Возможности криодеструкции в лечении цирроза печени

Альперович Б.И., Орлов А.В., Киселева Ю.В.

Resources of cryodestruction in the treatment of hepatocirrhosis

Alperovich B.I., Orlov A.V., Kiselyova Yu.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Альперович Б.И., Орлов А.В., Киселева Ю.В.

Цель настоящего исследования — оценка влияния криодеструкции печени на течение хронического гепатита и цирроза. Экспериментальная часть исследования выполнена на 220 белых беспородных крысах с токсическим циррозом печени, вызванным четыреххлористым углеродом. Оценка состояния печеночной паренхимы проводилась по следующим критериям: коэффициент нормализации паренхимы, коэффициент склеротизации. Сравнение данных показателей в основной группе с показателями контрольной группы выявило явную положительную динамику в плане нормализации гистологической структуры печени.

Ключевые слова: цирроз печени, криодеструкция, криохирургия.

The aim of investigation was to evaluate the liver cryodestruction effect on the course of chronic hepatitis and hepatocirrhosis. Experimental part of the investigation has been fulfilled on 220 white mongrel rats with toxic hepatocirrhosis caused by carbon tetrachloride. Evaluation of hepatic parenchyma state has been done by the following criteria: factor of parenchyma normalization and factor of sclerotization. The comparison of these factors in the basic and control groups has revealed an evident positive dynamics in normalization of histological hepatic structure.

Key words: hepatocirrhosis, cryodestruction, cryosurgery.

УДК 616.36–004:615.832.9

Введение

Лечение хронических гепатитов и циррозов печени до сих пор остается актуальной проблемой хирургической гастроэнтерологии. Стоит отметить не только медицинскую, но и социальную значимость этой патологии. Помимо высокой заболеваемости и смертности, хронические диффузные заболевания печени приводят к существенным экономическим потерям, связанным с лечением, реабилитацией и поддерживающей терапией данной категории больных, что вызывает озабоченность во многих экономически развитых странах мира. Достаточно сказать, что, по данным ВОЗ, в разных странах вирусными гепатитами инфицированы или перенесли заболевание в прошлом около 2 млрд человек. В настоящее время в мире насчитывается около 300 млн носителей вируса гепатита В (HBV) (из которых 3 млн страдают хроническим гепатитом) и более 500 млн — вируса гепатита С (HCV) [17]. От последствий возникшего хронического гепатита

умирают 40% носителей HBV. Каждый год в мире около 1 млн человек умирают от рака печени, индуцированного HBV.

Среди хронических заболеваний печени хронический гепатит, индуцированный HCV, стоит на первом месте и составляет 40–60%. Опасность вирусного гепатита С заключается в том, что он является причиной 70% регистрируемых в мире случаев хронического гепатита, 40% случаев цирроза и 60% случаев рака печени. Еще большую озабоченность вызывает тот факт, что большинство больных хроническим гепатитом и циррозом печени относятся к возрастной группе 30–40 лет, представляющей наиболее трудоспособный возраст [12]. Исторически сложилось так, что лечением данной категории больных занимались преимущественно терапевты. Это и неудивительно, поскольку довольно долгое время бытовало мнение о нецелесообразности и опасности проведения каких-либо оперативных вмешательств на пораженной печени. В связи с

этим хирургическая помощь таким больным оказывалась лишь в случае развития осложнений (портальной гипертензии, асцита, кровотечения из верхних отделов желудочно-кишечного тракта). Хирургическое лечение хронических гепатитов и циррозов печени — относительно молодой метод. История развития хирургических методов лечения ведет отсчет с середины XX в., когда активно стали применяться органоанастомозы, спленэктомия, наложение портокавальных анастомозов, денервация общей печеночной артерии, дренирующие операции. Разнообразие методов технического исполнения, показаний к той или иной операции привело к тому, что в настоящее время существует более 200 видов оперативных вмешательств, применяемых при этой патологии [6]. Такое обилие оперативных пособий является следствием неудовлетворенности хирургов результатами хирургического лечения. С того же времени встала проблема выбора показаний к операции. Актуальность этой проблемы является очевидной, так как она не решена до настоящего времени. По Б.А. Королеву [6], большое количество предложенных операций, их недостаточная клиническая проверка и оценка различными авторами с позиций единой классификации цирроза печени не создают пока предпосылок к установлению общих принципов хирургического лечения цирроза печени и его осложнений. Многообразие видов цирроза печени, производство операций в различных стадиях заболевания, многочисленные варианты расстройства портального кровообращения исключают применение стандартных операций. Отсутствие удовлетворенности результатами хирургического лечения данной категории больных связано, прежде всего, с патогенетической необоснованностью большой группы операций. Цирроз печени рассматривается сегодня как неуклонно прогрессирующее заболевание. Из этого следует, что закономерным исходом болезни будет развитие серьезных, зачастую смертельных осложнений. Симптоматический характер большинства применяющихся операций ни в коей мере не может остановить и даже замедлить этот процесс. С появлением эффективных противовирусных препаратов терапевтические методы лечения вышли

на качественно более высокий уровень развития. Это позволило уменьшить интенсивность некротических процессов в печени и в конечном счете стабилизировать процесс ее склеротической перестройки. Но, к сожалению, на уже развившиеся изменения в печени данная группа препаратов не оказывает какого-либо влияния.

Возможное решение данной проблемы было предложено еще в конце XIX в. Русский ученый В.В. Подвысоцкий [11] в серии опытов установил, что даже после резекции 70—75% нормальной печени возможно ее полное восстановление. Этим была доказана принципиальная возможность регенерации печени. Примерно через 50 лет опыт В.В. Подвысоцкого был повторен рядом зарубежных и отечественных ученых, но уже для цирротически измененной печени [4, 8, 9, 13, 15, 16]. Экспериментальные исследования показали принципиальную возможность ее восстановления после резекции различных объемов. С этого времени хирургия цирроза печени получила качественно новый толчок к развитию. Научно доказанная возможность восстановления структуры и, как следствие, функции органа после ее резекции дала толчок к поиску новых методов хирургического лечения цирроза печени. Одним из таких методов является криодеструкция, обладающая рядом преимуществ по сравнению с резекцией (простота выполнения, меньшая травматичность и риск развития интра- и послеоперационных осложнений).

Материал и методы

Оценка влияния криодеструкции на течение цирроза печени выполнена на лабораторных животных (крысах), которые находились в стандартных условиях содержания в виварии при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Вся экспериментальная часть работы проведена в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1978 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных». Формирование хронического гепатита и цирроза печени проведено на 220 белых беспородных крысах обоего пола массой от 110 до 350 г. За основу взята модель токсического поражения печени органическим гепа-

тотропным ядом — четыреххлористым углеродом. Данный способ получения хронических диффузных заболеваний печени известен давно и хорошо описан в литературе, посвященной экспериментальным исследованиям [5]. Четыреххлористый углерод оказывает прямое цитолитическое воздействие на печеночную паренхиму. Раствор четыреххлористого углерода готовили из чистого (99,99% чистоты) препарата путем добавления рафинированного подсолнечного масла. Конечная концентрация раствора составляла 50%. Введение осуществляли через зонд *per os* 2 раза в неделю на протяжении 2,5 мес.

Контроль формирования цирроза печени осуществлялся путем пробной лапаротомии с биопсией. За весь период затравки из 220 животных от острой печеночной недостаточности умерло 60 (смертность 27,3%). Оставшиеся 160 крыс были разделены на 2 группы: основную ($n = 120$), которая подверглась криохирургическому лечению, и контрольную ($n = 40$), у которой проводилось только динамическое наблюдение с периодическими биопсиями. Биопсия печени 30 интактных животных служила контролем развивающегося хронического гепатита и цирроза печени. В параллельно исследуемых группах животные имели одинаковый возраст и массу тела, контролируемую еженедельным взвешиванием.

Основная группа крыс подвергалась криохирургическому лечению. Под эфирным масочным наркозом выполнялась лапаротомия. В операционную рану последовательно выводились все четыре доли печени. Криовоздействие осуществлялось с помощью криодеструктора, разработанного в клинике для лапароскопических операций. Диаметр рабочего конца криодеструктора — 10 мм, температура по выходу на режим -196°C , температура на печени -170°C . Криодеструкция боковых долей (левой и правой) производилась из трех точек, центральной доли (обоих лопастей) — из двух. Время экспозиции составляло 10 с. Брюшная полость проверялась на гемостаз и инородные тела, послойно ушивалась. В дальнейшем у животных основной группы оценивалась динамика морфологических изменений на 3, 14, 30, 60, 90-е сут. У контрольной — на 30, 60, 90-е сут. Для этого под эфирным наркозом вновь

выполнялась лапаротомия и бралась биопсия печени (кусочки размером от 0,3 до 0,7 см). По окончании эксперимента животные выводились из опыта путем усыпления в эфире. Биоптаты печени фиксировали в растворе 10%-го нейтрального формалина в течение 72 ч. Критерием достаточной фиксации кусочков являлись равномерное уплотнение объекта и одинаковый вид его как с поверхности, так и на контрольном срезе. Обезжизвование кусочков проводилось по стандартной методике путем пропускания их в спиртах возрастающей крепости, начиная с 50° и кончая абсолютным спиртом. В последующем кусочки заливались в парафин и срезались на санном микротоме, при этом толщина срезов колебалась

от 5 до 7 мкм. Приготовленные препараты окрашивались комбинированными красками двумя способами: гематоксилином и эозином и по Ван-Гизону. Гематоксилин и эозин использовались для обзорных исследований грубых морфологических исследований (состояние, форма и размеры ядра, цитоплазмы, клеточная инфильтрация). Окраска по Ван-Гизону — для качественной и количественной оценки состояния соединительной ткани. После выполнения криодеструкции печени как в ближайшем (до 3 сут), так и в отдаленном послеоперационном периоде не было обнаружено каких-либо осложнений (кровотечение, некроз печени, гнойники брюшной полости). Послеоперационная летальность отсутствовала.

В качестве гистологических критериев оценки состояния печеночной паренхимы использовались коэффициент нормализации паренхимы (КНП) и коэффициент склеротизации (КС). Кроме того, оценивалось наличие или отсутствие митозов. Подсчет по всем критериям осуществлялся количественными методами в группе интактных животных, в основной и контрольной группах, что позволило провести статистическую обработку полученных материалов. Для этого использовались методы непараметрической статистики с применением критерия Манна—Уитни. Различия считались достоверными (статистически значимыми) при уровне значимости $p \leq 0,05$.

КНП является одним из важнейших критериев в морфологической оценке состояния печени, поскольку позволяет оценить интенсивность дистрофических и некробиотических изменений в печени на основе отношения количества нормальных гепатоцитов к дегенерирующим [16]. К нормальным гепатоцитам относили полигональные клетки, имеющие ядро округлой или овальной формы, хорошо структурированное, с четко выраженными ядрышками, а также неповрежденную клеточную мембрану, достаточное количество белка в цитоплазме. Дегенерирующими признавались гепатоциты с характерными изменениями ядер — кариопикнозом, кариолизисом, кариорексисом и явлениями дистрофии (гидропической, баллонной). Абсолютное число клеток (нормальных, дистрофических) подсчитывалось в 30 полях зрения препарата под микроскопом при 400-кратном увеличении.

Количественная оценка соединительной ткани печени нашла свое отражение в склеротическом индексе (коэффициенте склеротизации). КС представляет собой отношение количества соединительной ткани печени (стромы) к ее паренхиме.

Подсчет КС проводился методом точечного счета. Для этого использовалась окулярная измерительная сетка по Г.Г. Автандилову для цитогистостереометрических исследований [1, 2]. Сущность метода заключается в том, что измерение длины отрезков так же, как и измерение площадей ультраструктур, заменяется дифференцированным подсчетом числа точек тест-системы, соответствующих изучаемым классам анализируемых структур. Если множество точек распределено случайно, но равномерно по всей площади среза ткани, содержащей изучаемый компонент в объеме V_v , то часть точек, приходящихся на исследуемые структуры, также будет равна V_v . Это положение вытекает из принципов теории вероятности [2].

Клинически методика криодеструкции для лечения цирроза печени применена на базе зонального гепатологического центра (г. Томск). Операция выполнена у трех больных (двух женщин и одного мужчины). Возраст пациентов от 50 до 62 лет. Продолжительность заболевания (от момента поста-

новки диагноза цирроза печени до операции) составила от 9 мес до 2 лет. У всех больных получено морфологическое подтверждение диагноза.

Результаты и обсуждение

Для нормальной печени получены следующие величины коэффициентов: КС — $0,06 \pm 0,001$, КНП — $4,58 \pm 0,01$.

В исходном состоянии печени (экспериментальный цирроз) отмечалось резко выраженное нарушение citoархитектоники органа с потерей радиарной ориентации печеночных балок. Прослойки высокодифференцированной соединительной ткани в виде широких тяжей окружали ложные дольки, лишенные центральных вен. При этом наблюдался процесс перестройки сосудистого бассейна печени в виде возникновения внутripеченочных порто-кавальных шунтов. Центральные вены в результате деструкции части дольки и разрастания на ее месте соединительной ткани оказались расположенными в последней. Множественные широкие порто-портальные и порто-центральные септы густо инфильтрированы лимфоидными и гистиоцитарными элементами (рис. 1).

Коэффициент склеротизации составил $0,18 \pm 0,01$. Узелки различных размеров состояли из полиморфных гепатоцитов, одни из которых увеличены в размерах с крупными гиперхромными ядрами, другие уменьшены, с пикнотичными ядрами и выраженными дистрофическими и некробиотическими изменениями. КНП на этом этапе соответствовал $1,07 \pm 0,01$ (уровень значимости $p < 0,001$ по отношению к нормальной печени).

Рис. 1. Микропрепарат печени крысы. Экспериментальный цирроз. Широкие прослойки соединительной ткани, окружаю-

щие

дольки. Окраска по Ван-Гизону. Ув. 100

ложные

На третьи сутки после криодеструкции в основной группе отмечено некоторое снижение показателя КНП. Это связано с дополнительным травмирующим воздействием холода на печеночную паренхиму. КС в этот период остается без изменений ($0,18 \pm 0,01$). Совершенно очевидно, что через 3 сут после начала лечения он и не мог существенно измениться. В этот период в большинстве препаратов встречаются фигуры митозов (рис. 2).

Рис. 2. Микропрепарат печени крысы. 3 сут после криодеструкции. Митозы. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 400

На 14-е сут после стимуляции репаративной регенерации путем криодеструкции отмечалось значительное увеличение количества гипертрофированных гепатоцитов по сравнению с первоначальным. Несколько уменьшилась интенсивность воспалительной инфильтрации соединительно-тканых септ и количество дистрофически измененных гепатоцитов. Прилежащие к фиброзной ткани гепатоциты представлены мелкими клетками с базофильной цитоплазмой и ядром, богатым хроматином. В соединительной ткани к 14-м сут опыта начинаются процессы васкуляризации, что выражается в увеличении количества мелких новообразованных сосудов, однако относительное количество ее все еще оставалось довольно высоким.

К 30-м сут опыта в некоторых участках печени по периферии долек устанавливаются практически нормальные паренхиматозно-стромальные отношения. Вновь устанавливаются контакты между гепатоцитами и венозными сосудами системы оттока. Между печеночными пластинками

видны синусоидные капилляры, в стенках которых определяются клетки Купфера. Соотношение стромы и паренхимы смещается в сторону последней.

На стадии 90 сут после криодеструкции происходит интенсивный процесс замещения соединительно-тканых прослоек разрастающимися гепатоцитами, и в большей части печеночной ткани происходит нормализация цитоархитектоники (рис. 3).

Рис. 3. Микропрепарат печени крысы. 90 сут после криодеструкции. Радиарная ориентация печеночных балок. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 100

КС значительно уменьшился по сравнению с исходным уровнем и составил $0,064 \pm 0,002$. Вновь установились контакты между гепатоцитами и венозными сосудами системы оттока. Значительно снизилась интенсивность воспалительной инфильтрации портальных трактов. Гепатоциты не имели признаков жировой и белковой дистрофии. КНП увеличился и приблизился к нормальному — $4,43 \pm 0,02$ ($p < 0,05$ по отношению к контролю). На этом этапе сохраняется большое количество гипертрофированных гепатоцитов с большими ядрами.

В контрольной группе крыс, у которых не проводилась криодеструкция, через три месяца наблюдалась незначительная положительная динамика. Процесс нормализации паренхиматозно-стромальных отношений происходил значительно медленнее. Интенсивность воспалительной инфильтрации соединительно-тканых прослоек несколько уменьшилась. КС уменьшился до $0,15 \pm 0,002$. Сохранялся умеренный полиморфизм и гипертрофия печеночных клеток. Дистрофические изменения их значительно умень-

шились по сравнению с исходной картиной. КНП в этой группе составил $2,6 \pm 0,02$, что почти в 1,7 раза меньше этого показателя в группе, где проводилась стимуляция регенерации печеночной ткани путем криодеструкции. Сохранялось большое количество ложных долек (рис. 4).

Рис. 4. Микропрепарат печени крысы. Группа контроля через 90 сут. Узкие порто-центральные фиброзные септы. Окраска по Ван-Гизону. Ув. 100

Сравнение показателей КС и КНП в группе животных, подвергнутых лечению, с показателями контрольной группы статистически достоверно доказало положительное влияние криодеструкции печени на течение цирроза. Особый интерес представляет тот факт, что отмечается не просто уменьшение объемной доли соединительной ткани, но и восстановление нормальной citoархитектоники печени. Увеличение же количества нормальных гепатоцитов (КНП приближается к норме) позволяет судить о повышении функциональной активности органа. До настоящего времени некоторые авторы полагают, что такие высокодифференцированные клетки, каковыми являются гепатоциты, регенерируют большей частью за счет компенсаторной гипертрофии [7, 10, 14, 18], а митоз как наиболее распространенный способ репродукции клетки [3] чрезвычайно редкое явление для печени. Действительно, резкий рост числа гипертрофированных гепатоцитов через 3 мес после криодеструкции дает основание говорить о важной роли регенерационной гипертрофии в восстановлении печени. Однако обнаружение большого количества митозов в ранние сроки (преимущественно до 3 сут) дает представление о немаловажной роли митотической активности печени в ее восстановлении.

Полученные экспериментальные данные позволили нам применить методику криодеструкции печени в клинических условиях. Были оперированы 3 больных с циррозом печени вирусной этиологии. Вирусная природа поражения печени была подтверждена иммунологическими методами. У двоих больных процесс расценен как компенсация, у одной пациентки — как декомпенсация по сосудистому типу (портальная гипертензия, асцит). После поступления в стационар больные подвергались тщательному обследованию, которое было направлено на решение следующих задач:

- 1) выяснение характера (природы) диффузного хронического поражения печени (вирусная, токсическая);
- 2) определение тяжести поражения печени, стадии процесса;
- 3) оценка функционального состояния печени;
- 4) оценка показаний и противопоказаний к операции.

Для решения поставленных задач применялось комплексное обследование больных, включающее в себя: а) общеклинические методы (сбор жалоб, анамнеза заболевания, физикальное обследование); б) лабораторные методы (биохимический и общий анализы крови, мочи, определение природы поражения (если подозревалась вирусная этиология цирроза) печени иммунологическими методами, включая использование полимеразной цепной реакции, гистологическое исследование операционного материала; в) инструментальные методы обследования (ультразвуковое обследование органов брюшной полости с обязательным исследованием сосудистой системы печени, включающее применение доплерографии для регистрации и оценки объемного кровотока по общей печеночной артерии и воротной вене, эзофагогастродуоденоскопия).

После оценки полученных данных проводилась коррекция обнаруженных отклонений (анемии, свертывающей системы крови, асцита). Процесс подготовки к операции занимал в среднем 7—10 сут. Больные оперировались по стабилизации состояния.

Методика оперативного вмешательства.
Под эндотрахеальным наркозом выполнялась

лапаротомия, ревизия. Оценивалось состояние печени. Бралась биопсия. После этого выполнялась криодеструкция обеих долей печени криодеструктором, разработанным в клинике (патент РФ 2189795), из 8—10 точек с экспозицией 30 с. Брюшная полость ушивалась наглухо.

Послеоперационный период у всех больных протекал без осложнений. Отдаленные результаты прослежены у одной больной в течение 1 года. Контрольное комплексное исследование, включающее ультразвуковое исследование печени и ее сосудистой системы, не обнаружило отклонений от нормы. У больной, поступившей с асцитом, при выписке и в отдаленном послеоперационном периоде асцита обнаружено не было.

Выводы

Криодеструкция печени у больных с циррозом является эффективным патогенетически обоснованным методом лечения.

Литература

1. *Автандилов Г.Г.* Введение в количественную и патологическую морфологию. М.: Медицина, 1980. 216 с.
2. *Автандилов Г.Г.* Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с.
3. *Алов И.А.* Цитофизиология и патология митоза. М.: Медицина, 1972. 264 с.
4. *Алымов В.А.* Экспериментальное изучение некоторых вопросов хирургического лечения циррозов печени: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Горький, 1969. 16 с.
5. *Гальперин Э.И.* Получение цирроза печени и асцита

- в эксперименте // Эксперим. хирургия. 1960. < 1. С. 46—49.
6. *Королев Б.А., Гагушин В.А.* Хирургия циррозов печени. М.: Медицина, 1973. 159 с.
7. *Леоэзер Л.Д.* Основные проблемы учения о регенерации. М.: Медицина, 1975. 101 с.
8. *Моносзон И.А.* Изучение репаративной регенерации и обратимости патологического состояния цирротически измененной печени крыс при разной степени развития цирроза после различных объемов резекции печени: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Горький, 1968. 24 с.
9. *Нарциссов Т.В.* Резекция печени при циррозе // Хирургия. 1973. < 5. С. 79—84.
10. *Пальцын А.А.* Электронно-автордиографическое изучение ядерно-цитоплазматических отношений при репаративной регенерации: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1975. 22 с.
11. *Подвысоцкий В.В.* Возрождение печеночной ткани у млекопитающих животных. Киев, 1886. 86 с.
12. *Подымова С.Д.* Болезни печени. М.: Медицина, 1993. 539 с.
13. *Пышкин С.А., Малышев Ю.И., Димов П.Г.* Показания к хирургическому лечению хронического гепатита и цирроза печени // Клиническая хирургия. 1986. < 9. С. 29—32.
14. *Саркисов Д.С.* Регенерация и ее клиническое значение. М.: Медицина, 1970. 284 с.
15. *Солопаев Б.П.* Биология и медицина (проблема восстановления органов и тканей). М.: Знание, 1964. 31 с.
16. *Солопаева И.М.* Стимуляция регенерации нормальной и патологически измененной печени: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Горький, 1969. 32 с.
17. *Хазанов А.И.* Современные проблемы хронических вирусных заболеваний // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии. 1993. < 2. С. 11—15.
18. *Яшина И.Н.* О различиях в ходе регенерации после однократной и повторной частичной гепатэктомии у крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 1971. 21 с.

Поступила в редакцию 08.12.2003 г.