

А.А. Третьяков, И.И. Хижняк, А.А. Стадников, А.Н. Неверов  
**ЛИКВИДАЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ ПОЛОСТЕЙ В ПЕЧЕНИ**  
**ПРИ ПОМОЩИ НАНОРАЗМЕРНОГО БИОКОМПОЗИТА «ЛИТАР»**  
*ГБОУ ВПО «Оренбургский государственный медицинский университет»*  
*Минздрава России, г. Оренбург*

Целью нашего исследования явилось экспериментально-гистологическое обоснование применения композитного материала «ЛитАр» в сочетании с окситоцином для замещения остаточных полостей печени для обеспечения оптимальных условий регенерации. Все исследования выполнены на 69 лабораторных белых крысах-самцах линии Вистар массой 280-300 г. Животных выводили из опыта путем передозировки эфира через 3,7,14 и 30 суток от начала эксперимента. Участок имплантации в печень композитного материала «ЛитАр» иссекался для последующего изучения на светооптическом, иммуноцитохимическом (идентификация экспрессии синтеза про- и антиапоптотических генов p 53, Bcl-2, caspasa-3, пролиферативного протеина Ki-67) и электронно-микроскопическом уровнях. Получены данные об оптимизации эпителиально-соединительнотканых взаимоотношений, что в пролиферативную фазу создает предпосылки для замещения дефекта тканеспецифическим регенератом паренхиматозных элементов печени.

**Ключевые слова:** печень, остаточная полость, регенерация, окситоцин, «ЛитАр».

A.A. Tretiakov, I.I. Khizhnyak, A.A. Stadnikov, A.N. Neverov  
**ELIMINATION OF RESIDUAL CAVITIES IN THE LIVER**  
**USING NANO BIOCOSMPOSITE "LITAR"**

The aim of our study was experimental-histological rationale for the use of composite material «Litar» in combination with oxytocin to replace residual cavities of liver for optimal terms of regeneration. All the investigations were carried out on 69 laboratory white male Wistar rats weighing 280-300 gr. The animals were taken out of the experiment by ether overdose in 3, 7, 14 and 30 days from the beginning of the experiment. The part of the liver with «Litar» composite material implant was dissected for subsequent study using light-optical, immune cytochemical (identification of expression of pro- and antiapoptotic p 53, Bcl-2, caspasa-3 synthesis, as well as proliferative protein Ki-67) and electron-microscopic levels. We obtained the data on the optimization of epithelial connective tissue relations that, in the proliferative phase, creates preconditions for elimination of defect regenerate tissue-specific parenchymatous elements of the liver.

**Key words:** liver, residual cavity, regeneration, oxytocin, «Litar».

Проблема лечебной коррекции остаточных полостей печени (ОПП), образующихся при оперативном лечении паразитарных и непаразитарных кист этого органа, а также опухолей и травм, остается актуальной, поскольку существующие методы закрытия полостей далеко не всегда приносят удовлетворительные клинические результаты и сопровождаются рядом осложнений (рецидивы, желчные свищи, поддиафрагмальные и подпеченочные абсцессы), которые часто являются показаниями к повторным сложным реконструктивным операциям [1,3,5,7]. Для ликвидации ОПП предлагались различные методики [5], однако неудовлетворенность результатами побуждает хирургов к поиску и внедрению в клиническую практику различных пластических материалов, способствующих замещению ОПП тканеспецифическими элементами данного органа. В течение последнего десятилетия в литературе появились сообщения, обосновывающие возможность замещения различных дефектов ткани с помощью резорбируемых и нерезорбируемых биоматериалов, подобных по строению аутоотрансплантатам, т.е. лишенных антигенных свойств. Особое внимание привлекает уникальный наноразмерный композитный материал «ЛитАр», представляющий собой цитоактивный биополимер, который успешно при-

меняется для восполнения дефектов тканей в различных областях медицины (травматология и ортопедия, челюстно-лицевая хирургия и стоматология, урология и гинекология). Одной из главных особенностей данного композита является возможность замещения области дефекта нативной тканью органа [8,9,10,11,12]. Сведения о применении «ЛитАра» в хирургической гепатологии для замещения ОПП отсутствуют.

В последние годы резко возрос интерес исследователей к изучению роли и значимости гипоталамических нонапептидов, в частности окситоцина, в обеспечении тканевого и клеточного гомеостаза.

На основании многочисленных комплексных исследований был сформулирован вывод о том, что окситоцин может рассматриваться как межсистемный регулятор элементарных процессов гистогенезов, в частности процессов пролиферации, роста и цитодифференцировок клеток и тканей различного генеза [2,6,13,14].

Таким образом, очевидна необходимость дальнейшего исследования возможности применения коллагенового композита для пломбировки ОПП, а также выяснения роли окситоцина в регуляции репаративных процессов, происходящих в данных условиях.

## Материал и методы

Все исследования выполнены на 69 лабораторных белых крысах-самцах линии Вистар массой 280-300 г. Из медицинского силикона вырезались шарики диаметром 6-9 мм и методом туннелизации имплантировались в правую долю печени экспериментального животного на 14 суток. Все операции проводили под эфирным масочным наркозом при соблюдении правил асептики и антисептики. Создание остаточной полости в печени было подтверждено визуально и морфологически. Рану брюшной полости зашивали наглухо. Животных выводили из опыта путем передозировки эфира через 3, 7, 14 и 30 суток от начала эксперимента. Силиконовый шарик изымался из печени на 14-е сутки, после чего орган подвергался однотипной гистологической обработке. Проведено 6 серий опытов. В первой серии была создана модель остаточной полости (рис. 1).

Во второй серии полость, сформированная по вышеописанной методике, диаметром около 8-9 мм на стадии 14-х суток эксперимента заполнялась композитом «ЛитАр» размером 0,25 см, другого лечения не проводилось. В третьей серии опытов сформированная таким же образом полость на стадии 14-х суток опыта заполнялась «ЛитАром», который затем пропитывался раствором окситоцина (1 МЕ).

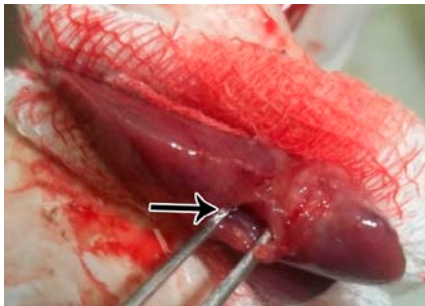


Рис. 1. Остаточная полость в печени (указана стрелкой) экспериментального животного после извлечения силиконового шарика на стадии 14 суток эксперимента

При этом после пломбировки в течение 10 дней экзогенно к месту имплантации ежедневно подводился раствор окситоцина (1МЕ) через установленную в ОПП хлорвиниловую трубку. В четвертой серии эксперимента сформированная по вышеописанной методике полость перед заполнением предварительно инфицировалась культурой *Klebsiellae pneumoniae*, штамм ГИСК № 278, затем полость заполнялась композитным материалом. В пятой серии аналогичная полость, инфицированная культурой *Kl.pneumoniae*, пломбировалась «ЛитАром», пропитанным раствором окситоцина (1 МЕ), и в течение 10 дней экзогенно к месту имплантации ежедневно подводился раствор окситоцина (1 МЕ). В шестой серии

опытов инфицированная полость заполнялась композитным материалом «ЛитАр», пропитанным раствором окситоцина (1 МЕ), в течение 10 дней после операции внутримышечно вводился антибиотик цефоперазон 2 раза в сутки по 50 мг/кг и экзогенно к месту пластики подводился раствор окситоцина по 1 МЕ ежедневно и цефоперазон.

Участок имплантации в печень композитного материала «ЛитАр» иссекался для последующего изучения на светооптическом, иммуноцитохимическом (идентификация экспрессии синтеза про- и антиапоптотических генов p53, Bcl-2, caspasa-3, пролиферативного протеина Ki-67) и электронномикроскопическом уровнях.

## Результаты и обсуждения

На основании анализа гистологических препаратов было показано, что через 3-е суток опыта по краю имплантированного объекта формируется выраженный демаркационно-некротический вал, включающий в себя макрофаги, лимфоциты и полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы и эозинофилы). Данные клетки располагаются при отеке в межклеточном веществе стромы печени. Зона некротических изменений существенно нарастала к 7-м суткам и являлась пролонгированным «раздражителем», обеспечивающим развитие воспалительных реакций в тканях печени вплоть до 14-х суток эксперимента.

Наши экспериментально-гистологические исследования долек печени, прилежащих к фиброзной капсуле моделируемой ОПП, показали выраженное развитие цитолитических некрозов гепатоцитов по механизму чрезмерной гидропии, наблюдаемое наиболее четко к 7-м суткам эксперимента. При этом регистрируются очаги геморрагических некрозов периферических зон долек печени, что отражает существенные нарушения сосудистой микроциркуляции органа в моделируемых условиях. В этой связи полученные нами результаты могут свидетельствовать о том, что моделируемая остаточная полость печени создает условия для хронизации воспалительного процесса в органе с переходом в цирроз печени. Таким образом, установлено, что через 7 суток опыта в ОПП присутствуют явления дисрегенерации паренхиматозных структур органа, проявляющиеся в интенсивном фибриллогенезе, опережающем пролиферацию гепатоцитов (рис.2).

Отмечалось разрастание соединительной ткани не только по краю полости, но и в зонах печеночных долек. Мы еще раз отмечаем, что при создании модели остаточной полости печени не наблюдается признаков инволюции рубцовых структур, которые испытывают на себе

длительное механическое воздействие со стороны имплантированного в печень силиконового шарика. Использование в качестве лечебного средства «ЛитАр» для ликвидации ОПП показало, что через 3-е суток эксперимента при клиническом осмотре и гистологическом исследовании визуально наблюдаются набухание данного объекта и заполнение им всего пространства остаточной полости, не выходя за ее пределы.

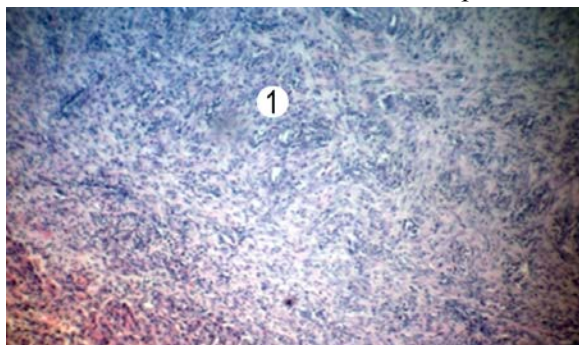


Рис. 2. Разрастание рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани в демаркационной зоне ОПП (1). Стадия: 14-е сутки эксперимента. Фиксация: 10% раствор нейтрального формалина. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Об.  $\times 8$ , ок.  $\times 10$

Имплантируемые структуры подвергаются лизису макрофагами. При этом создаются условия для активной пролиферации малодифференцированной соединительной ткани (грануляционной). Данный процесс пролонгирован и наблюдался через 14 суток эксперимента. В итоге на фоне резорбции композита происходило не только частичное заполнение ОПП соединительнотканью элементами, но и органоти-

пическими структурами (новообразованными печеночными клетками, формирующими атипические балки) (рис. 3).

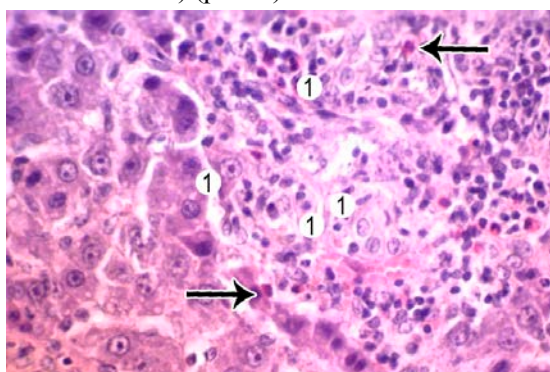


Рис. 3. Новообразованные печеночные клетки (1). 2-я серия. Окраска: гематоксилин Майера и эозин. Об. 40, ок. 10. Стрелками показаны эозинофилы

При включении в комплекс лечебных мероприятий окситоцина мы отметили пролонгированное формирование малодифференцированной соединительной ткани в области имплантированного композита (до 14-х сут.) с признаками интенсивного васкулогенеза. При этом вся полость заполнялась скоплениями малодифференцированных фибробластов, миофибробластов, гемокапилляров, а также коллагеновыми и эластическими волокнами. Указанные клеточные элементы (фибробласты, эндотелиоциты) давали позитивную окраску на идентификацию экспрессии синтеза протеина Ki-67 при лимитировании экспрессии синтеза белка caspasa 3 (см. таблицу).

Таблица

Изменение экспрессии про-, антиапоптотических протеинов и Ki-67 у гепатоцитов в пограничной зоне ОПП на 14-е сутки, %

Показатель	ОПП	ОПП+ «ЛитАр»	ОПП+ «ЛитАр»+ инфицирование	ОПП+ «ЛитАр»+ инфицирование+окситоцин	ОПП+ «ЛитАр»+ инфицирование+антибиотик
P 53	0,99 $\pm$ 0,02	1,14 $\pm$ 0,01	2,81 $\pm$ 0,12	0,81 $\pm$ 0,22	0,61 $\pm$ 0,11
Bsl-2	0,13 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,20	0,46 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,11
Caspasa 3	0,72 $\pm$ 0,03	1,56 $\pm$ 0,03	2,91 $\pm$ 0,11	1,11 $\pm$ 0,11	0,70 $\pm$ 0,01
Ki-67	0,13 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,06

Подобные изменения мы наблюдали и в капсулярной зоне ОПП, которая претерпевала гистологическую трансформацию из грубоволокнистого состояния в хорошо васкуляризованную рыхлую волокнистую соединительную ткань. В этих случаях признаки гранулематозного воспаления не наблюдались, что обеспечивает не только частичное заполнение ОПП соединительнотканью элементами, но и органотипическими структурами (новообразованные холангиолы и печеночные клетки, формирующие атипические балки) уже на 7-е сутки (рис. 4).

При применении окситоцина замедляется разрастание внутридольковых прослоек волокнистой соединительной ткани. Напротив, по краям остаточной полости и внутри ее формируется малодифференцированная соединитель-

ная ткань с сосудами микроциркуляторного русла. Таким образом, сформированная остаточная полость заполняется тканевыми элементами органотипического регенерата (печеночные балки, окруженные гемокапиллярами).

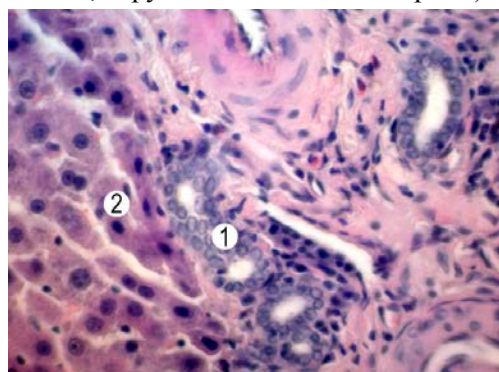


Рис. 4. Органотипический регенерат в ОПП. Новообразованные холангиолы (1) и печеночные клетки (2), формирующие атипические балки. 3-я серия. Стадия: 14-е сутки



Синусоидные и желчные капилляры, как правило, сохраняли свои просветы и не имели признаков нарушений микроциркуляции крови и оттока желчи. Электронно-микроскопические исследования показали, что гепатоциты имели структурно-функциональную характеристику, свойственную нормальному цитологическому статусу. В серии опытов с добавлением к «ЛитАру» окситоцина достоверно понижалась апоптотная доминанта у гепатоцитов (в 1,5-2 раза уменьшалась экспрессия синтеза протеина p 53) с одновременным возрастанием у них экспрессии пролиферативного гена Ki-67 (см. таблицу). Кариометрические исследования гепатоцитов и холангиоцитов показали достоверное увеличение размеров ядер клеток и их цитоплазмы по сравнению с аналогичными показателями, полученными в серии опытов, когда окситоцин не применялся. Эти данные могут быть оценены как проявление регенерационной гипертрофии, инициированной введением окситоцина. Но мы подчеркиваем, что при визуальном наблюдении к 30-м суткам ОПП без применения окситоцина и к 14-м суткам с применением данного нейропептида полость полностью заполняется органотипическим регенератом, внешне не отличающимся ни по цвету, ни по консистенции от паренхимы печени. В отличие от позитивных результатов, полученных во 2-й серии, где «ЛитАр» применялся для ликвидации стерильной ОПП, использование этого композита в качестве лечебного средства для ликвидации инфицированной ОПП не лимитирует развитие гнойно-некротического процесса, не обеспечивает реализации адекватной репаративной гистотипической потенции ткани печени. В данной серии опытов мы получили морфологические сведения о том, что сформированная остаточная полость печени и окружающие ее ткани демонстрировали признаки развития гнойно-некротического воспаления, свойственные гепатиту уже на 7-е сутки.

Несмотря на морфологические изменения, происходящие в ткани печени и в ОПП, видимого отторжения имплантированного в инфицированную полость композитного материала ни в одном случае не наблюдалось. К 14- и 30-м суткам участок печени, в который погружался «ЛитАр», имел обычный цвет, мягко-эластическую плотность без фибринозного налета на поверхности.

Установлено, что использование окситоцина в условиях инфицирования ОПП лимитирует развитие гнойно-некротических процессов, отграничивает зоны некроза от жизнеспособных тканей, стимулирует репаративные и органотипические потенции тканей печени как

в самой ОПП, так и в пограничных с ней зонах органа, приводит к замещению полости органотипическим регенератом. К 30-м суткам ОПП заполняется гистотипической тканью печени, которая не отличается по цвету и консистенции от окружающей паренхимы. Иммуноцитохимические исследования паренхиматозных структур печени показали, что применение окситоцина в условиях пломбировки композитом инфицированной полости приводит к существенным изменениям экспрессии про- и антиапоптотических протеинов и пролиферативного гена Ki-67 у гепатоцитов в пограничной зоне ОПП: к понижению экспрессии синтеза про- (p 53, caspasa-3) и повышению антиапоптотических (bcl-2) белков, а также протеина Ki-67, продукция которого инициирует фазу пролиферации в ходе репаративных гистогенезов органа. Сочетанное использование окситоцина с антибиотиком существенно потенцирует позитивные антиапоптотический и пролифератогенный эффекты, реализуемые паренхиматозными элементами печени. Электронно-микроскопические исследования показали, что гепатоциты имели структурно-функциональную характеристику, свойственную нормальному цитологическому статусу (рис. 5).

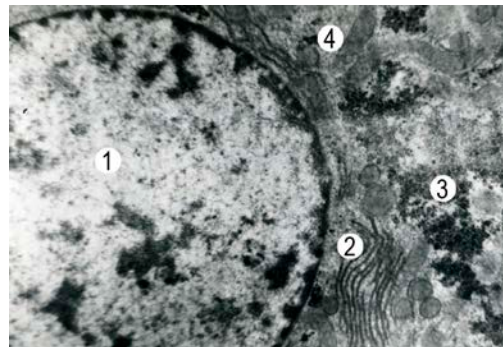


Рис.5. Фрагмент цитоплазмы гепатоцита в регенерате ОПП. Электронограмма. 6-я серия, 14-е сутки: 1 – ядро; 2 – канальца гладкого эндоплазматического ретикулума; 3 – гликоген; 4 – митохондрии

Таким образом, применение коллагенового композита «ЛитАр» в сочетании с окситоцином и антибиотиком при пломбировке ОПП оказывает максимально позитивное влияние на процессы репаративного гистогенеза в гистоструктурах печени и холангиолах ОПП, в том числе в условиях инфицирования полости, обеспечивая оптимальные условия для активной пролиферации малодифференцированной ткани, регенерационной гипертрофии гепатоцитов в зоне, прилегающей к ОПП, повышения их митотической активности и заполнения остаточной полости как соединительнотканью элементами, так и органотипическими структурами.

## Выводы

На основе полученных в ходе эксперимента данных установлено, что при имплантации в печень силиконового объекта структурно-функциональные особенности формирования полости в органе характеризуются интенсивным фибриллогенезом краевых участков, гетероморфизмом гепатоцитов, холангиоцитов и сосудов микроциркуляторного русла. При введение композита «ЛитАр» в ОПП происходит

оптимизация эпителиально-соединительнотканых взаимоотношений в ОПП и в краевой зоне, что в пролиферативную фазу создает предпосылки для замещения стромальных элементов печени без компрессии желчеотводящих путей. Установлено, что при добавлении к композиту «ЛитАр» окситоцина ОПП заполняется тканевыми элементами органотипического регенерата в более короткие сроки, в том числе и в условиях инфицирования.

### Сведения об авторах статьи:

**Третьяков Анатолий Андреевич** – д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. Тел.: 8(3532) 70-31-78. E-mail: Anatoly-tretyakov@mail.ru.

**Хижняк Ирина Игоревна** – ассистент кафедры хирургии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. Тел.: 8(3532)25-17-31. E-mail: irinahizniak@yandex.ru.

**Стадников Александр Абрамович** – д.б.н., профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. E-mail: alexander.stadnikov@yandex.ru.

**Неверов Алексей Николаевич** – к.м.н., доцент кафедры хирургии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России. Адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. Тел.: 8(3532) 34-92-71. E-mail: neverov.oren78@mail.ru.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев, А.Г. Хирургическая тактика при эхинококкозе печени с поражением желчных протоков / М.А. Алиев, А.А. Мовчун, Р.М. Агаев // Хирургия. – 2005. – № 2. – С.38-42.
2. Акмаев, И.Г. Взаимодействие основных регулирующих систем (нервной, эндокринной и иммунной) и клиническая манифестация их нарушений / И.Г. Акмаев // Клиническая медицина. – 1997. – № 11. – С. 8-13.
3. Аскерханов, Р.П. Диагностика и лечение эхинококковой болезни / Р.П. Аскерханов. – Ставрополь, 1984. – 213 с.
4. Барков, В.Н. Экспериментально-морфологическое обоснование применения нейропептидов и деминерализованного костного матрикса при лечении больных с кистами челюстей: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Оренбург, 2004. – 19 с.
5. Вишневский, В.А. Совершенствование методов хирургического лечения очаговых поражений печени: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1990. – 31 с.
6. Волков, Ю.О. Экспериментально-морфологическое обоснование применения окситоцина для оптимизации репаративных гистогенезов при костной аутопластике дефектов нижней челюсти (экспериментально-гистологическое исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Оренбург, 2014. – 23 с.
7. Гранов, А. М. Хирургическая тактика при непаразитарных кистах печени / А. М. Гранов, Л. В. Анфилова // Вестник хирургии. – 1994. – № 5. – С. 46-50.
8. Использование материала «ЛитАр» в замещении постостеомиелитных дефектов длинных костей / А.Ф. Краснов [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.И. Пирогова. – 2004. – № 4. – С. 75-79.
9. Литвинов, С.Д. Композит «ЛитАр» в лечении пульпита / С.Д. Литвинов, С.Е. Чигарина // Институт Стоматологии. – 2007. – № 4. – С.14-17.
10. Литвинов, С.Д. Применение композита «ЛитАр» в случае замедленной консолидации перелома и ложного сустава / С.Д. Литвинов, А.Ф. Краснов, А.Н. Куликов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – Т. 51, № 5. – С. 122-127.
11. Марков, И.И. Имплантационный материал «ЛитАр» индуцирует ангиогенез / И.И. Марков, С.Д. Литвинов, А.И. Марков // Морфологические ведомости. – 2003. – № 1-2. – С. 74-76.
12. Перспективы применения материала "ЛитАр" для восстановления хрящевой перегородки носа у детей / С.Д. Литвинов [и др.] // Российская оториноларингология. – 2006. – № 3(22). – С. 66-70.
13. Стадников, А.А. Морфологические основы влияния гипоталамической нейросекреции на структурно-функциональный гомеостаз, про-и эукариот / А.А. Стадников, О.В. Бухарин // Морфология. – 2013. – Т.144, вып. 5. – С.16-20.
14. Третьяков, А.А. Применение окситоцина при экспериментальном холангите / А.А. Третьяков, А.А. Стадников, А.А. Чумаков // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. –Т. 14, № 3. – С. 30-35.
15. Чернышев, В.Н. Хирургия эхинококкоза печени / В. Н. Чернышев, С. А. Иванов; СГМУ; СОКБ им. М.И.Калинина. – Самара, 2005. – 196 с.