

СПОСОБ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ

Ахмедов М.Д., Аскарлов Т.А., Файзиев Ё.Н., Ашурметов А.М.,
Мухамедов М.М., Тухтамурод З.З., Жафаров Х.М., Абдуллакулов У.М.

Ташкентский педиатрический медицинский институт.

✓ Резюме,

На лабораторных животных с различными моделями гепато-целлюлярных повреждений/затравка CCl₄, DL-галактозамином, механическая желтуха и на больных с заболеваниями гепато-билиарной зоны разработан тест количественной оценки состояния паренхимы печени. Тест основан на определении коэффициента, получаемого в результате изучения в гомогенате ткани органа активности цитохромоксидазы в присутствии двух субстратов: цитохрома С и ТМФД.

Ключевые слова: модели гепато-целлюлярных повреждений/затравка CCl₄, DL-галактозамином, механическая желтуха, заболевания гепато-билиарной зоны разработан тест количественной оценки состояния паренхимы печени.

ЖИГАР ЖАРАОҲАТИ ДАРАЖАСИНИ АНИҚЛАШ УСУЛЛАРИ

Ахмедов М.Д., Аскарлов Т.А., Файзиев Ё.Н., Ашурметов А.М.,
Мухамедов М.М., Тухтамурод З.З., Жафаров Х.М., Абдуллакулов У.М.

Тошкент педиатрия тиббиёт институти.

✓ Резюме,

Ҳар хил гепатоцеллюляр жароҳатланган (CCl₄ - тўртхлорли углерод, DL - галактозамин, механик сариқлик, ишемия) экспериментал лаборатор каламушларда жигар паренхимаси жараоҳати миқдорий ўлчов тестлари ишлаб чиқилди.

Бу тестлар асосида текширилайтган тўқиманинг гомогенатидаги цитохромоксидазалар фаоллиги белгиси: цитохром С ва ТМДФ(тетраметилпарафенилендиамин) активлиги миқдорини аниқлаш ётади.

Калит сўзлар: экспериментал лаборатор каламушларда жигар паренхимаси жараоҳати миқдорий ўлчов тестлари ишлаб чиқиш. CCl₄ - тўртхлорли углерод, DL - галактозамин, механик сариқлик, ишемия.

THE METHOD OF ASSESING THE DEGREE OF LIVER DAMAGE

Akhmedov M.D., Askarov T.A., Fayziev Y.N., Ashurmetov A.M.,
Mukhamedov M.M., Tukhtamurod Z.Z., Jafarov Kh.M., Abdullokulov U.M.

Tashkent Pediatric Medical Institute.

✓ Resume,

The test of quantitative evaluation of the state of liver parenchyma has been developed on the basis of different models of hepatocellular injuries induced by effect of CCl₄, DL-galactosamine, mechanical jaundice, ischemia in the laboratory animals. The test was based on determination of the coefficient obtained due to studying of the activity of cytochromoxidase during the, presence of two substrates cytochrome C and TMD in the organ tissue homogenate.

Keywords: the method of assesing the degree of liver damage, by effect of CCl₄, DL-galactosamine, mechanical jaundice, ischemia in the laboratory animals

Актуальность

В настоящее время известны способы диагностики острых и хронических заболеваний печени, основанные на определении активности различных ферментов в крови и печёночной ткани, скорости поглощения красителей и радиоактивных веществ, по уровню метаболитов, синтезируемых данным органом [1,4,6,8,9]. Однако, ни один из этих тестов диагностики не даёт представления о количестве сохранной и функционально способной паренхиме печени, а позволяет только составить качественные представления о патологическом процессе в данном органе.

В то же время такой диагностический тест необходим для клинической гепатологии. Он позволял бы объективно представить состояние печёночной паренхимы в каждом конкретном случае, обоснованно подходить к выбору метода оперативного вмешательства, его патогенетической обоснованности и контролировать течение послеоперационного периода [10].

Такая попытка была предпринята К.Озавы (1980) [7], который, определяя содержание цитохромоксидазы в ткани печени, показал, что при уровне этого фермента выше 1,5x10⁻¹⁰ моль/мг белка резекция органа не должна превышать 60%, менее 0,5x10⁻¹⁰ моль/мг белка - резекция противопоказана, из-за развития в послеоперационном периоде острой печёночной недостаточности. Несмотря на это данный способ не позволяет количественно охарактеризовать степень повреждения печёночной ткани при различных заболеваниях печени и жёлчных путей, а даёт относительное представление об объёме резекции. Разработка такого диагностического теста явилась целью настоящего исследования.

Материал и методы

Для решения поставленной задачи выполнены острые и хронические опыты на 200 крысах - самцах весом 160-180 грамм, 46 собаках различного веса и пола.

Кроме того, подвергнуты обследованию 24 больных с заболеваниями гепатобиллиарной зоны.

Избрав в качестве основного направления работы изучение митохондриальной дыхательной цепи, ответственной за энергетику печёночной клетки и потребляющей 90% кислорода, поступающего в клетку, мы исследовали активность цитохромоксидазы (цитохром $a+a_3$). Последняя изучалась нами в присутствии двух субстратов: цитохром c - природным донором электронов и NNNN тетраметил-парафенилендиамин (ТМФД) - искусственным донором электронов. Необходимость такого методического приёма обусловлена тем, что восстановленный цитохром C передаёт электроны цитохромоксидазному олигоферментному комплексу, который активирует кислород с образованием OH^- через цитохром a_3 . Восстановленный же ТМФД окисляется через цитохромы $a+a_3$, локализованных на внутренней митохондриальной мембране (Яacob E/E., 1960)[5].

Введение галактозамина приводит к развитию острой печёночной недостаточности, уже через 24-48 часов со 100% гибелью животных через 56 часов. В отличие от него при введении CCL4 указанные изменения наблюдались в более ранние сроки (через 12-24 часа) после затравки. Через 12-18-24 и 48 часов после введения галактозамина, 12 и 24 часа - CCL4; через 30, 60 и 120 минут нормотермической ишемии; 7, 14 и 21 сутки после обтурации - животных забивали декапитацией в холодной комнате. Быстро извлекали печень, промывали и готовили гомогенат в среде, состоящей из 0,25 сахарозы, 2×10^{-4} М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота); 0,01 М трис-HCL буфера с pH 7,4 в соотношении ткани и среды 1:2. Поляррографический анализ проводили со стандартным платиновым электродом Кларка закрытого типа на поляррографе LP-7 [7]. В поляррографическую кювету объёмом 1,1 мл. ($t=37^\circ C$) вносили полученный гомогенат в расчёте 1,4 мг. белка на данный объём кюветы.

После чего записывали скорость потребления кислорода. Аналогичные записи проводили при последовательном добавлении в поляррографическую кювету аскорбата натрия - конечная концентрация 2мм., ТМФД и цитохром C в конечной концентрации 1мкм и 5 мкм соответственно. Рассчитывали цитохром C - и ТМФД-оксидазные активности на 1 мг. Белка за вычетом аскорбат зависимого потребления кислорода.

Наряду с исследованием гомогенатов ткани печени животных и опытных животных, проводили в каждом конкретном случае разделение биопсированной части органа на гепатоциты по Anderson N.G. (1953)[3]. Подсчёт жизнеспособных и погибших гепатоцитов осуществляли в камере Горяева после прижизненной окраски трипановым синим.

Для сравнения нами использовался тест оценки жизнеспособности печёночной ткани, основанный на различии в поглощении витального красителя - нейтрального красного интактными и повреждёнными клетками. Для чего планиметрически определяли соотношение прокрашенных и непрокрашенных участков ткани, а также способность печёночных клеток поглощать краситель на 1гр. сухого веса (Сергеева В.С. 1976)(2).

Основная масса больных наблюдалась по поводу желчнокаменной болезни, механической желтухи, рака желудка, болезни оперированного желудка, рака поджелудочной железы. У них одна часть биопсированной ткани печени подвергалась исследованию на активность цитохромоксидазы, другая - разделялась на клетки. Во всех случаях перерасчёт количества гепатоцитов производили на 1гр. ткани печени. У этих же больных были определены осадочные пробы печени (тимоловая, сулемовая), активность ферментов (АС-Т, АЛТ), общий билирубин и белок сыворотки крови.

Результат и обсуждение

Результаты опытов представлены в таблице №1.

Таблица №1.

Значения коэффициента и количества жизнеспособных гепатоцитов у затравленных животных.

Период исследования	Коэффициент / усл.ед./	Количество жизнеспособных гепатоцитов в 1гр.печени	Количество сохранной паренхимы печени в %
Интактные животные	1,9 +0,05	$1,9 \times 10^7$ ст.	100%
Затравленные животные			
12 часов	5,05+-	$0,85 \times 10^7$ ст.	45%
18 часов	6,94 +0,05	$0,67 \times 10^7$ ст.	35%
24 часов	9,7+-0,1	$0,45 \times 10^7$ ст.	24%
48 часов	13,2+-0,1	$0,30 \times 10^7$ ст.	16%

Её данные свидетельствуют о том, что у животных второй и третьей серий опытов коэффициент возрастает с увеличением продолжительности периода исследования. Так, через 12 часов наблюдения он возрастает в 2,5 раза, через 24 часа - почти в 5 раз. Особенно высок уровень коэффициента к 48 часам. Все животные с такими его значениями погибли.

Соответственно указанной динамики уменьшалось количество жизнеспособных гепатоцитов, выделенных из печени в те же периоды после затравки CCL4 или ДЛ-галактозамином. Если к 12 часам данный показатель уменьшался почти аналогично увеличению значений коэффициента, то в остальные периоды исследова-

ния такая зависимость носила параболический характер. Через 24 часа выделяется только 24% жизнеспособных гепатоцитов, а к 48 часам - их количество не превышает 16% от того уровня, который имеется у интактных животных.

У крыс, которым одновременно с желчными протоками перевязывали печёночную артерию, через 7 дней исследования коэффициент достигал $9,8 \pm 0,03$ ед., а количество жизнеспособных гепатоцитов составляло 25% $/0,46 \times 10^7$ ст. клеток/. Если лигировали только общий желчный проток, то через неделю коэффициент равнялся $5,9 \pm 0,06$ ед. Он был таким же и через 14 дней механической желтухи $/5,5 \pm 0,05$ ед./. У собак такого

уровня он достигал только через четыре недели обтурационного холестаза. При этом количество сохранной паренхимы колебалось в пределах 43-55%.

Исследования с нейтральным красным показали, что у животных второй и третьей серий опытов количество прокрашенных полей срезов печени изменяется в зависимости от продолжительности затравки. Если у интактных животных данный показатель составлял 82,2%, то через 12 и 24 часа затравки - соответственно 65,8% и 41,8%. В то же время способность ткани печени сорбировать указанный краситель возрастает более значительно. Так, через 12 часов исследования она увеличивается почти в 2 раза, а к 24 часам - в 4,4 раза.

При морфологическом исследовании ткани печени установлено, что с увеличением продолжительности наблюдения интенсивность изменений в орга-

не нарастает. Так, через 12 часов после затравки отмечается нечёткая выраженность балочной структуры. Контуры гепатоцитов развиты, ядра обеднены хроматином. В печёночной паренхиме встречаются круглоклеточные инфильтраты с примесью лейкоцитов, локализующихся, как правило, вблизи венозных сосудов. К 24 часам гепатоциты повсеместно некробиотически изменены. Выявляются множественные некрозы с интенсивной макрофагальной и лейкоцитарной реакцией. Отмечаются и повреждения стенки сосудов: ядра эндотелиоцитов набухшие, выстоят в просвет и слущиваются. Резкая вакуолизация и тотальное некробиотическое изменение гепатоцитов имеет место к 48 часам наблюдения. В паренхиме печени множественные некрозы и кровоизлияния. Последние вследствие повреждения стенок сосудов.

Таблица № 2.

Значения коэффициента и количества сохранной паренхимы печени у лабораторных животных и у больных с гепато-билиарными заболеваниями.

Коэффициент	Количество сохранной паренхимы печени / в %	
	Экспериментальные данные	Клинические данные
2,0-2,5	100	95
5,0-6,0	43-45	40-45
7,0	35	35
8,0	30	25-30
10,0-11,0	24-25	X/
13,0-14,0	15-16	x/

Интересные данные были получены нами у больных с гепато-билиарными заболеваниями /таблица 2/. В клинических условиях наибольшие значения коэффициента составляли 8,0 ед. Обычно это были больные с длительной механической желтухой обусловленной раком головки поджелудочной железы. При холелитиазе и обтурационном холестазе коэффициент колебался в пределах 5,5-6,0 ед. Его значения при циррозе печени, внутрипечёночной форме портальной гипертензии колебались от 4,2 до 6,0 ед. Интересен тот факт, что при одном и том же уровне коэффициента активность АСТ и АЛТ, показатели билирубина, осадочных проб и общего белка были различны. У ряда больных при высоких значениях коэффициента (6,0-7,0 ед.) указанные клинические пробы были изменены менее выражено, чем при низких. Анализ данных, представленных в таблице 2, позволяют сделать вывод о том, что как в эксперименте так и в клинике у больных конкретному уровню коэффициента соответствует чётко очерченное количество сохранной паренхимы печени.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствует о том, что предложенный тест может быть использован для количественной оценки степени повреждения печени. Данный тест не является специфичным по отношению к этиологическому фактору, вызвавшему повреждение печени или к конкретному заболеванию гепато-билиарной зоны. Уровень коэффициента даёт возможность судить о количестве сохранной паренхимы печени и соответствующим образом решать вопрос об объёме оперативного вмешательства и эффективности проводимого лечения.

Выводы

1. Тест диагностики, основанный на определении в гомогенате ткани печени соотношения активности цитохромоксидазы, определённой при помощи двух субстратов (цитохрома С и ТМФД), позволяет идентифицировать количество сохранной паренхимы печени.
2. Предложенный коэффициент не является специфичным по отношению к конкретному заболеванию печени и желчных путей. Он позволяет количественно охарактеризовать степень повреждения печени как в эксперименте, так и в клинике.
3. Значения коэффициента 12-13 ед. указывает на сохранность 16-20% печёночной паренхимы. Такой уровень его несовместим с жизнью лабораторного животного.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Дунаевский О.А. Дифференциальная диагностика заболеваний печени. /М., Медицина; 1985; 262.
2. Сергеева В.С. Морфофункциональная экспресс-диагностика состояния печени. /Коган Э.М., Левин Ю.М. // Ж. Булл.экспер.биол.имед. 1976; 82(11): 1404-1405.
3. Anderson N.G. Science, 1953; 117: 627-628
4. Garnier M., Pre J. Med.et chir.dig., 1980; 9(7): 587.
5. Jacobs E.E. Biochem and Biophys. // Res.Comm. 1960; 3(5): 536-539.
6. Marchesini G., // Hal. J.Gastroenterol., 1985; 17(2): 61-64.
7. Bua V., Cassarani S., et al. Ozawa K. Asian Med. J., 1980; 23: 499-527.
8. Peynet J., Caulin C., Guillausseau P.J.et.al. Med et chir.dig., 1980; 9(7): 565-569.
9. Tsianos E.B., Jalali M.T., Gowenlock A.H.et al. Hepato-Gastroenterol., 1986; 33: 247-249.
10. Buechter H., Zepp R., & Gomer, G. (1990). The use of segmental anatomy for an operative classification of Liver injuries. // Ann.Surg. 1990; 211(6): 669-675.

Поступила 09.06. 2019