

## ВЛИЯНИЕ СЕВОФЛЮРАНА И АЦЕТИЛЦИСТЕИНА НА ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ПЕЧЕНИ ДОНОРА СО СМЕРТЬЮ МОЗГА

Щерба А.Е.<sup>1</sup>, Коротков С.В.<sup>1</sup>, Минов А.Ф.<sup>1</sup>, Слободин Ю.В.<sup>1</sup>, Савчук М.М.<sup>2</sup>, Дзядзько А.М.<sup>1</sup>, Руммо О.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> РНПЦ «Трансплантации органов и тканей» УЗ «9-я ГКБ г. Минска»,

<sup>2</sup> ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Республика Беларусь

**Целью** нашей работы явилась оценка влияния preconditionирования ацетилцистеином и севофлюраном на степень ишемически-реперфузионного повреждения печени умерших доноров с признаками маргинальности. **Методы и результаты.** Дизайн исследования – проспективное, контролируемое, рандомизированное исследование. Исследование было проведено на 21 доноре с умершим головным мозгом и бьющимся сердцем. В основную группу исследования вошли 11 доноров, в контрольную группу 10. В основной группе определялись морфологические признаки ишемически-реперфузионного повреждения после preconditionирования ацетилцистеином и севофлюраном, в группе сравнения – без preconditionирования. **Заключение.** Применение фармакологического preconditionирования севофлюраном и ацетилцистеином достоверно привело к уменьшению степени некроза и апоптоза гепатоцитов по сравнению с группой сравнения, т. е. обладает протективным эффектом от ишемически-реперфузионного повреждения.

**Ключевые слова:** севофлюран, ацетилцистеин ишемически-реперфузионное повреждение, маргинальный трансплантат.

## IMPACT OF SEVOFLURANE AND ACETYLCYSTEINE ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF THE LIVER FROM BRAIN-DEAD DONOR

Shcherba A.E.<sup>1</sup>, Korotkov S.V.<sup>1</sup>, Minov A.F.<sup>1</sup>, Slobodin Y.V.<sup>1</sup>, Savchuk M.M.<sup>2</sup>, Dzyadzko A.M.<sup>1</sup>, Rummo O.O.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Republican Research and Practice Centre «Tissue and Organ Transplantation», Minsk State Clinical Hospital № 9

<sup>2</sup> Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic of Belarus

**Aim.** The purpose of our work was to estimate the impact of preconditioning with acetylcysteine and sevoflurane on ischemia-reperfusion injury of cadaveric donor liver with marginal features. **Methods and results.** In this prospective randomized controlled trial we recruited 21 heart beating donors with brain death. We assigned 11 donors to the study group, and 10 donors to the control group. Morphological characteristics of ischemia-reperfusion injury in both groups were analyzed. **Conclusion.** Use of pharmacological preconditioning with acetylcysteine and sevoflurane resulted in necrosis and hepatocyte apoptosis reduction as compared to the control group, thereby had a protective effect against ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** sevoflurane, acetylcysteine, ischemia-reperfusion injury, marginal liver graft.

Статья поступила в редакцию 14.12.12 г.

**Контакты:** Савчук Максим Михайлович, аспирант кафедры кардиохирургии с курсом трансплантологии.

**Тел.** +375 29 710 27 26, **e-mail:** max.sauchuk@mail.ru

Учитывая высокую клиническую и экономическую эффективность трансплантации печени, хорошую долгосрочную выживаемость пациентов, количество их в листе ожидания постоянно возрастает, но клиническая мощность трансплантационных центров ограничена количеством эффективных доноров, которые отвечают стандартным критериям, в результате чего сложился и постепенно усугубляется дефицит донорских органов.

В странах с эффективным трупным донорством сплит-трансплантация одной донорской печени двум донорам и родственная трансплантация печени решают потребность 15–20% всех пациентов листа ожидания, главным образом детского возраста и малого веса. При этом основным источником увеличения количества донорских органов является использование органов с расширенными критериями, однако использование таких органов сопряжено с риском развития первичной дисфункции маргинального трансплантата, в основе которого лежит ишемически-реперфузионное повреждение [8]. Поэтому поиск возможных путей коррекции ишемически-реперфузионных повреждений маргинальных трансплантатов есть одна из приоритетных задач в трансплантации печени.

Новым подходом к трансплантации органов от доноров с расширенными критериями с целью уменьшения степени ишемически-реперфузионного повреждения является использование механического и фармакологического preconditionирования донора на этапе подготовки и выполнения донорской операции. Несмотря на обещающие экспериментальные результаты, ишемическое preconditionирование не показало эффекта на примере клинических исследований развития печеночного повреждения и недостаточности при обширных резекциях в условиях тепловой ишемии печени (прием Прингла) [6]. Результаты фармакологического preconditionирования в настоящее время наиболее убеждающие, что подтверждается литературными данными о широком использовании различных фармакологических агентов для предотвращения повреждения и нарушения функции печени при обширных резекциях в условиях тепловой ишемии печени (приема Прингла) и в клинической трансплантации печени для повышения резистентности маргинальных трансплантатов к ишемически-реперфузионному повреждению [1].

Для фармакологического preconditionирования с целью уменьшения ишемически-реперфузионного повреждения печени были предложены различные фармакологические агенты, включая аллопуринол, декстрозу, допексамин, маннитол, метилпреднизолон, простагландин E1, севофлюран, триметазидин, улинастатин, витамин E, супероксиддисмутазу, бло-

каторы кальциевых каналов, пентоксифиллин, ацетилцистеин [4].

В клинических рандомизированных исследованиях метилпреднизолон, триметазидин, декстроза, севофлюран и улинастатин показали протективное действие от ишемически-реперфузионного повреждения и уменьшение частоты послеоперационных осложнений при тепловой ишемии во время обширных резекций печени, при этом защитный эффект севофлюрана был более выраженным в случаях жирового гепатоза [5].

Ацетилцистеин в рандомизированных исследованиях показал клиническую эффективность в терапии фульминантной печеночной и острой почечной недостаточности, а также в клиническом исследовании предупреждения печеночной недостаточности при трансплантации графтов с жировым гепатозом [9].

**Цель работы** – оценить влияние preconditionирования ацетилцистеином и севофлюраном на степень ишемически-реперфузионного повреждения печени умерших доноров с признаками маргинальности.

Для решения поставленной цели мы разработали модель ишемического и реперфузионного повреждения нетрансплантабельной печени маргинального донора и изучили влияние ацетилцистеина и севофлюрана на течение этого процесса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование было проведено на 21 доноре с умершим головным мозгом и бьющимся сердцем.

Критерии включения: исследование проводилось на донорах с умершим головным мозгом и бьющимся сердцем, которые отвечали критериям маргинальности печеночного трансплантата, печень которых по совокупности факторов донорская бригада признавала нетрансплантабельной.

Дизайн исследования – проспективное, контролируемое, рандомизированное. Для формирования групп исследования была применена простая рандомизация А-В. В основную группу исследования вошли 11 доноров, в контрольную группу – 10.

В основной группе определялись морфологические признаки ишемически-реперфузионного повреждения после preconditionирования ацетилцистеином и севофлюраном.

Введение ацетилцистеина осуществлялось внутривенно в дозе 30 мг/кг не менее чем за 40 мин до начала хирургической операции по мультиорганному забору и 300 мг в порталную вену непосредственно перед пережатием воротной вены.

Севофлюран подавался в дыхательный контур в дозе 1,8–2,1 объемных % (0,8–1,0 минимальной альвеолярной концентрации) в течение не менее 40 мин до пережатия воротной вены.

Сразу после лапаротомии и определения маргинальности и непригодности к трансплантации печени, но не ранее чем через 40 минут от начала подачи в дыхательный контур севофлюрана, донорская бригада выполняла биопсию печени путем краевой резекции фрагментов обеих долей печени для оценки ее исходного состояния (жировой гепатоз, фиброз).

После биопсии сосудистым зажимом пережималась гепатодуоденальная связка (прием Прингла) на 40 мин. Для ужесточения параметров ишемического и реперфузионного повреждения у последних 3 доноров (все они вошли в основную группу исследования) гепатодуоденальная связка пережималась на 1 час.

Через 40 мин после прекращения пережатия гепатодуоденальной связки (снятия сосудистого зажима) выполнялась вторая биопсия путем краевой резекции фрагментов обеих долей печени для оценки степени ее ишемического и реперфузионного повреждения.

В группе сравнения определялись морфологические признаки ишемически-реперфузионного повреждения печени без прекондиционирования ацетилцистеином и севофлюраном.

Сразу после лапаротомии и определения маргинальности и непригодности к трансплантации печени, но не ранее чем 40 минут от момента подключения донора к наркозно-дыхательному аппарату в операционной, донорская бригада выполняла биопсию печени путем краевой резекции фрагментов обеих долей печени для оценки ее исходного состояния (жировой гепатоз, фиброз).

После биопсии сосудистым зажимом пережималась гепатодуоденальная связка (прием Прингла) на 40 мин.

Через 40 мин после прекращения пережатия гепатодуоденальной связки (снятия сосудистого зажима) выполнялась вторая биопсия путем краевой резекции фрагментов обеих долей печени для оценки степени ишемического и реперфузионного повреждения печени.

**Фиксация, хранение и доставка биоптатов**

Для предотвращения искажения истинного жирового гепатоза биоптаты фиксировались в формалине с фосфатным буфером и транспортировались из донорской базы в оперблок 9-й ГКБ г. Минска в транспортном холодильнике для изъятых органов при температуре 2–4 °С. Из оперблока фиксированные биоптаты переправлялись в городское патологоанатомическое бюро в принятом порядке.

Морфологический анализ биоптатов маргинальных печеночных трансплантатов проводился с целью оценки исходного состояния паренхимы печени (окраска эозин-гематоксилином), фиброза

(окраска МСБ), жирового гепатоза (окраска суданом красным/черным).

Поскольку степень ишемически-реперфузионного повреждения имеет прямую связь с выраженностью некрозов гепатоцитов, повреждением синусоидов, апоптозом гепатоцитов [4], морфологический анализ был направлен на определение степени некроза (ШИК-реакция) и апоптоза (окраска МСБ и ШИК-реакция).

Количественное соотношение степени некроза и апоптоза с выраженностью ишемически-реперфузионного повреждения, применяемое в клинических условиях, представлено в табл. 1 [5].

Таблица 1

**Соотношение степени некроза и апоптоза с выраженностью ишемически-реперфузионного повреждения**

Некроз, %	Апоптоз, %	ИРП
До 15	До 1,5	Слабовыраженное
15–29	1,5–2,9	Умеренно выраженное
30–50	3,0–5,0	Выраженное
>50	>5	Нефункционирование печеночного трансплантата

Полученные в результате экспериментального исследования значения некроза и апоптоза были сравнены с клиническим риском развития ИРП, а следовательно, ранней послеоперационной дисфункции трансплантата.

Степень жирового гепатоза вычислялась как процентное отношение гепатоцитов с жировыми включениями к общему количеству гепатоцитов в поле зрения.

Степень некроза вычислялась как процентное отношение некротизированных гепатоцитов к общему количеству гепатоцитов в поле зрения.

Степень апоптоза вычислялась как процентное отношение апоптотических телец к общему количеству гепатоцитов в поле зрения.

Степень фиброза определялась по Metavir [3]:

0 – фиброз отсутствует;

1 – фиброзное расширение портальных трактов без образования септ;

2 – фиброзное расширение портальных трактов с единичными портопортальными септами;

3 – многочисленные портоцентральные септы без цирроза;

4 – цирроз.

Статистический анализ был выполнен с помощью программного пакета STATISTICA 8 для Windows. Средние величины представлены как среднее ± стандартная ошибка, сравнение количественных величин выполнялось Mann–Whitney и ANOVA-тестом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Группы были сравнимы по возрасту доноров –  $39,8 \pm 3,4$  года в группе сравнения и  $39,2 \pm 2,6$  года в основной группе (Mann–Whitney,  $p = 0,9$ ) – и по среднему количеству признаков маргинальности на одного донора – 1,4 в группе сравнения и 1,6 в основной группе (ANOVA,  $p = 0,6$ ).

Среднее значение жирового гепатоза составило  $37 \pm 12\%$  (0–90%) в группе сравнения и  $37,8 \pm 9,5\%$  (0–80%) в основной и было сравнимо в обеих группах (Mann–Whitney,  $p = 0,75$ ).

Среднее значение фиброза составило  $0,3 \pm 0,15$  (0–1) балла по Metavir в группе сравнения и  $0,6 \pm 0,3$  (0–3) балла по Metavir в основной и было сравнимо в обеих группах (ANOVA,  $p = 0,3$ ).

Среднее значение исходного некроза гепатоцитов составило  $3,5 \pm 1,45\%$  (0–15%) в группе сравнения и  $6,5 \pm 2,6$  (0–30%) в основной и было сравнимо в обеих группах (Mann–Whitney,  $p = 0,3$ ).

Среднее значение исходного апоптоза гепатоцитов составило  $0,35 \pm 0,14\%$  (0–1,5%) в группе сравнения и  $0,42 \pm 0,1$  (0–1,5%) в основной и было сравнимо в обеих группах (Mann–Whitney,  $p = 0,5$ ).

Таким образом, группы были сравнимы по количеству, возрасту доноров, среднему количеству признаков маргинальности, среднему значению жирового гепатоза, фиброза, исходного некроза и апоптоза гепатоцитов, с тенденцией к более выраженному фиброзу и некрозу в основной группе.

После моделирования ишемии и реперфузии среднее значение некроза гепатоцитов в группе сравнения увеличилось с исходных  $3,5 \pm 1,9\%$  (0–15%) до  $7,3 \pm 2,0\%$  (3–25%; рис. 1), а в основной группе уменьшилось с  $6,5 \pm 2,6$  (0–30%) до  $4,1 \pm 1,5\%$  (0–15%; рис. 2), хотя разница между средними значениями некроза после ишемии и реперфузии

не достигла достоверного значения (Mann–Whitney,  $p = 0,16$ ).

После моделирования ишемии и реперфузии среднее значение апоптоза гепатоцитов увеличилось в группе сравнения с исходных  $0,35 \pm 0,14\%$  (0–1,5%) до  $0,78 \pm 0,2\%$  (0,3–2,5%), а в основной группе – с  $0,42 \pm 0,13$  (0–1,5%) до  $0,5 \pm 0,15\%$  (0–1,5%) и достоверно не отличалось (Mann–Whitney,  $p = 0,12$ ).

Таким образом, после моделирования ишемии и реперфузии среднее изменение степени некроза гепатоцитов составило +3,8% в группе сравнения, что было достоверно выше, чем в основной группе, –2,4% (Mann–Whitney,  $p = 0,001$ ; рис. 3).

Среднее изменение степени апоптоза гепатоцитов составило +0,43% в группе сравнения и было достоверно выше, чем в основной группе, +0,08 (Mann–Whitney,  $p = 0,01$ ; рис. 4).

Мы предположили, что при одинаковых заданных протоколом параметрах ишемии и реперфузии на результаты эксперимента может оказать влияние наиболее вариабельный и значимый фактор, т. е. степень жирового гепатоза (0–90%).

Действительно, в общей группе доноров степень жирового гепатоза не коррелировала с выраженностью некроза и апоптоза после ишемии и реперфузии (Спирмен,  $\rho = -0,2$ ;  $p = 0,2$ ), но в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более степень жирового гепатоза сильно коррелировала с выраженностью некроза (Спирмен,  $\rho = 0,6$ ;  $p = 0,01$ ), подтверждая высокую значимость жирового гепатоза в развитии ишемически-реперфузионного повреждения и влиянии на результат эксперимента (рис. 5).

Поэтому мы решили изучить изменение степени некроза и апоптоза в подгруппе доноров с уровнем

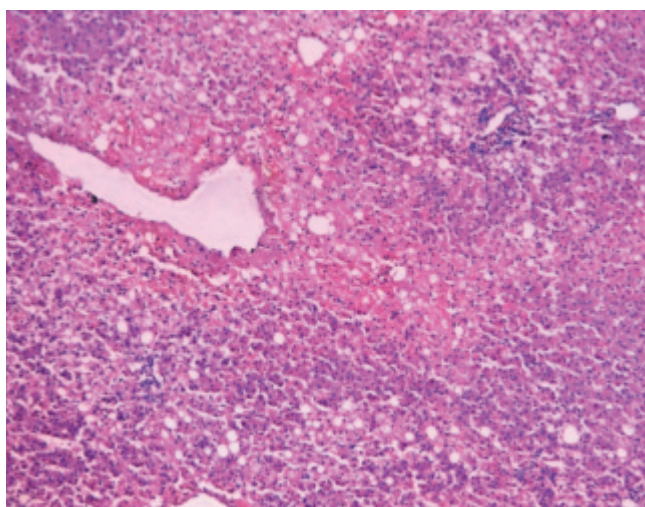


Рис. 1. Умеренно выраженное ИРП с некрозом до 30% гепатоцитов у донора группы сравнения после моделирования ишемии и реперфузии

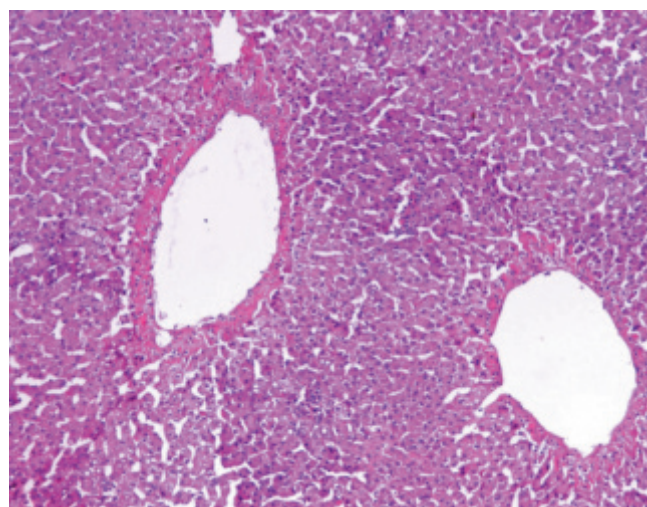


Рис. 2. Слабо выраженное ИРП с некрозом до 15% гепатоцитов у донора основной группы после моделирования ишемии и реперфузии

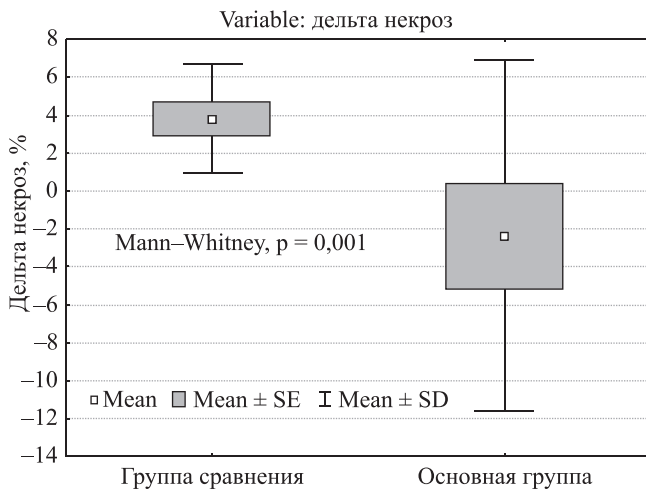


Рис. 3. Изменение степени некроза гепатоцитов после моделирования ишемии и реперфузии

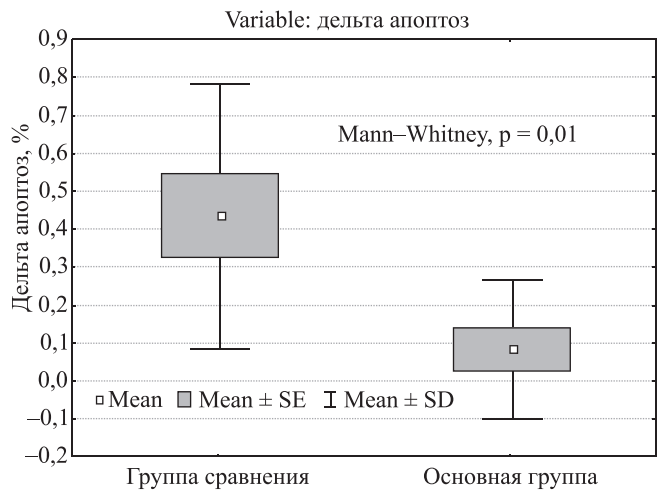


Рис. 4. Изменение степени апоптоза гепатоцитов после моделирования ишемии и реперфузии

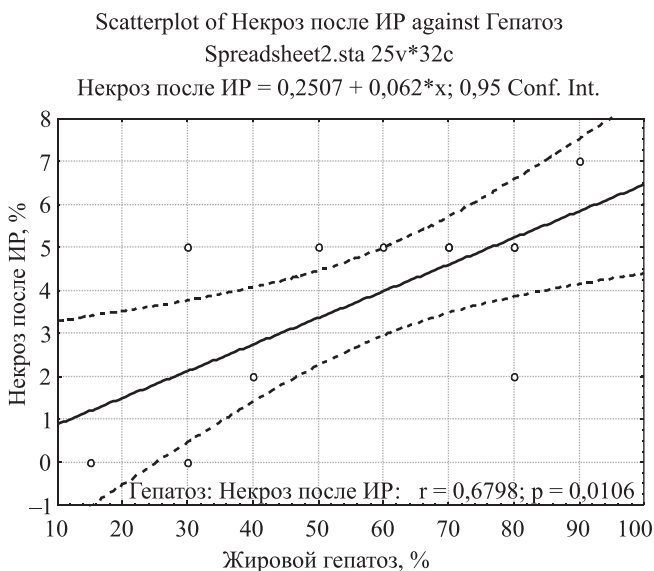


Рис. 5. Зависимость степени некроза гепатоцитов от жирового гепатоза в подгруппе доноров с уровнем стеатоза 30% и более после моделирования ишемии и реперфузии

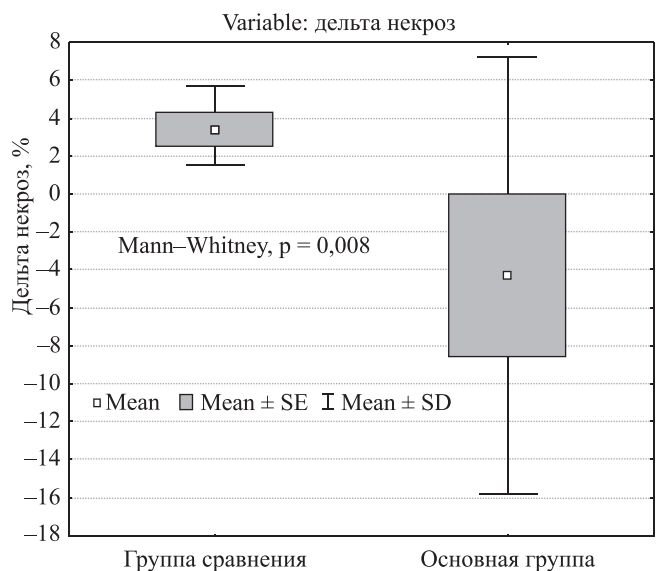


Рис. 6. Изменение степени некроза гепатоцитов после моделирования ишемии и реперфузии в подгруппе доноров с уровнем стеатоза 30% и более

жирового гепатоза 30% и более (наиболее клинически важный и часто встречаемый фактор маргинальности), которую составили 12 доноров (7 в основной группе и 5 в группе сравнения).

Так, после моделирования ишемии и реперфузии в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более изменение степени некроза гепатоцитов было еще более значимым и составило +3,4% в группе сравнения, что было достоверно выше, чем в основной группе, -4,2% (Mann-Whitney,  $p = 0,008$ ; рис. 6).

А среднее изменение степени апоптоза в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более гепатоцитов составило +0,44% в группе сравнения и было достоверно выше, чем в основной группе, +0,07 (Mann-Whitney,  $p = 0,02$ ).

По имеющимся у нас данным, это исследование является первым описанием применения фармакологического preconditionирования севофлюраном и ацетилцистеином умерших доноров с целью оценки их эффекта на ИРП в модели тепловой ишемии и реперфузии печени умершего донора с бьющимся сердцем.

В клинических исследованиях было показано, что свое протективное свойство севофлюран оказывает в разной дозе на разные органы [7]. Для печени эта концентрация должна быть не менее 0,8 минимальной альвеолярной концентрации [2]. При этом протективный эффект севофлюрана не линейный. Поэтому нет смысла увеличивать дозу более 1,0 минимальной альвеолярной концентрации. Тем более что большие дозы могут вызвать гемодинамически

значимый эффект, который может нивелировать положительные протективные свойства. В нашем экспериментальном исследовании севофлюран в указанных дозах не вызвал ни одного гемодинамически значимого эффекта.

Таким образом, морфологический анализ полученных биоптатов печени показал, что применение фармакологического прекондиционирования севофлюраном и ацетилцистеином привело к достоверному снижению прироста степени некроза гепатоцитов – с +3,8% в группе сравнения до – 2,4% в основной группе (Mann–Whitney,  $p = 0,001$ ) и степени апоптоза гепатоцитов – с +0,43% в группе сравнения до +0,08 в основной группе (Mann–Whitney,  $p = 0,01$ ). А в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более изменение разницы степени некроза гепатоцитов было еще более значимым и составило +3,4% в группе сравнения, что было достоверно выше, чем в основной группе, – 4,2% (Mann–Whitney,  $p = 0,008$ ).

На основании полученных данных можно утверждать, что применение фармакологического прекондиционирования севофлюраном и ацетилцистеином достоверно привело к уменьшению степени некроза и апоптоза гепатоцитов по сравнению с группой сравнения, т. е. обладает протективным эффектом от ишемически-реперфузионного повреждения.

Более того, протективный эффект прекондиционирования севофлюраном и ацетилцистеином более выражен в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более, что является клинически значимым эффектом и предпосылкой к клиническому применению севофлюрана и ацетилцистеина у умершего донора для уменьшения ишемически-реперфузионного повреждения печеночного трансплантата.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Применение фармакологического прекондиционирования севофлюраном и ацетилцистеином достоверно привело к уменьшению степени некроза и апоптоза гепатоцитов по сравнению с

группой сравнения, т. е. обладает протективным эффектом от ишемически-реперфузионного повреждения.

2. Более выраженный эффект прекондиционирования севофлюраном и ацетилцистеином в подгруппе доноров с уровнем жирового гепатоза 30% и более является предпосылкой к клиническому применению севофлюрана и ацетилцистеина у умершего донора для уменьшения ишемически-реперфузионного повреждения печеночного трансплантата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abu-Amaral M., Gurusamy K., Hori S.* Systematic review of randomized controlled trials of pharmacological interventions to reduce ischaemia-reperfusion injury in elective liver resection with vascular occlusion // *HPB (Oxford)*. 2010. Vol. 12 (1). P. 4–14.
2. *Beck-Schimmer B., Breitenstein S., Urech S., De Conno E. et al.* A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic // *Ann. Surg.* 2008. Vol. 248. P. 909–918.
3. *Bussutil R., Klintmalm G.* Transplantation of the liver // Elsevier. 2005. P. 186.
4. *Kakizoe S., Yanaga K., Starzl T., Demetris J.* Evaluation of protocol before transplantation and reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: Considerations of preservation and early immunological injury // *Hepatology*. 1990. Vol. 11. P. 932–941.
5. *Kiuchi T., Oldhafer K., Schlitt H., Nashan B. et al.* Background and prognostic implications of perireperfusion tissue injuries in human liver transplants: A panel histochemical study // *Transplantation*. 1998. Vol. 66. P. 737–747.
6. *Koneru B., Fisher A., He Y., Klein K. et al.* Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy // *Liver Transplantation*. 2005. Vol. 11. P. 196–202.
7. *Miller R.* *Millers Anesthesia* // Elsevier. 2010. 617 p.
8. *Ohkohchi N.* Mechanisms of preservation and ischemic/reperfusion injury in liver transplantation // *Transplantation Proceedings*. 2002. Vol. 34 (7). P. 26–35.
9. *Okamoto S., Corso C., Leiderer R., Rascher W. et al.* Role of hypotension in brain-death associated impairment of liver microcirculation and viability // *Transplant Int.* 2000. Vol. 13. P. 428–435.