

На правах рукописи

Сохарев Анатолий Сергеевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
КОМБИНИРОВАННОГО РАСТВОРА ПРИ КОНСЕРВАЦИИ
ПЕЧЕНОЧНОГО ЭКСПЛАНТАТА**

14.01.17 – хирургия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук, доцент

Краснов Константин Аркадьевич

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Шутов Владимир Юрьевич

(Западно-Сибирский медицинский центр Федерального медико-биологического агентства, директор, г. Омск)

кандидат медицинских наук

Фомичев Алексей Вячеславович

(Сибирский федеральный биомедицинский исследовательский центр имени академика Е. Н. Мешалкина, Центр хирургии аорты, коронарных и периферических артерий, врач сердечно-сосудистый хирург, научный сотрудник)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.03, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; тел/факс (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://www.ngmu.ru/dissertation/410>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

М. Н. Чеканов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. Трансплантация печени в настоящее время является «золотым стандартом» при лечении терминальных стадий заболеваний печени независимо от этиологии (Готье С. В. с соавт., 2008; Abdeldayem H. et al., 2016; Jadlowiec C. C. et al., 2016). Количество «удачных» трансплантаций печени связано с качеством трансплантата, его функциональностью (Мойсюк Я. Г., 1992; Филин А. В. 2008; Kosieradzki M., 2011). Ишемическое повреждение (ИП) неизбежно при трансплантации печени и является причиной наиболее тяжёлых осложнений после трансплантации (ранняя дисфункция трансплантата, первично нефункционирующий трансплантат) (Шумаков В. И., 2006; Abu-Amara M. et al., 2010; Peng N. et al., 2016). Наиболее важную роль в патогенезе ИП играет оксидативный стресс, обусловленный дисбалансом продукции и инактивацией активных форм кислорода (АФК) (Abe Y. et al., 2009; Boga S. et al., 2016; Michel S. G. et al., 2016,). По данным литературы, проблема противоишемической защиты печеночного трансплантата далека от своего окончательного решения, поэтому представляется высоко актуальным разработка современных методов медикаментозного воздействия, позволяющих эффективно нивелировать фатальное воздействие АФК на донорский орган (Багненко С. Ф. с соавт., 2009; Lee D. D. et al., 2016; Neves D. B. et al., 2016; Wang L. et al., 2017).

Степень разработанности темы диссертации. Существенный вклад в изучение проблемы ишемического повреждения печеночного трансплантата внесли С. В. Готье, О. М. Цирульникова, Я. Г. Мойсюк, Л. В. Шкалова, M. Bilzer, L. H. Toledo-Pereyra, C. Fondevila и др.

Авторами изучен патогенез ишемического повреждения печеночного трансплантата при пересадке, определены критерии оценки тяжести, разработан протокол патоморфологической оценки. В настоящее время, по данным литературы, отсутствует экспериментальная модель, адаптированная к клиническим условиям, для оценки тяжести ишемического повреждения. Большинство противоишемических препаратов в клинических исследованиях

не применялись, находятся в стадии разработки или не имеют доказательной базы. Отечественная и зарубежная литература не содержит информации о применении неоксигенированной эмульсии перфторорганических соединений для профилактики ИП при консервации печеночного трансплантата.

С учетом выше изложенного разработка экспериментальной модели для оценки ишемического повреждения печеночного трансплантата и применение фармакологического прекондиционирования является актуальной и перспективной задачей исследования.

Цель исследования. Снизить ишемическое повреждение печеночного трансплантата после длительной консервации в условиях хирургического эксперимента.

Задачи исследования

1. Разработать модель хирургического эксперимента для оценки ишемического повреждения при консервации печеночного трансплантата.

2. Провести экспериментальное исследование и оценить характер ишемического повреждения печеночного трансплантата при консервации в неоксигенированной эмульсии перфторорганических соединений.

3. Провести экспериментальное исследование и оценить характер ишемического повреждения печеночного трансплантата при консервации в комбинированном консервирующем растворе.

4. Оценить и сравнить полученные данные при различных способах консервации.

Научная новизна исследования. Впервые разработана модель эксперимента для оценки ишемического повреждения трансплантата.

Разработан собственный комбинированный консервирующий раствор (НТК и неоксигенированная ЭПФОС в соотношении 4 : 1), патент на изобретение № 2482674.

Установлено, что применение неоксигенированной ЭПФОС в условиях ишемии позволяет, ввиду высокой тропности к кислороду, акцептировать и нейтрализовать АФК, что позволяет снизить ишемическое повреждение в

органах и тканях.

Впервые доказано, что применение комбинированного консервирующего раствора позволяет уменьшить ишемическое повреждение, улучшить качество и функциональность эксплантата (трансплантата).

Теоретическая и практическая значимость работы. Применение комбинированного консервирующего раствора позволяет профилактировать ИП в печеночном эксплантате путем поглощения АФК молекулами ЭПФОС и, тем самым, предотвращая повреждение органа и тканей. Патогенетически обоснован выбор комбинированного консервирующего раствора для улучшения качества и снижения риска развития первичной дисфункции органа для применения в клинической трансплантологии.

Методология и методы исследования. Исследование носит экспериментальный характер. Объект исследования – печеночный эксплантат, не подвергающийся трансплантации. Предмет исследования – экспериментальная оценка эффективности противоишемической защиты печеночного эксплантата во время эксплантации и консервации с применением различных консервирующих растворов. Для решения поставленных задач использовали объективное наблюдение за изъятим органом, биохимические, гистологические и патоморфологические методы оценки ИП в печеночном эксплантате. Достоверность полученных данных подтверждена методами математической статистики.

Положения, выносимые на защиту

1. Неоксигенированная эмульсия перфторорганических соединений при добавлении в стандартный консервирующий раствор в эксперименте обладает высокой противоишемической активностью.

2. Комбинированный консервирующий раствор (НТК и неоксигенированная ЭПФОС в соотношении 4 : 1) в эксперименте по сравнению с другими исследуемыми консервирующими растворами статистически значимо уменьшает биохимические и патоморфологические изменения в печеночном эксплантате после 8-часовой консервации.

Степень достоверности результатов. Все научные положения и выводы обоснованы применением системного анализа, современных методов исследования, достоверным объемом фактического материала ($n = 60$), который подвергнут статистическому анализу. Результаты исследования можно считать достоверными с учетом достаточной выборки обследованных (3 группы исследуемых животных по 20 особей в каждой) и использованием корректных методов статистической обработки полученных данных.

Апробация работы. Основные результаты исследования и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Проблемы медицины и биологии», посвященной 70-летию Кемеровской области (Кемерово, 2013), на 11-й городской научно-практической конференции «Актуальные вопросы муниципального здравоохранения», посвященной 100-летию здравоохранения города Кемерово (Кемерово, 2013), на межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 55-летию кафедры и клиники госпитальной хирургии КемГМА, базирующейся в МБУЗ «ГКБ № 3 им. М. А. Подгорбунского» и 60-летию Кемеровской государственной медицинской академии (Кемерово, 2015), на 23-м международном конгрессе ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ «Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии» (Минск, 2016).

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России (Кемерово, 2017).

Диссертация выполнена в соответствии с темой научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Минздрава России, номер государственной регистрации 01200506553.

Внедрение результатов исследования в практику. Основные результаты исследования используются в научном и учебном процессах на кафедре

госпитальной хирургии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Основные положения и разработки планируется внедрить в работу хирургического отделения № 2 (Кузбасский областной гепатологический центр) ГАУЗ КО ОКБСМП им. М. А. Подгорбунского, г. Кемерово.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 1 патент на изобретение и 3 статьи в журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 210 источниками, из которых 188 – в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 16 таблиц и 16 рисунков.

Личный вклад автора. Проведение экспериментальной модели и разработка дизайна исследования, анализ и обобщение данных литературы по теме диссертации, сбор, регистрация и систематизация, а также статистическая обработка полученных результатов, оформление и подготовка к публикациям статей по тематике исследования, написание диссертационной работы выполнены лично автором.

Автор благодарен д. м. н. В.Н. Дроботову за идею экспериментального исследования. Хочется особо поблагодарить научного руководителя к. м. н., доцента К. А. Краснова и д. м. н., профессора А. В. Будаева за поддержку и неоценимую помощь при проведении экспериментальных исследований и обсуждение полученных результатов. Автор благодарен д. м. н., профессору В. И. Подолужному за помощь на начальном этапе работы. Автор искренне признателен к. м. н. А. А. Шрайберу, О. А. Калишу,

А. В. Иванову за помощь при обработке и оценке патоморфологического материала, а также О. Г. Буниной, А. С. Салаховой за помощь при проведении лабораторных исследований. Искренняя благодарность к. т. н. Е. С. Каган за неоценимую помощь при обработке статистических данных исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика материала. Исследование одобрено локальным этическим комитетом Кемеровской государственной медицинской академии (протокол № 107к от 14.11.2012).

Исследования проведены на 60 кроликах самцах породы Шиншилла в возрасте 6–7 месяцев, массой $2000 \text{ г} \pm 150 \text{ г}$. Уход и содержание экспериментальных животных были стандартными в соответствии с требованиями приказов: Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев от 06.04.1973, № 1045-73, а также № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, № 267 МЗ РФ от 19.06. 2003.

Кролики разделены на 3 группы по 20 животных.

В *первой группе* консервация печени проводилась раствором НТК, оригинальное название «Кустодиол».

Во *второй группе* применялся комбинированный способ: раствор НТК, оригинальное название «Кустодиол», и неоксигенированная ЭПФОС, оригинальное название «Перфторан». Соотношение НТК и неоксигенированной ЭПФОС = 4 : 1. Данный расчет произведен из рекомендаций производителя: максимальная суточная доза перфторорганической эмульсии составляет 75 мл на кг массы тела, а расход раствора НТК должен составлять 300 мл на 1 кг массы тела донора на 1 пересадку.

В *третьей группе* консервация печени проводилась неоксигенированной ЭПФОС фирмы ОАО НПФ Перфторан (Россия), оригинальное название «Перфторан».

Оперативное вмешательство проводили в условиях асептической операционной стерильным инструментарием с соблюдением всех правил

асептики и антисептики.

Консервация артериальной крови кролика выполнялась препаратом Глюгидир. Консервированная кровь хранилась в холодильнике в течение 8 часов при температуре 4 °С.

Реперфузия проводилась при комнатной температуре в течение 60 минут подогретой на водяной бане до 37 °С кровью соответствующего кролика в воротную вену.

Экспериментальное исследование. Внутривенная анестезия, фиксация животного. Тотальная лапаротомия, с расширением вправо и влево. Ревизия брюшной полости для исключения внутрибрюшной патологии. Биопсия печени.

Выделялись брюшной отдел аорты (abdominal aorta), подпеченочный и надпеченочный отделы нижней полой вены (vena cava inferior), под сосуды проводились лигатуры. Выполнялась мобилизация печени путем пересечения связочного аппарата: круглой, треугольной, серповидной и венечной связок (ligamentum teres, triangular, falciforme, coronarium). Элементы печеночно-двенадцатиперстной связки взяты на держалки. В брюшную полость заложена ледяная стружка. Канюляция аорты для сбора крови. Канюляция воротной вены. Введение соответствующего группе консервирующего раствора в воротную вену. Лигирован надпеченочный отдел нижней полой вены. Для оттока перфузата канюлирован подпеченочный отдел нижней полой вены. Пересечены общая печеночная артерия и общий желчный проток. Эксплантация печени и помещение эксплантата в лоток со льдом. Отмывание эксплантата печени консервирующим раствором от форменных элементов. Консервация печени проводилась бесперфузионным методом в течение 8 часов при температуре 4–5 °С.

Реперфузия проводилась перфузионным насосом (дозатор) в течение 1 часа артериальной кровью соответствующего кролика (рисунок 1).

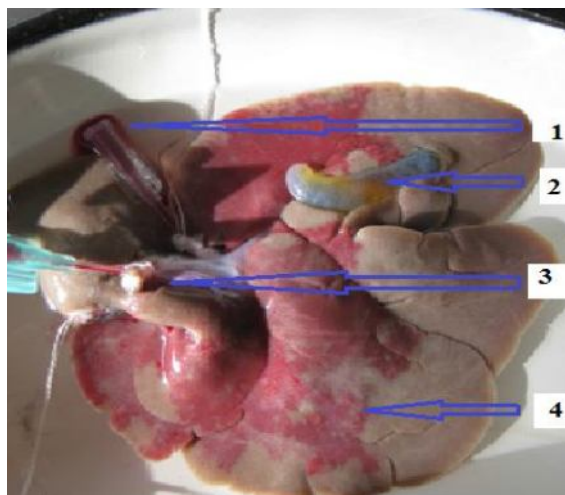


Рисунок 1 – Реперфузия печени (1 – канюля в подпеченочном отделе нижней полой вены для оттока реперфузионной крови; 2 – желчный пузырь; 3 – воротная вена с канюлей, проводится реперфузия; 4 – пуск кровотока)

После 60 минут реперфузии для гистологического исследования и морфометрии выполнялась биопсия эксплантата печени, для лабораторной диагностики бралась кровь из катетера подпеченочного отдела нижней полой вены.

Лабораторная диагностика, патоморфологическая оценка. С целью изучения биохимических показателей, системы гемостаза и общего анализа крови при эксплантации и после реперфузии бралась кровь из нижней полой вены.

Протокол патоморфологической оценки биоптатов печени основан на патогистологических критериях, выраженных в баллах. Учитывая изоморфизм, морфологические и функциональные отличия лабораторных животных – критерии патоморфологической оценки скорректированы и адаптированы.

При комплексном суммировании баллов определяются патоморфологические изменения эксплантата печени: сумма баллов от 0 до 10 – патология лёгкой степени, от 11 до 15 – средней степени и от 16 до 24 – тяжёлой степени (Галанкина И. Е., 2011; Шкалова Л. В., 2011).

Статистические методы оценки результатов. Обработка данных проводилась в программе STATISTICA 6.0, сетевая версия (правообладатель

лицензии – ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», номер лицензии – АХХR009E747530FAN25), для описательных статистик были рассчитаны средние значения, стандартное отклонение, ошибка среднего. Проверка нормальности распределения полученных данных проводилась визуальной оценкой графиков-гистограмм в модуле описательной статистики и с помощью критерия Шапиро – Уилка W . Полученные данные имеют ненормальное распределение. Для выявления различий в средних значениях признаков выполнялось попарное сравнение групп с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнение процентов осуществлялось с помощью углового преобразования Фишера, для выявления взаимосвязей строились таблицы сопряженности и применялся критерий Пирсона. Для оценки влияния консервирующего раствора на исследуемые показатели применялся однофазный дисперсионный анализ с повторными измерениями. В случаях множественного сравнения применена поправка Бонферрони. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. При множественных сравнениях с учетом поправки Бонферрони различия считались статистически значимыми при $p < 0,017$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для описательной статистики данных до консервации эксплантатов печени кроликов были рассчитаны в группах средние значения, стандартное отклонение, стандартная ошибка. С помощью критерия Манна – Уитни попарно сравнивались средние значения показателей в различных группах кроликов.

В таблице 1 представлены результаты сравнения с помощью критерия Манна – Уитни средних значений клинико-биохимических показателей в группах лабораторных животных до консервации.

Критерий Манна – Уитни показал, что по всем показателям статистически значимых различий в средних значениях показателей в сравниваемых группах эксплантатов печени кроликов до консервации не выявлено.

Таблица 1 – Результаты сравнения средних значений показателей в первой и во второй группах эксплантатов печени кроликов до консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе			Уровень значимости различий (p), $p < 0,017$		
	1	2	3	p 1–2	p 1–3	p 2–3
Билирубин общий, мкмоль/л	3,31	3,21	2,73	0,239323	0,239323	0,159544
Билирубин связанный, мкмоль/л	0,89	0,85	0,75	0,512848	0,512848	0,725100
Билирубин свободный, мкмоль/л	2,43	2,36	1,93	0,279250	0,279250	0,081031
Аспартатаминотрансфераза, U/L	52,09	51,84	55,48	0,481827	0,481827	0,180577
Аланинаминотрансфераза, U/L	59,6	58,48	58,62	0,635866	0,635866	0,818150
Щелочная фосфатаза, U/L	110,15	95,35	81,65	0,244458	0,244458	0,766046
Гаммаглутамилтрансфераза U/L	10,69	8,08	8,59	0,956835	0,956835	0,560852
Протромбиновый индекс, %	88,25	91,25	87,9	0,978362	0,978362	0,473481
АЧТВ, секунда	36,25	35,6	36,4	0,913317	0,913317	0,350703
Фибриноген, г/л	2,95	3	2,99	0,755086	0,755086	0,755743

Для описательной статистики данных после консервации эксплантатов печени кроликов были рассчитаны в группах средние значения, стандартное отклонение, стандартная ошибка.

В таблице 2 представлены результаты сравнения с помощью критерия Манна – Уитни средних значений клинико-биохимических показателей в группах после 8-часовой консервации эксплантатов печени кроликов.

Анализ результатов, представленных в таблице 2, позволяет сделать вывод о том, что во второй группе после 8-часовой консервации эксплантатов печени кролика по сравнению с первой и третьей группами статистически значимо ниже уровень общего билирубина, АСТ, АЛТ, ГГТ, ЩФ, АЧТВ и статистически значимо выше уровень фибриногена и ПТИ.

Таблица 2 – Результаты сравнения средних значений показателей в группах эксплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации

Показатель	Среднее значение показателя в группе			Уровень значимости различий (p), $p < 0,017$		
	1	2	3	p 1–2	p 1–3	p 2–3
Билирубин общий, мкмоль/л	5,81	5,44	6,31	0,002086	0,002100	0,000000
Билирубин связанный, мкмоль/л	1,33	1,28	1,55	0,4101610	0,002244	0,006086
Билирубин свободный, мкмоль/л	4,48	4,16	4,76	0,007515	0,067196	0,000015
Аспартатаминотрансфераза U/L	606,7 3	322,82	1040,1 5	0,000000	0,000000	0,000000
Аланинаминотрансфераза, U/L	614,1 7	277,6	978,1	0,000000	0,000000	0,000000
Щелочная фосфатаза, U/L	193,4	90,8	337,9	0,000006	0,000000	0,000000
Гаммаглутамилтрансфераза, U/L	40,85	25,8	63,9	0,000000	0,000000	0,000000
Протромбиновый индекс, %	62,8	74,7	39,6	0,000000	0,000000	0,000000
АЧТВ, секунда	53,6	45,35	56,55	0,000000	0,004530	0,000000
Фибриноген, г/л	1,66	2,32	1,39	0,000000	0,000245	0,000000

Патоморфологическая оценка. До консервации некроза гепатоцитов, деструктивных изменений центральных вен, деструктивных изменений межклеточного матрикса, отека и деструктивных изменений портальных трактов, деструктивных изменений артерий в биоптатах эксплантатов печени кроликов из всех 3 групп не наблюдались.

После 8-часовой консервации с помощью корреляционного анализа оценивалось влияние различных типов применяемых препаратов (НТК, НТК + неоксигенированная ЭПФОС, неоксигенированная ЭПФОС) на показатели морфометрии печеночных эксплантатов (биоптатов) кроликов, данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сопряженность, отражающая влияние применяемых консервантов в различных группах на патоморфологические критерии, в баллах

Патогистологические критерии	Баллы	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Уровень значимости различий (p)
Некроз гепатоцитов	1	1 (5 %)	17 (85 %)	1 (5 %)	1–2 (p = 0,000001) 2–3 (p = 0,000001)
$\chi^2 = 40,6$ (p = 0,000001)	2	14 (70 %)	3 (15 %)	8 (40 %)	1–2 (p = 0,0006)
	3	5 (25 %)	0 (0 %)	11 (55 %)	
Деструктивные изменения центральных вен	0	0 (0 %)	6 (30 %)	0 (0 %)	1–2 (p = 0,006); 2–3 (p = 0,006)
$\chi^2 = 38,4$ (p = 0,000001)	1	7 (35 %)	12 (60 %)	0 (0 %)	2–3 (p = 0,0001); 1–3 (p = 0,003)
	2	11 (55 %)	2 (10 %)	15 (75 %)	1–2 (p = 0,002); 2–3 (p = 0,0001)
	3	2 (10 %)	0 (0 %)	5 (25 %)	2–3 (p = 0,01)
Деструктивные изменения межклеточного матрикса	0	1 (5 %)	8 (40 %)	5 (25 %)	1–2 (p = 0,006)
$\chi^2 = 11,3$ (p = 0,02)	1	13 (65 %)	12 (60 %)	10 (50 %)	
	2	6 (30 %)	0 (0 %)	5 (25 %)	1–2 (p = 0,006); 2–3 (p = 0,01)
Деструктивные изменения артерий	0	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	
$\chi^2 = 44,4$ (p = 0,000001)	1	10 (50 %)	18 (90 %)	0 (0 %)	1–2 (p = 0,004); 1–3 (p = 0,0004); 2–3 (p = 0)
	2	10 (50 %)	1 (5 %)	12 (60 %)	1–2 (p = 0,001); 2–3 (p = 0,0003)
	3	0 (0 %)	0 (0 %)	8 (40 %)	1–3 (p = 0,001); 2–3 (p = 0,001)
Деструктивные изменения портальных трактов	0	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	
$\chi^2 = 43,56$ (p = 0,000001)	1	9 (45 %)	14 (70 %)	0 (0 %)	1–3 (p = 0,0008); 2–3 (p = 0)
	2	11 (55 %)	5 (25 %)	7 (35 %)	
	3	0 (0 %)	0 (0 %)	13 (65 %)	1–3 (p = 0); 2–3 (p = 0)

Влияние препаратов на некроз гепатоцитов ($p = 0,000001$), деструктивных изменений центральных вен ($p = 0,000001$), деструктивных изменений межклеточного матрикса ($p = 0,02$), деструктивных изменений артерий ($p = 0,000001$) и деструктивных изменений портальных трактов ($p = 0,000001$) является статистически значимым. Так во второй группе по сравнению с первой и третьей статистически значимо выше процент эксплантатов печени кроликов с минимальной степенью некроза гепатоцитов (1–2 ($p = 0,000001$); 2–3 ($p = 0,000001$)) и отсутствует процент эксплантатов печени кроликов тяжелой степенью некроза гепатоцитов.

Во второй группе по сравнению со первой и третьей больший процент эксплантатов печени кроликов не имеют деструктивных изменений в центральных венах ($p = 0,006$), либо имеют легкую степень ($p = 0,003$ и $p = 0,0001$ соответственно) и соответственно меньший процент эксплантатов печени кроликов имеет среднюю степень ($p = 0,002$ и $p = 0,0001$).

Во второй группе по сравнению со первой больший процент эксплантатов печени кроликов не имеют деструктивных изменений межклеточного матрикса ($p = 0,006$). Эксплантатов печени кроликов с тяжелой степенью деструктивных повреждений межклеточного матрикса во второй группе не наблюдалось.

Во второй группе по сравнению с первой и третьей у большего процента эксплантатов печени кроликов деструктивных изменений артерий выявлены изменения легкой степени (1–2 ($p = 0,004$); 1–3 ($p = 0,0004$); 2–3 ($p = 0$)). При сравнении результатов в первой и третьей группах было получено, что в третьей группе 40 % эксплантатов печени кроликов имеют тяжелую степень деструктивных изменений (1–3 ($p = 0,001$); 2–3 ($p = 0,001$)), в то время как в первой и второй группах не было эксплантатов, имеющих данную степень деструкции.

Во второй группе по сравнению с первой и третьей группой наблюдались деструктивные изменения легкой степени (1–3 ($p = 0,0008$); 2–3 ($p = 0$)). При сравнении результатов в первой и третьей группах было получено, что в третьей группе 65 % эксплантатов печени кроликов имеют тяжелую степень

деструктивных изменений, в то время как в первой и второй группах не было эксплантатов, имеющих данную степень деструкции (1–3 ($p = 0$); 2–3 ($p = 0$)).

Описательные статистики (среднее, стандартное отклонение, стандартная ошибка) патоморфологической оценки эксплантата печени до и после консервации в различных группах представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты сравнения средних значений показателей в группах до и после 8-часовой консервации эксплантатов печени кроликов.

Описательные статистики патоморфологической оценки печеночного эксплантата						
Группа	до консервации			после консервации		
	Среднее значение	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка	Среднее значение	Стандартное отклонение	Стандартная ошибка
1	0,15	0,37	0,082	12,35	0,88	0,196
2	0,2	0,41	0,092	7,5	1,36	0,303
3	0,15	0,37	0,082	16,05	1,15	0,256

Распределение по уровню степени тяжести патоморфологических изменений в биоптатах печени кроликов в трех группах представлено в таблице 5.

Таблица 5 – Распределение по уровню патоморфологических изменений печеночного эксплантата по группам

Уровень морфометрической оценки печеночного эксплантата	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Уровень значимости различий (p)
Патоморфологические изменения лёгкой степени	1 (5 %)	20 (100 %)	0 (0 %)	1–2 ($p = 0,0000001$); 2–3 ($p = 0,0000001$)
Патоморфологические изменения средней степени	19 (95 %)	0 (0 %)	8 (40 %)	1–3 ($p = 0,0003$)
Патоморфологические изменения тяжёлой степени	0 (0 %)	0 (0 %)	12 (60 %)	

Анализ результатов, представленных в таблице 5, позволяет сделать следующие выводы: все эксплантаты печени кроликов из второй группы имеют патоморфологические изменения в печени легкой степени тяжести. Статистически значимо больший процент эксплантатов печени кроликов из первой группы по сравнению с третьей ($p = 0,0003$) имеют патоморфологические изменения в печени средней степени тяжести. В то время как 60 % эксплантатов печени кроликов из третьей группы имеют тяжелую степень патоморфологических изменений в печени.

Дисперсионный анализ полученных данных. С помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями сравнивались средние значения показателей в разных группах и разных замерах.

Основные результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и аланинаминотрансферазы (АлаТ) до и после 8-часовой консервации представлены на рисунке 1.

Дисперсионный анализ показал, что на исследуемый показатель влияет взаимосвязь факторов ($p = 0,00001$): имеются статистически значимые различия в средних значениях показателя до и после 8-часовой консервации эксплантатов печени кроликов в зависимости от группы. Так, если до консервации средние значения АсАТ и АлаТ в трех группах различались незначимо, то после консервации имеют место статистически значимые различия: наиболее низкий уровень АсАТ и АлаТ наблюдается во второй группе, в то время как в первой и третьей группах уровень АсАТ и АлаТ был статистически значимо выше.

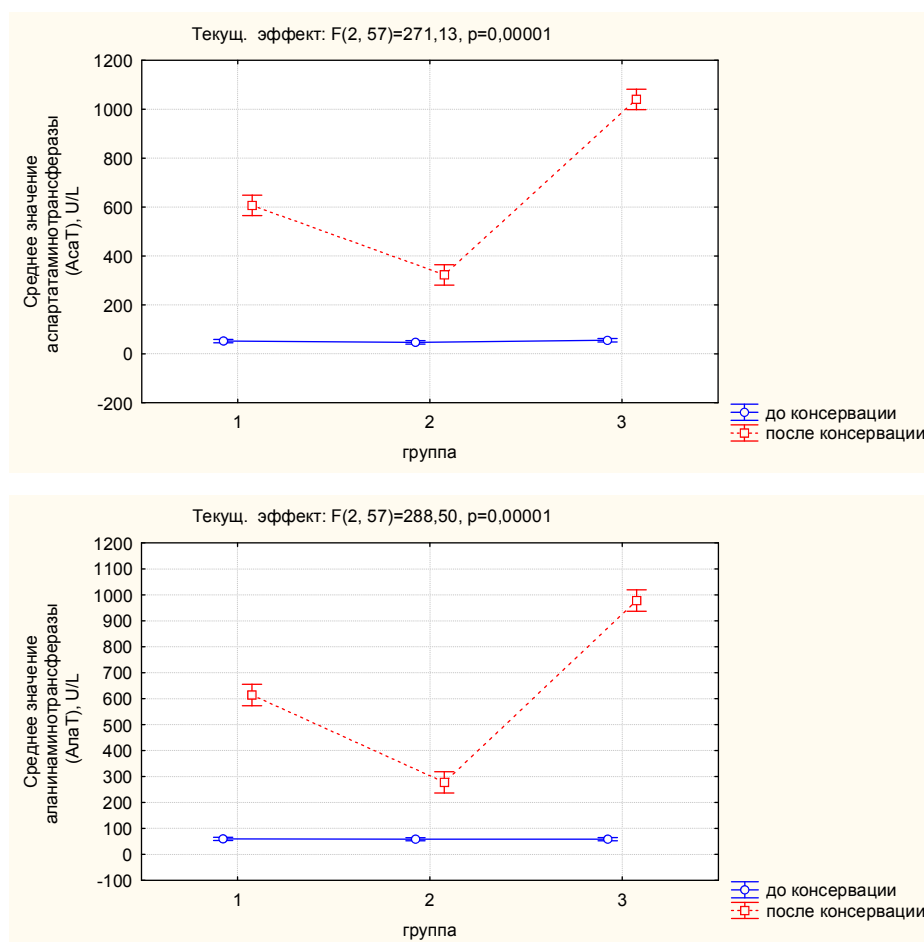


Рисунок 1 – Графики средних значений аспартатаминотрансферазы (АсаТ), U/L и аланинаминотрансферазы (АлаТ) в трех группах до и после 8-часовой консервации

На рисунке 2 представлен график средних значений морфометрических показателей печеночного эксплантата до и после 8-часовой консервации.

Дисперсионный анализ показал, что выявлены статистически значимые изменения в средних значениях показателя, произошедшие до и после 8-часовой консервации в разных группах ($p = 0,00001$). Причем если до консервации средние значения морфометрической оценки эксплантатов в трех группах различались незначимо, то после 8-часовой консервации патоморфологические изменения лёгкой степени наблюдаются во второй группе, а патоморфологические изменения тяжёлой степени в третьей группе.

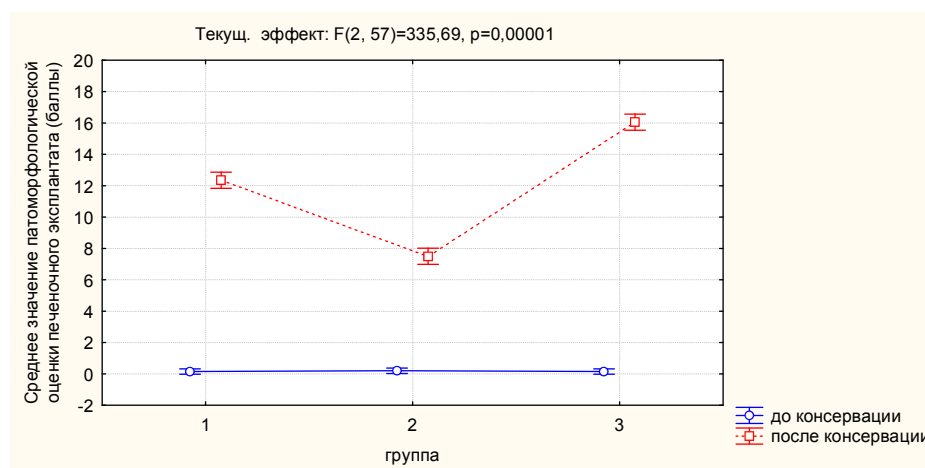


Рисунок 2 – Среднее значение морфометрической оценки эксплантата печени кроликов в различных группах до и после 8-часовой консервации

Таким образом, более выраженные органосохраняющие эффекты комбинированного консервирующего раствора на основе НТК и неоксигенированной ЭПФОС обусловлены его осмолярностью и антиоксидантной активностью, препятствующей в условиях ишемии развитию внутриклеточного отека, осмотического и свободно-радикального лизиса, а, следовательно, профилактирующего и ферментативный цитолиз гепатоцитов. Добавление неоксигенированной ЭПФОС в НТК раствор в отношении 1 : 4 при консервации повышает качество и надежность противоишемической защиты эксплантата в этом растворе. Основным преимуществом неоксигенированной ЭПФОС является его интактность к тканям и органам, то есть препарат не метаболизируется в клетках (гепатоцитах) в отличие от других антиоксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная модель проведения хирургического эксперимента универсальна, клинически модифицирована и позволяет оценить ишемическое повреждение эксплантата печени после консервации в различных растворах.

2. В эксперименте после 8-часовой консервации печеночного эксплантата в неоксигенированной эмульсии перфторорганических соединений: у 60 % эксплантатов патоморфологические изменения тяжелой степени, статистически значимо высокий уровень гипербилирубинемии, цитолиза и коагулопатии.

3. В эксперименте после 8-часовой консервации печеночного эксплантата

в комбинированном консервирующем растворе патоморфологические изменения легкой степени тяжести по сравнению с другими группами, статистически значимо меньше гипербилирубинемия, цитолиз и коагулопатия.

4. Комбинированный консервирующий раствор позволяет уменьшить ишемическое повреждение, повысить качество и функциональность эксплантата. При консервации в неоксигенированной эмульсии перфторорганических соединений 40 % печеночных эксплантатов имеют патоморфологические изменения средней степени, а потому данный консервант в критических условиях имеет право на существование.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Модель хирургического эксперимента на лабораторных животных позволяет проводить работы по созданию, оценке противоишемических препаратов, антиоксидантов и консервирующих растворов.

С целью снижения ишемического повреждения донорского органа применение комбинированного консервирующего раствора при эксплантации и консервации может быть рассмотрено в клинической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ишемическое реперфузионное повреждение гепатоцитов при консервации печеночного трансплантата / **А. С. Сохарев** [и др.] // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.** – 2015. – Выпуск 115, № 3. – С. 66–73.

2. Экспериментальный способ консервации печеночного трансплантата / **А. С. Сохарев** [и др.] // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2016. – № 2. – С. 43–48.

3. Патоморфологическая оценка защиты печеночного эксплантата при длительной ишемии с помощью комбинированного способа консервации в эксперименте / **А. С. Сохарев** [и др.] // **Медицина в Кузбассе.** – 2016. – № 4. – С. 46–53.

4. **Пат. 2482674** С 1 Российская Федерация А 51 А01N 1/02. Способ консервации печени при трансплантации / О. А. Краснов [и др.; в том числе **А. С. Сохарев**]; МБУЗ Городская клиническая больница № 3 им.

М. А. Подгорбунского. – № 2011148407/13; заявл. 28.11.2011; опубл. 27.05.2013. – Бюл. 15. – 1 с.

5. Применение комбинированного способа консервации печеночного трансплантата в эксперименте / **А. С. Сохарев** [и др.] // Вестник клуба панкреатологов. – 2016. – № 2 (31). – С. 56–62.

6. **Сохарев, А. С.** Применение перфторана при консервации печеночного трансплантата / **А. С. Сохарев**, К. А. Краснов, А. В. Будаев // Материалы 6-го Всероссийского съезда трансплантологов, 24–27 сентября 2012 года, г. Москва // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2012. – Т. XIV. Приложение. – С. 165.

7. **Сохарев, А. С.** Использование комбинированного консерванта для печеночного трансплантата в эксперименте / **А. С. Сохарев** // Проблемы медицины и биологии : материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и студентов с Международным участием, посвященной 70-летию Кемеровской области. – Кемерово, 2013. – С. 168–169.

8. Использование перфторана при консервации печени в эксперименте / **А. С. Сохарев** [и др.] // Актуальные проблемы хирургической гепатологии : материалы 20-го юбилейного Международного конгресса ассоциации хирургов-гепатологов стран СНГ. – Донецк, 2013. – С. 254–255.

9. **Сохарев, А. С.** Ишемически-реперфузионное повреждение печени при консервации / **А. С. Сохарев**, К. А. Краснов, А. В. Будаев // Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии : материалы 21-го Международного конгресса ассоциации хирургов-гепатологов стран СНГ. – Пермь, 2014. – С. 178.

10. Первый опыт трансплантации печени в Кузбассе / К. А. Краснов [и др.; в том числе **А. С. Сохарев**]/// Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии : материалы 21-го Международного конгресса ассоциации хирургов-гепатологов стран СНГ. – Пермь, 2014. – С. 41–42.

11. Применение комбинированного способа консервации печеночного

трансплантата / **А. С. Сохарев** [и др.] // Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии : материалы 22-го Международного конгресса ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ. – Ташкент, 2015. – С. 25.

12. **Сохарев, А. С.** Патоморфологические изменения при различных способах консервации в эксперименте / **А. С. Сохарев**, К. А. Краснов, А. В. Будаев // Актуальные проблемы гепатопанкреатобилиарной хирургии : материалы 23-го Международного конгресса ассоциации гепатопанкреатобилиарных хирургов стран СНГ. – Республика Беларусь, Минск, 2016. – С. 344–345.

13. Патоморфологическая оценка ишемически-реперфузионного повреждения печеночного трансплантата при консервации в эксперименте / **А. С. Сохарев** [и др.] // Актуальные вопросы современной хирургии : материалы межрегиональной научно-практической конференции, посвященной 120-летию М. А. Подгорбунского и 60-летию лечебного факультета КемГМУ. – Кемерово, 2016. – С. 113–128.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АлаТ	– аланинаминотрансферазы
АсаТ	– аспартатаминотрансфераза
АФК	– активные формы кислорода
АЧТВ	– активированное частичное тромбопластиновое время
ГГТ	– γ -глутамилтрансфераза
ИП	– ишемическое повреждение
ПТИ	– протромбиновый индекс
ЩФ	– щелочная фосфатаза
ЭПФОС	– эмульсия перфторорганических соединений
НТК	– консервирующий раствор «гистидин-триптофан-кетоглутарат»