинусоидальных венах и в синусоидах, используя специальный фильтр N2.

Для выявления степени тяжести реперфузионного повреждения, изучали интенсивность синусоидальной перфузии в 5-7 ацинусах и производили online наблюдение крашенных эритроцитов. Для окрашивания эритроцитов вводили краситель FITC 5%- 5 мкг/кг (Sigma-Aldrich, Diesenhofen, Germany). После окрашивания вычисляли общее число синусоидов в наблюдаемом ацинусе и количество синусоидов, в которых не идёт перфузия. Недостаточность синусоидальной перфузии вычисляли по формуле:

$$\text{Процент неперфузируемых синусоидов} = \frac{\text{неперфузируемые синусоиды}}{\text{общее количество синусоидов}} \times 100\%$$

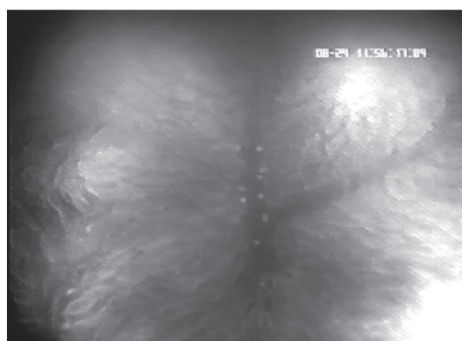


РИС. 1 - 2. ЛЕЙКОЦИТЫ В МИКРОСОСУДАХ ПЕЧЕНИ

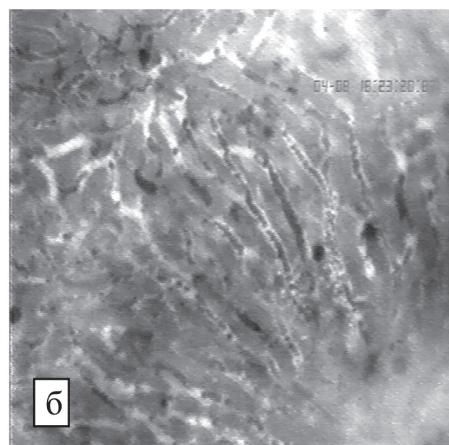
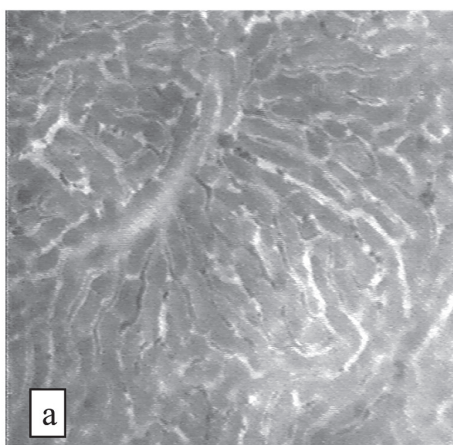


РИС. 3. КАРТИНА ПЕЧЁНОЧНОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ: А) ОСНОВНАЯ ГРУППА; Б) КОНТРОЛЬНАЯ ГРУППА

Интравитальная микроскопия продолжалась 20-30 минут, после чего брали кровь из сердца для биохимического анализа и куски печёночной ткани для гистоморфологического исследования. Стандартные ферменты (АлАТ, АсАТ, ЩФ, γ-ГТТ) и количество общего билирубина измеряли на биохимическом анализаторе. Изменения в структуре органа изучали под световым микроскопом в лаборатории той же клиники.

Результаты и их обсуждение. Исследования микроциркуляции как в основной, так и контрольной группах показали драматические расстройства после лобарной ишемии и реперфузии. Повышалось количество неподвижных лейкоцитов, наблюдалось прилипание адгерентных лейкоцитов к внутренней стенке терминальной артериолы с последующим понижением интенсивности кровотока в бассейне этого сосуда. Неподвижными лейкоцитами принято считать те клетки, которые пересекают воображаемую перпендикулярную ось сосуда и скорость вращения которых ниже скорости тока крови. Подвижные лейкоциты пересекали воображаемую косую линию сосуда, и их количество считывали в течение одной

секунды. Клетки, цепко прилипшие к стенке сосуда в течение 20 секунд, обозначали как адгерентные лейкоциты и число их вычисляли по количеству лейкоцитов, прилипавших на 1 мм² эндотельного покрытия. Неподвижные лейкоциты в синусоидах подсчитывали и обозначали как n лейкоцит/ацинус.

Все изображения, фиксированные на ленте, обрабатывались специальной компьютерной программой (CAPIIMAGE; Dr Zeintl, Heidelberg, Германия), и производилась статистическая обработка полученных результатов.

На микрофотографиях (рис.1 и 2) изображены меченые лейкоциты в микроциркуляторном русле печени мышей: слева в sham, а справа в группе, где печень подверглась реперфузионному повреждению. Лейкоциты визуализируются как белые точки. Сравнивая фото, можно с уверенностью утверждать, что реперфузионное повреждение усугубляет микроциркуляцию.

По сравнению с группой, в которой не создавали ишемию, в контрольной группе после реперфузии



наблюдали замедление скорости кровообращения. Число адгерентных лейкоцитов увеличилось до $554 \pm 25 \text{ мм}^2$, вырос и процент неперфузированных синусоидов ($32 \pm 4\%$). На биохимических анализах крови повысилась активность АсАТ и АлАТ до $3902 \pm 1028 \text{ ед/л}$ и $1372 \pm 504 \text{ ед/л}$, соответственно.

В основной группе, в которой до реперфузии применяли лечение с ALR, микроциркуляторные нарушения выглядели намного мягче, а интенсивность кровообращения заметно отличалась от ситуации в печени мышей из контрольной группы. При вычислении интенсивности синусоидального кровообращения, выяснилось, что процент неперфузированных синусоидов равен $22 \pm 4\%$ и статистически достоверно отличается от показателя в группе, где предварительного лечения не проводилось. Активность АсАТ и АлАТ была соответственно на 50% и 28% ниже по сравнению с показателями в контрольной группе.

На рисунке 3, чётко визуализируется эффективное влияние препарата ALR на печёночную микроциркуляцию. В контрольной группе постсинусоидальные вены забиты микротромбами, отток крови к центральным венам почти блокирован, что отражается как стаз крови и отёк паренхимы, появление мёртвых зон. На рисунке 3а, где показана печень мышей из основной группы, на фоне частично забитых сосудов наблюдается удовлетворительный кровоток в микроциркуляторном русле.

Анализ полученных данных показал благоприятное воздействие предварительного лечения с ALR на процесс восстановления нарушенного печёночного кровотока и на функциональную активность печени после ишемии и реперфузии. Наше исследование *in vivo* доказало, что ALR имеет потенциал в борьбе с реперфузионным повреждением печени и открывает широкие перспективы для изучения других положительных эффектов данного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байрамов Н.Ю. Осложнения резекции печени / Н.Ю.Байрамов // *Анналы хирургической гепатологии*. - 2000. - Т. 5. №1. - С. 14-18
2. Основные осложнения обширных резекций печени и пути их предупреждения / В.Д.Фёдоров, В.А.Вишневский, Н.А.Назаренко, Р.З.Икрамов, И.А.Козырин // *Бюллетень сибирской медицины*. - 2007. - №3. - С. 16-21
3. Дементьева И.И. Некоторые аспекты свободнорадикального повреждения трансплантированной печени / И.И.Дементьева [и др.] // *Пат. физиология и эксперим. терапия*. - 2001. - №3. - С. 23-25
4. Ходосовский М.Н. Морфофункциональное состояние печени при ишемии реперфузии / М.Н.Ходосовский, Р.Е.Лис, В.В.Зинчук // *Вести НАН Беларуси сер. мед.-биол. науки*. - 2003. - №1. - С. 17-20
5. Brigitte V. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair / V.Brigitte, M.Menger // *Physiol Rev*. - 2009; 89: p.1269-1339
6. Ramsay M. The Reperfusion Syndrome: Have We Made Any Progress? / M.Ramsay // *Liver Transplantation*. - 2008; 14: p.412-414
7. Khandoga A. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver *in vivo* / A. Khandoga [et al.] // *Shock* 2002; 18: p. 529-535
8. Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion *in vivo*: a systematic analysis / A.Khandoga, P.Biberthaler, K.Messmer, F.Krombach // *Microvasc Res*. - 2003; 65: p.71-77
9. McJunkin R. Homologous liver as a stimulus to hepatic regeneration / R.McJunkin, H.Breuhaus // *Archs Path*. - 1931; 12: p.900-908
10. LaBrecque D.R. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (SS) from rat liver / D.R.LaBrecque, L.A.Pesch // *J. Physiol*. - 1975; 248: p.273-284
11. Francavilla A. Extraction and partial purification of a hepatic stimulatory substances in rats, mice and dogs / A.Francavilla [et al.] // *Cancer Research*. - 1987; 47: p.5600-5605



Summary

Effects of amplifier liver regeneration on the currency in vivo reperfusion injury

E. Iskenderov, A. Kandoga, K. Mende

*Research Centre of Surgery named after academician. M.A.Topchibashev, Baku, Azerbaijan;
University Hospital Grosshadern, Munich, Germany*

Microcirculation disturbance is the main target in liver lesion in reperfusion injury. Authors studied the efficacy of ALR on sinusoidal perfusion.

The studies were conducted in mice type C57BL / 6 mice weighing 18-25 grams, in experimental conditions. Experimental animals divided into 3 groups of 6 animals each. In the first (main) group a model lobar warm ischemia is created. After 90 minutes of ischemia, 100 µg ALR was administered to animal, followed by a reperfusion. In the second group instead ALR warm saline was administered, and the third group only laparotomy was made. The main group of microcirculatory disorders were much easier, and intensity of blood flow was markedly different from that in the liver of mice of control group.

In calculation of sinusoidal blood flow intensity, it was found that the percentage of non-perfusional sinusoids is $22 \pm 4\%$ and was significantly different from the rate in the group where preliminary treatment was not given. On blood chemistry AST and ALT activity was respectively 50% and 28% lower compared with the control group.

The results showed a beneficial effect on recovery ALR impaired hepatic blood flow and the functional activity of liver after ischemia and reperfusion.

Key words: liver, transplantation, reperfusion injury, microcirculation, sinusoidal perfusion

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Кандога А. – доктор медицины Центра трансплантации и хирургии печени Университетской клиники Гроссхадерн; Мюнхен, Германия
E-mail: akhandoga@med.uni-muenchen.de