

УДК 616-092.9

МЕТОДИКА ЭМБОЛИЗАЦИИ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ КРОЛИКА

Г.В. Ванатиев¹, Я.А. Гушчин¹, М.А. Горячева¹, И.Е. Макаренко¹, М.А. Ковалева^{1*}, М.Н. Макарова¹

Резюме. В последние годы значительно возросло число случаев новообразований печени во всем мире. Основным методом терапии данной нозологии является хирургическое вмешательство, в ряде случаев невозможное без предварительной стимуляции регенерации печени. Для этих целей в последнее время активно используют эмболизацию и/или химиоэмболизацию сосудов печени. Один из наиболее распространенных способов – эмболизация портальной вены (ПВЭ). Выявление соотношения «польза – риск» для агентов ПВЭ является актуальной задачей доклинических исследований. Целью данного исследования являлась оценка методики введения микросфер в портальную вену кролика. В качестве средства для эмболизации использовали микросферы на основе поливинилового спирта (ПВС) размером 0,1÷0,3 мм. В результате проведенной работы была воспроизведена методика внутривенной эмболизации печени кролика.

Ключевые слова: микросферы, эмболизация, портальная вена, кролик.

RABBIT'S PORTAL VEIN EMBOLISATION METHODS

G.V. Vanatiev¹, Y.A. Gushchin¹, M.A. Goryacheva¹, I.E. Makarenko¹, M.A. Kovaleva^{1*}, M.N. Makarova¹

Abstract. There are a huge of number people with liver tumors. The main method of treatment of this pathology is surgery, in some cases, impossible without prior stimulation of liver regeneration. For these purposes in recent years increasingly used embolization and/or chemoembolization of liver vessels. One of the most common ways – portal vein embolization (PVE). Identification of the benefit – risk ratio for PVE agents is very actually aim of studies in preclinical fields. The aim of this study was to evaluate the methods of administration of the microspheres in the portal vein of the rabbit. As means embolic microspheres used a polyvinyl alcohol with a size 0,1÷0,3 mm. In the course of this work was reproduced method of rabbit's PVE.

Keywords: microspheres, embolization, portal vein, rabbit.

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмоловский, ул. Заводская, 3, к. 245

1 – CJSC «Saint-Petersburg Institute of Pharmacy», 3/245, Zavodskaja str., v. Kuz'molovskiy, Vsevolozhskiy district, Leningrad region, 188663, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: kovaleva.ma@doclinika.ru

Тел.: +7 (960) 231 55 46

ВВЕДЕНИЕ

Согласно данным ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения), в настоящий момент гепатоцеллюлярная карцинома занимает второе место среди всех новообразований по степени летальности [1]. Ежегодно во всем мире умирает более 800 тысяч человек от данной нозологии. Пятилетняя выживаемость данных больных составляет не более 30% [2, 3]. Одним из основных методов лечения гепатоцеллюлярной карциномы является хирургическое вмешательство (оперативное удаление новообразования или трансплантация печени). Для проведения операции на печени остаточная масса неповрежденного органа должна быть не менее 20%. В ряде случаев у пациентов отмечается меньший процент неповрежденного органа. С целью индукции гепатоцеллюлярной регенерации, увеличения количества здоровой ткани проводят предоперационную эмболизацию портальной вены печени (ПВЭ), что в дальнейшем ведет к

увеличению процентного соотношения неповрежденного органа, что в свою очередь дает возможность прооперировать данных пациентов [4–7]. В ряде случаев эмболы нагружают различными противоопухолевыми агентами, проводят так называемую химиоэмболизацию, что приводит к снижению количества метастазов в дооперационный период [3].

Несмотря на важность использования эмболизации для лечения пациентов, в русскоязычной литературе практически отсутствует описание методик для тестирования различных эмболов на доклиническом этапе. Тщательный, всесторонний анализ эмболизирующих агентов на доклиническом этапе позволяет сократить время их регистрации и повысить безопасность применения у людей.

В этой статье рассматривается методика введения эмболов в портальную вену кролика на примере эмболизации микросферами. Соглас-

но литературным данным, кролики являются одним из самых популярных видов животных для проведения эмболизации [7, 8]. Это объясняется рядом причин. Во-первых, портальная вена кролика представляет собой крупный сосуд, диаметр которого составляет 5-8 мм, что позволяет провести введение в него веществ без использования специального оборудования. Во-вторых, печень кролика состоит из четырех долей, анатомическое расположение одной из которых (каудальной) не позволяет эмболизировать ее без специальных проводников [8, 9]. Таким образом, при введении в портальную вену минимум 20% печени (каудальная доля) будут неповрежденными, что обеспечивает регенерацию органа. Несмотря на то, что у кролика больше долей печени, чем у человека (4 и 2 соответственно), строение печени кролика анатомически близко к строению человеческой печени (рисунок 1).

Таким образом, **целью данного исследования** являлась оценка методики введения микросфер на основе поливинилового спирта (ПВС) в портальную вену кролика.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Данное исследование было проведено на 6 самках кроликов породы калифорнийская. К началу исследования масса животных составила 4–5 кг. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях. Проведение исследования было одобрено на заседании биоэтической комиссии ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации».

Эмбол

В качестве средства для эмболизации использовали микросферы на основе поливинилового спирта (ПВС) размером 0,1÷0,3 мм.

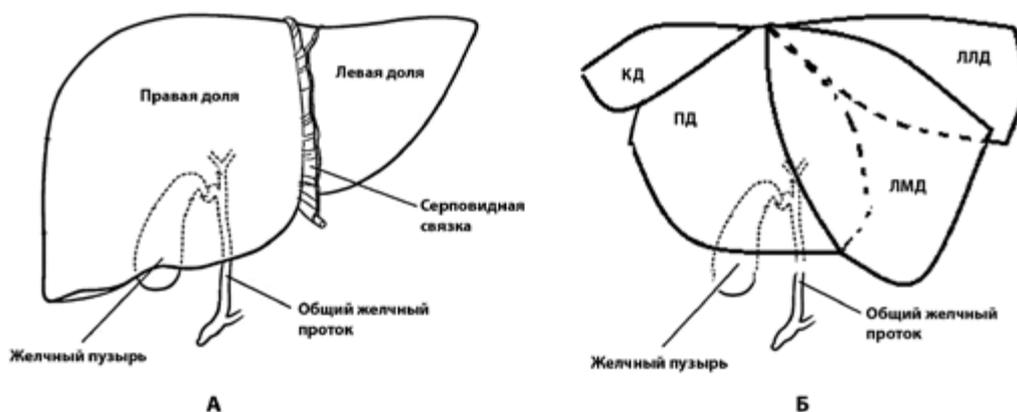


Рисунок 1. Печень человека (А) и кролика (Б). Четыре главные доли печени кролика: ПД – правая доля, ЛМД – левая медиальная доля, ЛЛД – левая латеральная доля, КД – каудальная доля

Процедура введения

Процедуру внутрипортального введения проводили в ходе оперативного вмешательства. Для общей анестезии кроликов использовали смесь раствора Золетил®100 (Virbac, Франция) (в дозе 20 мг/кг) с 2% раствором ксилазина (в дозе 3 мг/кг). После введения животных в наркоз им наносили глазную мазь («Офтагель») для предотвращения повреждения глазного эпителия за счет потери влаги. Хирургический доступ осуществляли под углом 45–50° к белой (срединной) линии живота на 1 см ниже реберной дуги (7-го ребра).

После формирования хирургического доступа у всех животных проводилась визуализация портальной вены (рисунок 2).

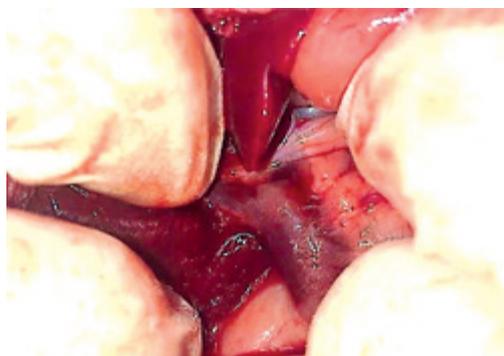


Рисунок 2. Визуализация портальной вены (стрелкой показана портальная вена)

Микросферы вводили в портальную вену при помощи катетеров [22 G (0,8×25 мм)] в объеме 5 мл. После введения микросфер в воротную вену также вводили 2 мл физиологического раствора, для того чтобы протолкнуть оставшиеся в просвете сосуда микросферы дальше по току крови, препятствуя их попаданию в каудальную долю печени. Катетер извлекали из портальной вены и аккуратно, но плотно

прижимали место инъекции стерильным марлевым тампоном на 3–5 мин для гемостаза. Все инородные предметы извлекались из брюшной полости, брюшную стенку зашивали послойно, соблюдая правила асептики и антисептики. Кожный шов обрабатывали тетрациклином.

Послеоперационный уход

После ушивания операционной раны и до выхода из наркоза животные содержались в клетках, снабженных термопластинами для предотвращения потери тепла. Во время всего этого периода за животными велось непрерывное наблюдение.

Также в послеоперационный период кроликам внутримышечно вводили кетопрофен в дозе 3 мг/кг 1 раз в день 5 дней для предотвращения развития болевого синдрома [10].

Эвтаназия, патоморфология и гистология животных

Эвтаназию первой половины животных (3 кролика) проводили через 30 мин, оставшихся – через 7 дней. Эвтаназию осуществляли передозировкой анестетика (золетил – 60 мг/кг и ксилазин – 20 мг/кг). После эвтаназии у всех животных оценивали локализацию микросфер путем морфологического анализа ткани печени. Для животных, подвергнутых эвтаназии на 7-й день исследования, проводили морфологическое исследование печени.

Для морфологического исследования образцы тканей печени были вырезаны, обезвожены, пропитаны парафином, нарезаны на срезы, окрашены гематоксилином и эозином. Исследование гистологических препаратов печени проводилось при помощи светоптического микроскопа Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 100. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Axio Cam ICc 1 (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка локализации микросфер в тканях печени

Для оценки локализации микросфер в печени проводили макроскопию долей печени непосредственно после эвтаназии. Критерием оценки являлось обнаружение микросфер в долях печени.

При макроскопии животных, эвтаназированных через 30 мин после введения, печень характеризовалась неравномерностью окраски ткани, что было обусловлено зоной ишемии (рисунок 3).

На 7-й день исследования поверхность печени была мелкобугристой, с напряженной тусклой капсулой коричневого цвета с мелкими белесоватыми пят-



Рисунок 3. Диафрагмальная (А) и висцеральная (Б) поверхность печени через 30 мин после введения микросфер

нами неправильной формы, на разрезе ткань тусклая, отечная, выделяются диффузно расположенные белесовато-желтые участки неправильной формы (рисунок 4).

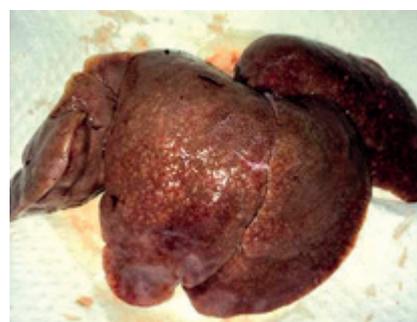


Рисунок 4. Висцеральная поверхность печени, 7-й день исследования

При эвтаназии всех животных вне зависимости от срока исследования во всех долях печени, кроме каудальной, в просвете сосудов были выявлены микросферы (рисунок 5).



Рисунок 5. Визуализация микросфер в доле печени через 30 мин после введения микросфер (А) и на 7-й (Б) день исследования

Результаты гистологического исследования печени

У животных, эвтаназированных через 30 мин после введения, гистологический анализ ткани печени не проводили в связи с малой информативностью этой процедуры. Данные животные использовались только для подтверждения попадания микросфер в ткань печени. На 7-й день исследования в тка-

ни печени наблюдались массивные очаги некроза с признаками организации. Гистологическое строение печени во всех отделах нарушено. В междольковых венах прослеживались крупные эозинофильные округлые массы (микросферы), или смешанные тромбы, частично или полностью обтурирующие просвет венозных сосудов крупного и среднего калибров. Вокруг триад ткани сдавлены, с массивной воспалительной инфильтрацией, очагами некроза и формирующейся грануляционной тканью (грануляционный вал), состоящей из молодой соединительной ткани, вновь образованных сосудов и клеток воспаления (лимфоциты, макрофаги, плазмозиты). При этом во вновь образующуюся ткань пролиферируют гепатоциты, часть из которых – с полиплоидными ядрами, что может свидетельствовать о повышенной регенеративной активности. Расположенные рядом желчные протоки, вовлеченные в патологический процесс, – с дистрофичным эпителием (рисунки 6, 7).

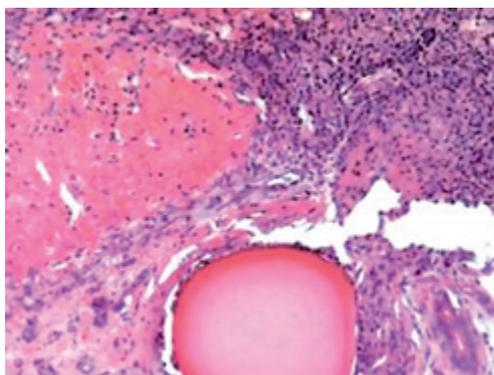


Рисунок 6. Среди некротизированной ткани вена, обтурированная микросферой, грануляционный вал (ув. 50). Окраска гематоксилин-эозином

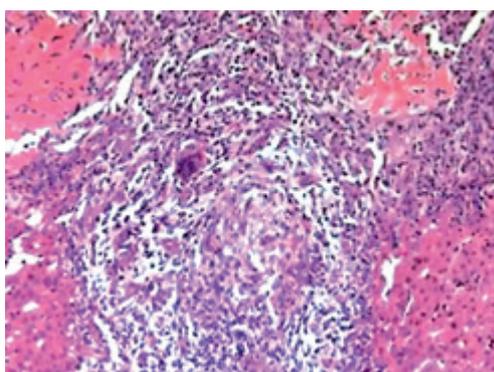


Рисунок 7. Некротизированная ткань, частично замещенная грануляционной с пролиферирующими в нее гепатоцитами (ув. 100). Окраска гематоксилин-эозином

Таким образом, на основании гистологического исследования был сделан вывод об адекватности используемой методики в качестве оценки средств для эмболизации. По аналогии с клиническим применением в ответ на эмболизацию было выявлено формиро-

вание очагов некроза, грануляционного вала. Тем не менее также было отмечено увеличение регенераторных свойств печени, что в дальнейшем значительно увеличит массовую долю здоровой печеночной ткани в условиях гепатоцеллюлярной карциномы и позволит провести операционное лечение пациента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения данной работы был воспроизведен способ внутривенной эмболизации печени кролика. При макроскопическом анализе печени было установлено, что микросферы при внутривенном введении равномерно распределяются в крапильных долях печени, практически не затрагивая каудальную долю. Гистологическое исследование печени после эмболизации микросферами показало, что введение микросфер приводит к поражению ткани печени и, как следствие, активации регенераторных свойств.

Таким образом, по результатам макроскопического и гистологического исследования была доказана адекватность использования внутривенной эмболизации печени кролика в качестве метода тестирования эмболов в доклинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рак: Информационный бюллетень, № 297, февраль 2017 / Всемирная организация здравоохранения. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/ru> (дата обращения: 11.05.2017).
2. K. Han, J.H. Kim. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma treatment: Barcelona clinic liver cancer staging system // *World Journal of Gastroenterology*. 2015. V. 21(36). P. 10327–10335.
3. V.A. Saraswat, G. Pandey, S. Shetty. Treatment algorithms for managing hepatocellular carcinoma // *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2014. V. 4(S3). P. 580–589.
4. K.P. Van Lienden. Radiological aspects of portal vein embolization: PhD thesis. – 2012. 231 p.
5. J. W. Van den Esschert, K.P. Van Lienden, W. De Graaf, M.A.W. Maas, J.J.T.H. Roelofs, M. Heger, T.M. Van Gulik. Portal vein embolization induces more liver regeneration than portal vein ligation in a standardized rabbit model // *Surgery*. 2011. V. 149(3). P. 378–385.
6. П.Г. Таразов, Д.А. Гранов, А.А. Поликарпов. Предоперационная эмболизация воротной вены у больных злокачественными опухолями печени // *Альманах Института хирургии имени А.В. Вишневского*. 2008. Т. 3. № 3. С. 23–28.
7. F. Huisman, K.P. Van Lienden, S. Damude, L.T. Hoekstra, T.M. Van Gulik. A review of animal models for portal vein embolization // *Journal of Surgical Research*. 2014. V. 191. P. 179–188.
8. W. De Graaf, J.W. Van den Esschert, K.P. Van Lienden, J.J. Roelofs, T.M. Van Gulik. A rabbit model for selective portal vein embolization // *Journal of Surgical Research*. 2011. V. 171. P. 486–494.
9. L.T. Hoekstra, K.P. Van Lienden, J. Verheij, C.M. Van Der Loos, M. Heger, T.M. Van Gulik. Enhanced tumor growth after portal vein embolization in a rabbit tumor model // *Journal of Surgical Research*. 2013. V. 180(1). P. 89–96.
10. Guidelines for Rodent & Rabbit Anesthesia, Analgesia and Tranquilization & Euthanasia Methods // Tulane University IACUC. URL: <https://tulane.edu/asvpr/iacuc/hsc/upload/Rodent-Rabbit-anesthesia-guidelines.pdf> (дата обращения: 11.06.2017).