

УДК 616.36-018:616.366-089.87:57.086.13-089.819:615.844:[615.472.3:615.837]-092.9

Є.Д. Хворостов, С.О. Бичков, О.І. Цівенко, Н.В. Черкова*, Л.М. Душик

Вплив електрокоагуляційної, крио- та ультразвукової обробки ложа жовчного міхура на ультраструктуру печінки після експериментальної холецистектомії

UDC 616.36-018:616.366-089.87:57.086.13-089.819:615.844:[615.472.3:615.837]-092.9

Ye.D. Khvorostov, S.O. Bychkov, O.I. Tsivenko, N.V. Cherkova*, L.M. Dushyk Effect of Electrocoagulation, Cryo- and Ultrasound Treatment of the Gallbladder Bed After Experimental Cholecystectomy

Резюме: Проведено порівняльний аналіз результатів електронно-мікроскопічного дослідження репаративних процесів у тканині печінки кроликів після холецистектомії, здійсненої за допомогою монополярної електрокоагуляції, ультразвуково-го скальпеля та за умов низьких температур на 1, 3, 14, 21 і 30-ту добу. Результати експерименту дозволили порівняти гемо- та холестатичні ефекти різних видів енергії, оцінити ступінь травматизації паренхіми печінки в зоні оперативного втручання, а також та вплив різних методів на якість і терміни репарації. Ультраструктурні зміни в гепатоцитах залежно від методів впливу характеризувалися різними дистрофічними і деструктивними процесами. Проведені електронно-мікроскопічні дослідження показали, що ультраструктура клітин печінки після електрокоагуляційного впливу на ложе видаленого жовчного міхура відповідала нормі на 30-ту добу, після криодії – на 21-шу добу, а після ультразвукового впливу – на 14-ту добу. Доведено, що використання ультразвукового впливу і криодії при холецистектомії порівняно з електрокоагуляцією є найменш травматичним для тканини печінки.

Ключові слова: гемостаз, криодія, печінка, репаративні зміни, ультразвуковий вплив, електрокоагуляція.

Abstract: The results of electron microscopic examination of reparative processes in liver tissue of rabbits after cholecystectomy performed with monopolar electrocoagulation, ultrasonic scalpel and at low temperatures on days 1, 3, 14, 21 and 30 were comparatively analyzed. Experimental findings allowed to compare the hemo- and cholestatic effects of different types of energy, to assess the degree of trauma to the liver parenchyma in the surgery area and the impact of different methods on the quality and timing of repair. Ultrastructural changes in hepatocytes depending on the methods of influence were characterized with various dystrophic and destructive processes. Electron microscopic studies showed that the ultrastructure of liver cells after electrocoagulation on the bed of the removed gallbladder corresponded the norm on day 30, after cryoeffect it did on day 21, and after ultrasound this was on day 14. It has been proven that the use of ultrasound and cryoeffect in cholecystectomy compared to electrocoagulation occurred to be the least traumatic for liver tissue.

Key words: hemostasis, cryoeffect, liver, reparative changes, ultrasound exposure, electrocoagulation.

У абдомінальній хірургії оперативні втручання проводяться з використанням різних фізичних факторів і створених на основі їх дії медичних приладів: моно- і біполярний дисектор, електродисектор, коагулятор, криоскальпель, а також ультразвуковий, лазерний, плазмовий, радіочастотний і водострумний скальпелі [6, 9]. Більшості з них властива селективність – руйнування клітин печінки зі збереженням цілісності судин та секреторних елементів печінки, що в ході резекції дозволяє їх кліпувати, коагулювати або лігувати залежно від діаметра [5].

На сьогодні існує безліч способів зупинки кровотечі під час операцій на печінці, проте пошук найбільш ефективного з них залишається

In abdominal surgery, the interventions are performed using various physical factors and medical devices created on their basis: mono- and bipolar dissector, electrodissector, coagulator, cryogenic scalpel, as well as ultrasonic, laser, plasma, radiofrequency and water jet scalpels [6, 11]. Most of them are characterized with selectivity, *i. e.* the destruction of liver cells while maintaining the integrity of blood vessels and secretory elements of liver, which during resection allows them to clip, coagulate or ligate depending on the diameter [5].

Today, there are many ways to prevent bleeding during liver surgery, but the search for the most effective of them remains relevant. Mono- and bi-

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Харків, Україна

VN Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. вул. Роганська 180, м. Харків, Україна 61172;
тел.: (+38 067) 630-50-46
електронна пошта: nat.vict@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

180, Roganska str., Kharkiv, Ukraine 61172;
tel.: +380 67 630 5046
e-mail: nat.vict@gmail.com

Надійшла 06.05.2019

Прийнята до друку 23.04.2020

Received May, 06, 2019

Accepted April, 23, 2020

© 2020 Ye.D. Khvorostov, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

актуальним. Моно- і біполярна коагуляція, яка поширена в лапароскопічній хірургії, не завжди забезпечує надійну зупинку кровотечі (гемостаз) у ложі жовчного міхура [3, 9, 10, 11]. Після електрокоагуляційного впливу (ЕКВ) утворюється коагуляційний некроз, який може бути субстратом для розвитку інфекційних ускладнень, вторинних кровотеч, жовчних норниць [2, 5, 8, 9]. У хірургічній практиці поширене використання кріовпливу (КВ), проте прогнозувати його результати достатньо складно через неоднорідність змін, які відбуваються в тканинах протягом та після охолодження-відігріву [1, 7].

Особливе місце серед усіх способів фізичної дисекції та коагуляції займає ультразвуковий вплив (УЗВ), за якого термічний ефект незначний, оскільки розсічення тканин досягається головним чином за рахунок кавітації. Під дією тиску й ультразвуку в тканинах фрагментуються білки і формуються тромби. Ці процеси відбуваються під впливом механічних коливань і меншою мірою за рахунок теплових ефектів [4, 9, 10].

Таким чином, для впровадження вказаних фізичних способів у хірургічну практику необхідно визначити ультраструктурні зміни тканин у зоні впливу і механізм репаративної регенерації.

Мета дослідження – вивчення динаміки ультраструктурних змін печінки кроликів за різних способів гемостазу в ложі жовчного міхура після холецистектомії з застосуванням монополярного електрокоагуляційного впливу, кріодії та ультразвукового скальпеля.

Матеріали та методи

Електронно-мікроскопічне дослідження виконували на 84 кроликах-самцях породи Шиншила масою 3,0–3,5 кг. Роботу виконували відповідно до закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог Комітету з біоетики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Усі тварини перебували в умовах віварію на стандартному харчовому режимі.

Для здійснення остаточного гемостазу в ложі видаленого жовчного міхура застосовували описані нижче прилади.

Електрохірургічний апарат ЕХВА-350М/120Б «Надія» («МЕДАН», Україна) використовують у монополярному режимі роботи. Частота струму складає (440 ± 10) кГц, максимальна вихідна

polar coagulation, which is common in laparoscopic surgery, does not always provide reliable hemostasis in the gallbladder bed [3, 9–11]. After electrocoagulation exposure (ECE), the coagulation necrosis is formed, which can be a substrate for the development of infectious complications, secondary bleeding, bile fistulas [2, 5, 8, 11]. In surgical practice, the use of cryoeffect (CE) is common, but its results are difficult to predict due to the heterogeneity of changes that occur in tissues during and after cooling-warming [1, 7].

A special place among all the methods of physical dissection and coagulation is occupied by ultrasound (US), which has a slight thermal effect, because the tissue dissection is achieved mainly through cavitation. Under the action of pressure and ultrasound in tissues the proteins are fragmented and the blood clots are formed. These processes occur under the influence of mechanical oscillations and to a lesser extent due to thermal effects [4, 9, 11].

Thus, to introduce these physical methods into surgical practice it is necessary to examine the ultrastructural changes of tissues in the affected area and the mechanism of reparative regeneration.

The aim of the research was to study the dynamics of ultrastructural changes in liver of rabbits by different hemostatic techniques in the gallbladder bed after cholecystectomy using monopolar electrocoagulation, cryoeffect and ultrasonic scalpel.

Materials and methods

Electron microscopic examination was performed in 84 male chinchilla rabbits weighing 3.0–3.5 kg. The research was performed in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of 21.02.2006) in compliance with the requirements of the Committee in Bioethics of V.N. Karazin Kharkiv National University, consistent with the provisions of the ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986). All the animals were kept in the Animals House on a standard diet.

To achieve final hemostasis in the removed gallbladder bed we used the following devices.

Electrosurgical device EHVA-350M / 120B ‘Nadiya’ (MEDAN, Ukraine) is used in monopolar mode. The current frequency makes (440 ± 10) kHz, the maximum output power is 500 Ohms, the nominal load in the cutting mode is (220 ± 40) W, in the monopolar coagulation mode is (100 ± 28) W.



потужність – 500 Ом, номінальне навантаження у режимі різання – (220 ± 40) Вт, у режимі монополярної коагуляції – (100 ± 28) Вт.

Кріоаплікатор КГ-01 КМТ («Прогрес Мед», Росія) має діаметр наконечника 2 мм. Температура $(-80,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ на його робочій поверхні досягається подачею оксиду азоту (I) N_2O . Тривалість кріодії становить 2–3 хв. Температурний контроль здійснюється за допомогою мідьконстантанової термопари на автоматичному самозаписуючому потенціометрі АКС-4-003 («Мера-тест», Росія). Температура в центрі зони КВ досягає -39°C із діаметром загальної зони льодоутворення 13–15 мм, ближче до периферії температура тканини поступово підвищується до 0°C .

Ультразвукова хірургічна установка «Harmonic scalpel Ultracision» («Ethicon Endo Surgery», США) працює в режимах «коагуляції» та «розсічення» з частотою коливань робочої частини 55,5 кГц, амплітудою руху леза 50–100 мкм, температурою в зоні впливу $37\text{--}63^\circ\text{C}$.

Залежно від способу видалення жовчного міхура і способу гемостазу всі тварини були розділені на групи. У кроликів групи 1 видалення жовчного міхура і гемостаз у ложі жовчного міхура виконували за допомогою монополярної електрокоагуляції, у групі 2 після холецистектомії ножицями проводили гемостаз шляхом кріогенної обробки ложа жовчного міхура лапароскопічним кріоаплікатором, у групі 3 для холецистектомії та гемостазу використовували ультразвуковий скальпель. Тварин оперували під внутрішньовенним тіопенталовим наркозом. Контрольну групу склали 6 кроликів без оперативного втручання.

Електронно-мікроскопічне дослідження зразка тканини печінки, який брали на межі з зоною впливу, виконували на 1, 3, 14, 21 і 30-ту добу після операції. Фрагменти печінки фіксували в 2,5%-му розчині глютарового альдегіду («SPI-Chem», США) на фосфатному буфері протягом 4 годин і в 1%-му розчині тетроксид осмію («SPI-Chem») протягом 2 год за температури 4°C . Зразки тканини зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації й абсолютному ацетоні. Фрагменти тканини просочували і заливали сумішню епоксидних смол епон-аралдиту («SPI-Chem»). Ультратонкі зрізи готували на ультрамікротомі «УМТП-6 АТ» («Selmi», Україна), контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю та вивчали під електронним мікроскопом «ЕОМ-100 БР АТ» («Selmi») за прискорюючої напруги 75 кВ.

Результати та обговорення

У тварин групи 1 через добу після операції на межі з зоною впливу в клітинах печінки спо-

The KG-01 KMT cryoapplicator (Progress-Med, Russia) has a tip diameter of 2 mm. The temperature $(-80.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ on its operating surface is achieved by the supply of nitric oxide (I) N_2O . The duration of cryoeffect is 2–3 minutes. Temperature was controlled by means of a copper-constantan thermocouple with automatic self-recording potentiometer АКС-4-003 (Meratest, Russia). The temperature in the center of the CE zone reaches -39°C with the diameter of the general ice formation zone of 13–15 mm, closer to the periphery the tissue temperature gradually rises to 0°C .

The harmonic scalpel (Ultracision, Ethicon Endo Surgery, USA) provides the modes of 'coagulation' and 'dissection' with an oscillation frequency of 55.5 kHz, 50–100 μm blade amplitude, the temperature in the affected area of $37\text{--}63^\circ\text{C}$.

Depending on the method of the gallbladder removal and hemostatic technique, all animals were divided into groups. In rabbits of group 1 the gallbladder removal and hemostatic technique in the gallbladder bed was performed by monopolar electrocoagulation, in group 2 after cholecystectomy with scissors the hemostatic technique included cryogenic treatment of the gallbladder bed with a laparoscopic cryoapplicator, in group 3 there was used ultrasound for cholecystectomy and as a hemostatic technique. Animals were operated under intravenous thiopental anesthesia. The control group consisted of 6 rabbits without surgery.

Liver tissue, sampled on the border with the affected area, was examined with electron microscope on days 1, 3, 14, 21 and 30 after surgery. Liver fragments were fixed in a 2.5% solution of glutaraldehyde (SPI-Chem, USA) with a phosphate buffer for 4 hours and in a 1% solution of osmium tetroxide (SPI-Chem) for 2 hours at 4°C . Tissue samples were dehydrated in increasing concentration of ethanol and absolute acetone. Tissue fragments were impregnated and filled with a mixture of epon-araldite epoxy resins (SPI-Chem). Ultrathin sections were prepared with an ultramicrotome 'UMTP-6 AT' (Selmi, Ukraine), contrasted with uranyl acetate and lead citrate and studied with an electron microscope 'Computer-100 BR AT' (Selmi) at an accelerating voltage of 75 kV.

Results and discussion

In animals of group 1 a day after surgery on the border with the zone of the effect in liver cells there were observed ultrastructural changes of



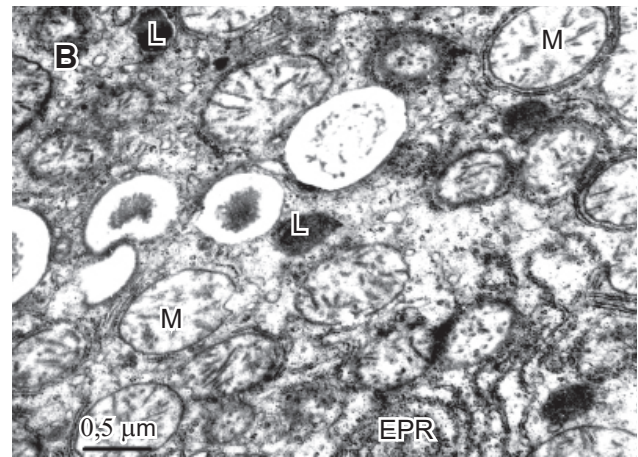
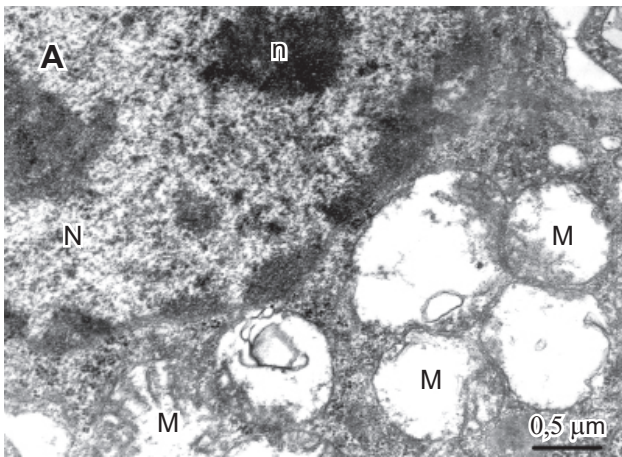


Рис. 1. Ультраструктура фрагментів гепатоцитів кроликів через 1-шу добу після ЕКВ у ложі жовчного міхура: **А** – набухання мітохондрій і дезорганізація крист; **В** – різні види лізосом у цитоплазмі. N – ядро; n – ядерце; M – мітохондрії; EPR – ендоплазматичний ретикулум; L – лізосоми.

Fig. 1. Ultrastructure of fragments of rabbit hepatocytes in by the 1st day after ECE in gallbladder bed: **A** – mitochondria swelling and cristae disorganization; **B** – different types of lysosomes in cytoplasm. N – nucleus; n – nucleolus; M – mitochondria; EPR – endoplasmic reticulum; L – lysosomes.

стерігалися ультраструктурні зміни органел, характерні для початку розвитку запальної реакції. Перинуклеарний простір ядер був помірно розширений. У цитоплазмі виявлялися набряклі мітохондрії з матриксом низької електронної щільності та дезорганізацією крист (рис.1, А). Гранулярний ендоплазматичний ретикулум (ЕПР) характеризувався вираженим розширенням і вакуолізацією цистерн, спостерігалось порушення цілісності окремих ділянок мембран. Комплекс Гольджі був гіпертрофований, у зоні локалізації якого спостерігалися лізосоми та ліпідні краплі (рис. 1, В). Жовчні капіляри і простори Діссе були помірно розширені та містили поодинокі набряклі мікроворсинки. У цитоплазмі ендотеліоцитів синусоїдних капілярів виявлялися набряклі мітохондрії з осередковою деструкцією зовнішніх мембран і крист та вакуолізовані цистерни гранулярного ЕПР.

На 3-тю добу після ЕКВ визначалися як деструктивні, так і дистрофічні зміни клітин печінки. Ядра гепатоцитів мали просвітлений матрикс і нерівномірний розподіл хроматину. Виявлялися глибокі інвагінації ядерної мембрани і розширення перинуклеарного простору. Ознаками деструктивних змін мітохондрій були їх значне набрякання, зменшення кількості, везикуляція крист та лізис зовнішніх мембран. Гранулярний ЕПР характеризувався значною вакуолізацією цистерн і осередковим лізисом мембран. Кількість гранул глікогену у цитоплазмі гепатоцитів істотно зменшилася. Комплекс Гольджі представлено великими вакуолями. Поряд із первинними лізосомами з'являлася велика кількість аутофагосом. Жовчні капіляри

organelles, characteristic of the inflammation onset. The perinuclear space of the nuclei was moderately expanded. Swollen mitochondria with a low electron density matrix and disorganization of crystals were found in cytoplasm (Fig. 1A). Granular endoplasmic reticulum (EPR) was characterized with a pronounced expansion and vacuolation of the tanks, there was a disordered integrity of individual sections of the membranes. The Golgi complex was hypertrophied, in the area of localization of which the lysosomes and lipid droplets were observed (Fig. 1B). The bile capillaries and spaces of Disse were moderately dilated and contained single swollen microvilli. Swollen mitochondria with focal destruction of outer membranes and cristae as well as vacuolated granules of granular EPR were found in cytoplasm of sinusoidal capillary endothelial cells.

On day 3 after ECE, both destructive and dystrophic changes of liver cells were determined. The nuclei of hepatocytes had an enlightened matrix and uneven distribution of chromatin. Deep invaginations of the nuclear membrane and the perinuclear space expansion were revealed. Signs of destructive changes in mitochondria were their significant swelling, decrease in number, vesicle crystallization and lysis of outer membranes. Granular EPR was characterized by significant vacuolation of tanks and focal lysis of membranes. The number of glycogen granules in cytoplasm of hepatocytes decreased significantly. The Golgi complex is represented by large vacuoles. Along with the primary lysosomes, a large number of autophagosomes appeared. The bile capillaries were dilated and filled with a low electron

були розширені та заповнені субстанцією низької електронної щільності. Поблизу жовчних капілярів часто спостерігалися великі включення ліпідів. Цілісність цитоплазматичної мембрани деяких гепатоцитів була порушеною. Простори Діссе місцями були звужені, а синусоїдні капіляри – розширені. У цитоплазмі ендотеліоцитів зустрічалися осередки деструкції каріолеми, мембран мітохондрій, а також цистерн гранулярного ЕПР. У просвіті капілярів виявлялися скупчення клітинного детриту.

На 14-ту добу у тварин групи 1 завершилося формування щільного сполучнотканинного рубця в зоні коагуляційного некрозу. Зміни ультраструктури клітин печінки на межі зони дії мали в основному дистрофічний характер і зберігалися до 21-ї доби. Ядра гепатоцитів містили великі скупчення гетерохроматину, а їх цитоплазма була істотно розрідженою (рис. 2). Органели цитоплазми концентрувалися поблизу ядра. Мітохондрії мали просвітлений матрикс і дезорганізовані кристи. Для багатьох гепатоцитів була характерна гіперплазія мембран гранулярного ЕПР. Комплекс Гольджі містив лізосомоподібні тільця, заповнені осміофільною субстанцією. Зміни ультраструктури ендотеліоцитів синусоїдних капілярів були аналогічними таким на попередньому терміні спостереження.

На 30-ту добу після ЕКВ зміни ультраструктури клітин печінки в досліджуваній зоні були мінімальними та виражалися в незначному розширенні перинуклеарного простору і цистерн ЕПР, дезорганізації крист деяких мітохондрій. Порушень комплексу Гольджі, плазмолем, жовчних і синусоїдних капілярів не виявлено.

Дослідження тканини печінки тварин групи 2, яким гемостаз проводили за допомогою КВ, на 1-шу і 3-тю добу в ділянці, яка розташовувалася поряд із зоною кріонекрозу, виявило деструктивні зміни клітин (рис. 3, А), проте вони були менш виражені, ніж у тварин групи 1. На 3-тю добу з'являлися перші ознаки внутрішньоклітинної репарації. Формування сполучнотканинного рубця з пухким розташуванням волокон відбувалося вже на 7-му добу спостереження.

На 14-ту добу після оперативного втручання зміни ультраструктури клітин печінки були мінімальними з переважанням процесів регенерації. Ядра гепатоцитів мали типову структуру і дрібнозернистий матрикс, часто спостерігалися великі ядерця біямембранної локалізації, що, як і гіперплазія цистерн гранулярного ЕПР, свідчить про активацію процесів біосинтезу.

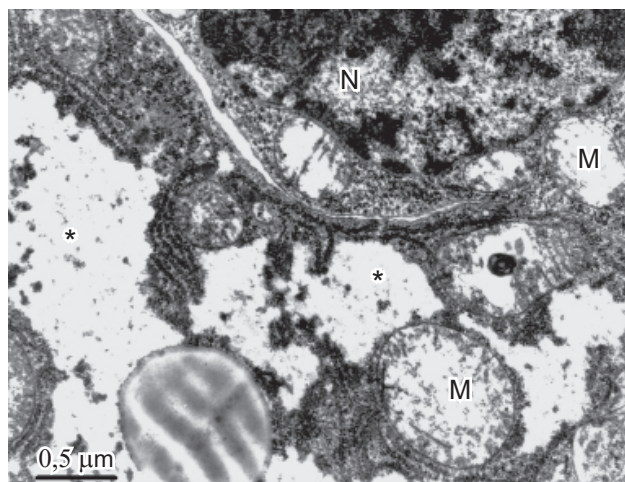


Рис. 2. Розрідження цитоплазми (*) і просвітлення матриксу мітохондрій (М) гепатоцитів на 14-шу добу після ЕКВ у ложі жовчного міхура. N – ядро.

Fig. 2. Loosening of cytoplasm (*) and enlightenment of mitochondrial matrix (M) of hepatocytes on day 14 after ECE in gallbladder bed. N – nucleus.

density substance. Large lipid inclusions were often observed near the bile capillaries. The integrity of cytoplasmic membrane of some hepatocytes was disordered. Disse spaces were narrowed somewhere, and sinusoidal capillaries were expanded. In cytoplasm of endotheliocytes there were the foci of destruction of karyolemma, mitochondrial membranes, as well as granular EPR tanks. Accumulations of cell detritus were found in the lumen of capillaries.

On day 14 in animals of group 1 the formation of a dense connective tissue scar in the area of coagulation necrosis completed. Changes in the ultrastructure of liver cells at the boundary of the zone of effect were mainly dystrophic in nature and persisted until the 21st day. The nuclei of hepatocytes contained large accumulations of heterochromatin, and their cytoplasm was significantly loosened (Fig. 2). Cytoplasmic organelles were concentrated near the nucleus. Mitochondria had an enlightened matrix and disorganized cristae. Many hepatocytes were characterized by hyperplasia of the granular EPR membranes. The Golgi complex contained lysosomal bodies filled with an osmophilic substance. Changes in the ultrastructure of sinusoidal capillary endothelial cells were similar to those in the previous observation period.

On day 30 after ECE the changes in ultrastructure of liver cells in the area studied were minimal and were expressed in a slight expansion of the perinuclear space and EPR tanks, disorganization of the crystals of some mitochondria. Disorders of the Golgi complex, plasmolem-



Мітохондрії багатьох клітин перебували в стані функціональної напруги: помірне просвітління, ущільнення матриксу та дезорганізація крист (рис. 3, В). У частині гепатоцитів зберігалось розширення цистерн ЕПР. Порушень із боку комплексу Гольджі, плазмолем, жовчних і синусоїдних капілярів, а також ендотеліоцитів не виявлено.

На 21-шу добу у кроликів групи 2 ультраструктура клітинних елементів печінки практично відповідала нормі.

У експериментальних тварин групи 3 через добу після застосування УЗВ відзначалися дистрофічні зміни органел клітин печінки без ознак вираженої деструкції, в ядрах гепатоцитів переважав еухроматин зі зкупченнями дрібних грудочок гетерохроматину по периферії ядра. Спостерігалось розширення перинуклеарного простору. У цитоплазмі виявлялися набряклі мітохондрії з дезорганізованими кристами.

Цистерни гранулярного ЕПР мали вигляд електронно світлих вакуолей із дрібнодисперсним вмістом, на мембранах яких розташовувалися рибосоми (рис. 4, А). У цитоплазмі зменшувалася кількість полісом. Комплекс Гольджі мав вигляд зупинки доволі орієнтованих гладких мембран, оточених везикулами різних розмірів. Жовчні капіляри і простори Діссе розширені та заповнені набряклими мікроросинками. Виявлявся набряк цитоплазми і мітохондрій ендотеліоцитів синусоїдних капілярів. Цистерни гранулярного ЕПР розширені та місцями вакуолізовані, кількість рибосом зменшена. Спостерігалось порушення цілісності перисинусоїдальної частини цитоплазматичної мембрани ендотеліоцитів.

На 3-тю добу ультраструктура гепатоцитів свідчила про початок розвитку репаративної регенерації клітин. У ядрах гепатоцитів виявлявся деконденсований хроматин, рівномірно розподілений по ядру. У структурі ядерної мембрани істотних змін не виявлялось, але перинуклеарні простори були помірно розширені. Матрикс мітохондрій мав низьку електронну щільність із частково дезорганізованими кристами. Іноді зустрічалися мітохондрії, які діляться. Цистерни гранулярного ЕПР незначно розширені. Кількість вільних рибосом і полісом була збільшеною. У цитоплазмі гепатоцитів виявлялася значна кількість гранул глікогену, вакуолей гладкого ЕПР і лізосом (рис. 4, В). Комплекс Гольджі мав типову будову. У цитоплазмі ендотеліоцитів синусоїдних капілярів спостерігалися набряклі мітохондрії, цистерни гранулярного ЕПР і мікропіноцитозні везикули.

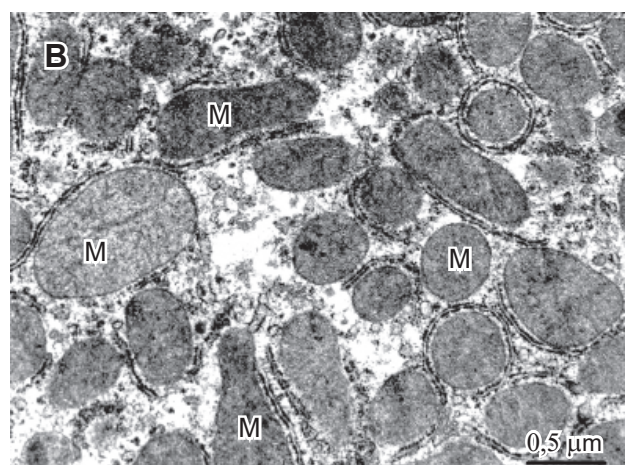
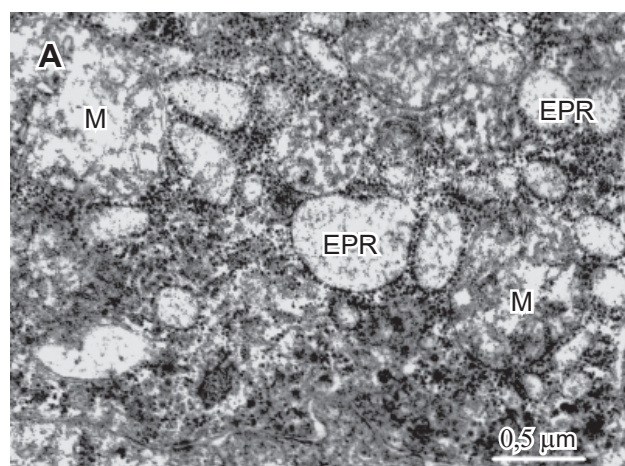


Рис. 3. Ультраструктура органелів цитоплазми гепатоцитів у ложі жовчного міхура після КВ: **А** – вакуолізація цистерн ЕПР і набухання мітохондрій (М) на 3-тю добу; **В** – мітохондрії у різному функціональному стані через 14 діб.

Fig. 3. Ultrastructure of hepatocyte cytoplasm organelles in gallbladder bed after CE: **A** – vacuolation of EPR tanks and swelling of mitochondria (M) on the 3rd day; **B** – mitochondria in different functional state after 14 days.

ma, bile and sinusoidal capillaries were not detected.

Examination of the liver tissue of group 2 animals, the hemostatic technique for those was performed using CE, on the 1st and 3rd days in the area located near the cryonecrosis site, revealed destructive changes in cells (Fig. 3A), but they were less pronounced than in the animals of group 1. On day 3 the first signs of intracellular repair appeared. The formation of a connective tissue scar with a loose arrangement of fibers occurred on the 7th day of observation.

On day 14 after surgery, changes in the ultrastructure of liver cells were minimal with a regeneration predominance. The nuclei of hepatocytes had a typical structure and fine-grained matrix, large nucleoli of near-membrane localization were often observed, which, like hyperplasia



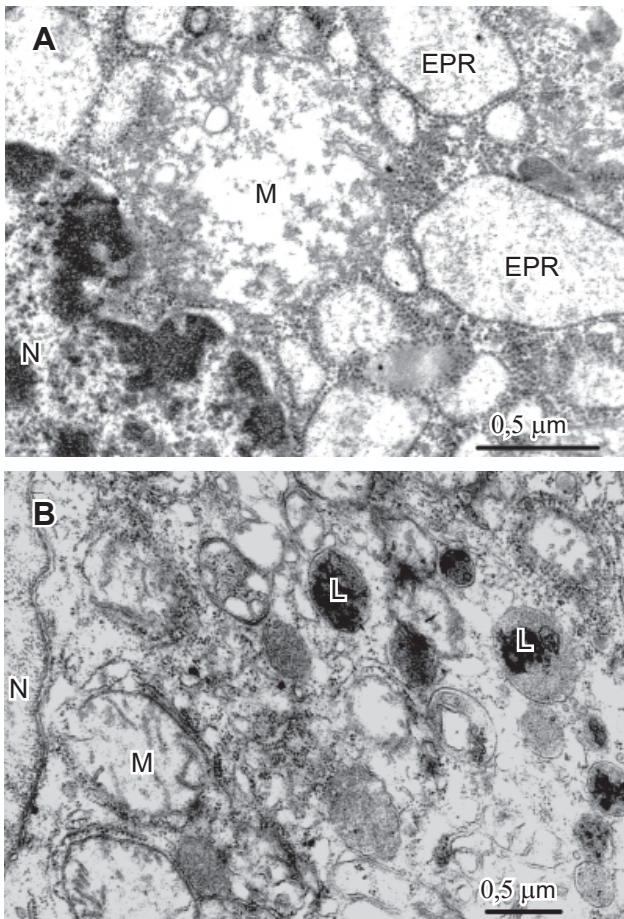


Рис. 4. Ультраструктура гепатоцитів у ложі жовчного міхура після УЗВ: **А** – набухання мітохондрій (М) і вакуолізація цистерн ЕПР через добу після операції; **В** – скупчення лізосомоподібних структур у навколишньоядерній зоні цитоплазми на 3-тю добу після операції. L – лізосоми, N – ядро.

Fig. 4. Ultrastructure of hepatocytes in gallbladder bed after ultrasound: **A** – swelling of mitochondria (M) and vacuolation of EPR tanks in a day after surgery; **B** – accumulation of lysosomal structures in surrounding nuclear zone of cytoplasm on the 3rd day after surgery. L – lysosomes, N – nucleus.

На 14-ту добу ультраструктура клітин печінки відновилася і мала типову будову. Ядра гепатоцитів були округлої форми з рівномірно розподіленим хроматином і чітко контурованою каріолею. Більшість мітохондрій містили матрикс середньої електронної щільності з чітко вираженими кристами. Спостерігалися гіпертрофія і гіперплазія елементів гранулярного ЕПР, які виявлялися у збільшенні кількості цистерн і прикріплених до них рибосом, а також у розширенні каналців. Комплекс Гольджі зберігав типову локалізацію, проте іноді ці клітини були гіпертрофованими. У цитоплазмі виявлялися скупчення гранул глікогену, лізосомоподібні тільця та поодинокі ліпідні краплі. Жовчні капіляри місцями розширені. Простори

of granular EPR tanks, indicates the activation of biosynthesis processes. Mitochondria of many cells were in a state of functional stress: moderate enlightenment, matrix compaction and disorganization of the cristae (Fig. 3B). In part of hepatocytes the expansion of EPR tanks remained. Disorders of the Golgi complex, plasmolemma, bile and sinusoidal capillaries, as well as endotheliocytes were not detected.

On day 21 in rabbits of group 2, the ultrastructure of liver cell elements was almost normal.

In experimental animals of group 3 a day after the use of ultrasound there were dystrophic changes of liver cell organelles without the signs of severe destruction, in the nuclei of hepatocytes there was euchromatin domination with the clusters of small lumps of heterochromatin on the periphery of the nucleus. The perinuclear space was expanded. Swollen mitochondria with disorganized cristae were found in cytoplasm.

Granular EPR tanks had the form of electronically light vacuoles with fine content, on the membranes of which ribosomes were located (Fig. 4A). In cytoplasm the number of polysomes decreased. The Golgi complex had the appearance of an accumulation of arbitrarily oriented smooth membranes surrounded by vesicles of various sizes. The bile capillaries and spaces of the Disse are dilated and filled with swollen microvilli. Cytoplasmic edema and mitochondria of sinusoidal capillary endothelial cells were detected. Granular EPR tanks are expanded and vacuolated in places, the number of ribosomes is reduced. Disordered integrity of the perisinusoidal part of the cytoplasmic membrane of endothelial cells was observed.

On day 3, the ultrastructure of hepatocytes indicated the beginning of the development of reparative cell regeneration. In the nuclei of hepatocytes was found decondensed chromatin, evenly distributed throughout the nucleus. There were no significant changes in nuclear membrane structure, but the perinuclear spaces were moderately expanded. The mitochondrial matrix was low electron density with partially disorganized crystals. Occasionally there are mitochondria that divide. Granular EPR tanks are slightly expanded. The number of free ribosomes and polysomes was increased. In cytoplasm of hepatocytes there was found a significant number of glycogen granules, vacuoles of smooth EPR and lysosomes (Fig. 4B). The Golgi complex was of a typical structure. Swollen mitochondria, granular EPR tanks, and micropinocytic vesicles



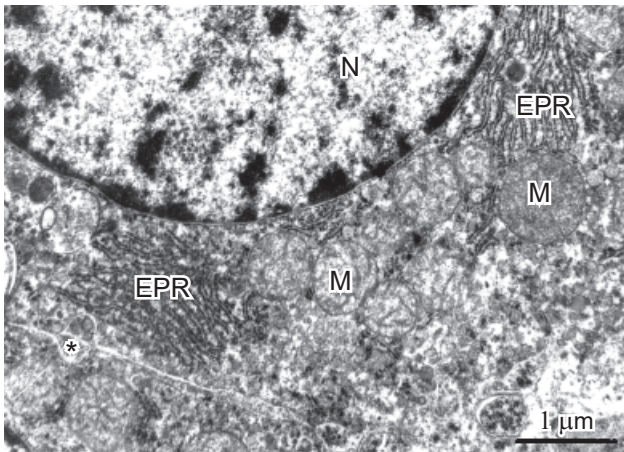


Рис. 5. Нормалізація ультраструктури гепатоцитів у ложі жовчного міхура на 21-шу добу після УЗВ. М – мітохондрії, EPR – ендоплазматичний ретикулум.

Fig. 5. Normalization of ultrastructure of hepatocytes in gallbladder bed on day 21 after ultrasound. M – mitochondria, EPR – endoplasmic reticulum.

Діссе мали нормальну ширину і були заповнені звитими мікроворсинками. Ультраструктура ендотеліоцитів синусоїдних капілярів наближалася до норми.

На 21-шу добу після УЗВ повністю відновилася ультраструктура всіх клітинних компонентів печінки. Ультраструктура ядра і органоїдів цитоплазми гепатоцитів свідчила про високу функціональну активність клітин. Ядра, заповнені деконденсованим хроматином, містили 1–2 великих ядерця. Цистерни гранулярного ЕПР розташовувалися поблизу ядра і мітохондрій, часто контактували з ними (рис. 5). Численні мітохондрії мали матрикс середньої електронної щільності та чітко виражені кристи. Структура ендотеліоцитів синусоїдних капілярів відповідала нормі.

Таким чином, результати експериментального дослідження ультраструктурної організації клітин печінки після ЕКВ, КВ і УЗВ, проведених під час холецистектомії з метою гемо- та холестази, свідчать про розвиток репаративних процесів у паренхімі в різні терміни спостереження. Перші ознаки регенерації тканин після ЕКВ спостерігалися на 14-ту добу, після КВ і УЗВ – на 3-ту добу. Ультраструктурна організація клітин печінки відновлювалася та набувала типової будови після КВ і УЗВ раніше, ніж після ЕКВ, що свідчить про більш шадну їх дію.

Застосування КВ і УЗВ попереджає некроз тканин, пошкодження дрібних кровоносних судин і жовчних шляхів сприяє швидкому формуванню сполучнотканинного рубця та мінімізує ризик розвитку інтра- та післяопераційних ускладнень.

were observed in cytoplasm of sinusoidal capillary endothelial cells.

On day 14, the ultrastructure of liver cells was restored and had a typical structure. The nuclei of hepatocytes were round with a uniformly distributed chromatin and a clearly contoured karyolemma. Most mitochondria contained a medium electron density matrix with distinct crystals. Hypertrophy and hyperplasia of granular EPR elements were observed, which were manifested in an increased number of tanks and ribosomes attached to them, as well as in the expansion of tubules. The Golgi complex retained its typical localization, but sometimes these cells were hypertrophied. Accumulations of glycogen granules, lysosomal bodies and single lipid droplets were detected in the cytoplasm. The bile capillaries were somewhere dilated. Disse spaces were of normal width and were filled with curled microvilli. The ultrastructure of endothelial cells of sinusoidal capillaries approached to the norm.

On day 21 after ultrasound, the ultrastructure of all cell components of liver completely restored. The ultrastructure of the nucleus and organelles of cytoplasm of hepatocytes showed a high functional activity of cells. Nuclei filled with decondensed chromatin contained 1–2 large nucleoli. Granular EPR tanks were located near the nucleus and mitochondria, often in contact with them (Fig. 5). Numerous mitochondria had a medium electron density matrix and distinct cristae. The structure of endothelial cells of sinusoidal capillaries was normal.

Thus, the results of an experimental study of ultrastructural organization of liver cells after ECE, CE and US, performed during cholecystectomy for achieving the hemo- and cholestasis, indicate the development of reparative processes in the parenchyma at different observation terms. The first signs of tissue regeneration after ECE were observed on day 14, after CE and US were found on day 3. The ultrastructural organization of liver cells was restored and acquired a typical structure after CE and US earlier than after ECE, which indicates a more gentle action.

The use of CE and ultrasound prevents tissue necrosis, damage to small blood vessels and bile ducts, promotes the rapid formation of connective tissue scar and minimizes the risk of intra- and post-surgery complications.

The obtained experimental data can be used to develop new approaches and modern techniques of gentle dissection of liver tissues in laparoscopic surgery.



Отримані експериментальні дані можуть бути використані для розробки нових підходів і сучасних технологій щадного розтину тканин печінки в лапароскопічній хірургії.

Висновки

Використання УЗВ і КВ під час холецистектомії порівняно з ЕКВ є найменш травматичним для тканини печінки, викликає незначне запалення паренхіми печінки, сприяє більш швидкому відновленню структури клітин і завершенню фази регенерації з формуванням нижнього сполучнотканинного рубця.

Нормалізація ультраструктури клітин печінки після ЕКВ відбувалася на 30-ту добу, після КВ – на 21-ту добу, а після УЗВ – на 14-ту добу.

Експерименти виконані відповідно до комплексних науково-дослідних робіт кафедри хірургічних хвороб Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна «Розробка малоінвазивних оперативних втручань у лікуванні хворих на жовчнокам'яну хворобу, виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки» (номер державної реєстрації 0100U005308) та «Вивчення дії фізичних методів і морфофункціонального стану судин, тканин шлунка, тонкого й товстого кишечника при їх дисекції та коагуляції у хірургії шлунково-кишкового тракту» (номер державної реєстрації 0106U001585).

Література

1. Александров ВВ, Маскин СС, Иголкина ЛА, и др. Перспективы использования локального криогемостаза при травмах печени и селезенки. Кубанский научный медицинский вестник. 2013; 142(7): 45–51.
2. Асташов ВЛ, Солонцова ЕН, Мухтарулина СВ. Применение высоких технологий в хирургии печени. Военно-медицинский журнал. 2013; 334(8): 30–4.
3. Байжаркинова АБ. Хирургические аспекты осложнений ЛХЭ и ТХЭ. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014; 12(1): 86–9.
4. Бауткин АВ, Елеев АА, Меликова СГ. Изучение эффективности ультразвукового скальпеля «Ultracision Harmonic Scalpel» в эксперименте на животных. Медицинский вестник Юга России. 2013; (3): 28–30.
5. Бойко ВВ, Ремнева НА, Черняев НС, и др. Патоморфологические особенности резекционного края печени непосредственно после использования аппарата высокочастотной электрохирургической сварки и монополярного электрокоагулятора. Новости хирургии. 2015; 23(3): 256–61.
6. Мелконян ГГ, Мумладзе РБ. Использование лазерных технологий при лапароскопической холецистэктомии. Альманах Института хирургии имени А.В. Вишневского. 2015; 10(1): 2–3.
7. Одишелашвили ГД, Исмаилов ЭХ. Выбор способов остановки кровотечения при повреждении печени. Астраханский медицинский журнал. 2012; 7(1): 124–6.
8. Пахлеваян ВГ, Колесников СА. Электрокоагуляционный гемостаз, преимущества и недостатки. Научные ведомости

Conclusions

The use of ultrasound and CE during cholecystectomy compared to ECE is the least traumatic to liver tissue, causes minor inflammation of liver parenchyma, promotes faster recovery of cell structure and completion of a regeneration phase with the formation of a delicate connective tissue scar.

Normalization of the ultrastructure of liver cells after ECE occurred on the 30th day, after cryopreservation it was noted on day 21, and on day 14 after ultrasound.

The experiments were performed in accordance with the comprehensive research work of the Department of Surgical Diseases of V.N. Karazin Kharkiv National University 'Development of minimally invasive surgical interventions in treatment of patients with gallstone disease, gastric and duodenal ulcers', State Registration Number (№ 0100U005308) and 'Study of effect of physical methods and morphofunctional condition of blood vessels, gastrointestinal tract coagulation in surgery of gastrointestinal tract' (№ 0106U001585).

References

1. Aleksandrov VV, Maskin SS, Igolkina LA, et al. [Prospects for the use of local cryohemostasis in cases of liver and splenic trauma]. Kubanskiy Nauchnyi Meditsinskiy Vestnik. 2013; 142(7): 45–51. Russian.
2. Astashov VL, Solontsova EN, Mukhtarulina SV. [Application of high technology in liver surgery]. Voen-Med Zh. 2013; 334(8): 30–4. Russian.
3. Bayzharkinova AB. [Surgical aspects of complications of LCE and TCE]. International Journal of Applied and Fundamental Research 2014;12(1): 86–9. Russian.
4. Bautkin AV, Eleev AA, Melikova SG. [Study of efficacy of ultrasonic scalpel 'Ultracision Harmonic Scalpel' in the experiment on laboratory animals]. Meditsinskiy Vestnik Yuga Rossii. 2013; (3): 28–30. Russian.
5. Boyko VV, Remnyova NA, Chernyayev NS, et al. [Some pathomorphological features of the resection edge of the liver immediately after using the apparatus of high-frequency electrosurgical welding and monopolar electrocoagulator]. Novosti Khirurgii. 2015; 23(3): 256–61. Russian.
6. Melkonyan GG, Mumladze RB. [Using laser technology for laparoscopic cholecystectomy]. Al'manakh Instituta Khirurgii imeni A.V. Vishnevskogo. 2015; 10(1): 2 – 3. Russian.
7. Odishelashvili GD, Ismailov EH. [The choice of ways of hemorrhage stoppage in case of liver damage]. Astrakhanskiy Meditsinskiy Zhurnal. 2012; 7(1): 124–6. Russian.
8. Pakhlevanyan VG, Kolesnikov SA. [Electrode coagulation hemostasis, advantages and disadvantages]. Belgorod State University Scientific bulletin Medicine Pharmacy 2016; 33(5): 5–9. Russian.
9. Perez Lezana MA, Villarreal CG, Cumpulido LP, et al. Comparative study of ambulatory laparoscopic cholecystectomy versus management of laparoscopic cholecystectomy with conventional hospital stay. Cir Esp. 2013; 9(7): 424–31.
10. Solej M, Martino V, Mao P, et al. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis. Minerva Chir. 2012; 67 (5): 381–7.



- Белгородского государственного университета. Серия «Медицина. Фармация» 2016; 33(5): 5–9.
9. Сухін ІЮ, Фурманов ЮО, Худецький ДМ, та ін. Практичне використання електрокоагуляторів з різними електрофізичними характеристиками. Клінічна хірургія. 2013; (7): 52–5.
10. Perez Lezana MA, Villarreal CG, Cumplido LP, et al. Comparative study of ambulatory laparoscopic cholecystectomy versus management of laparoscopic cholecystectomy with conventional hospital stay. *Cir Esp*. 2013; 9(7): 424–31.
11. Solej M, Martino V, Mao P, et al. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis. *Minerva Chir*. 2012; 67 (5): 381–7.
11. Sukbin IA, Furmanov YuO, Khudetskiy IYu, et al. [Practical application of a high-frequency coagulators, owing different electrophysical characteristics]. *Klin Khir*. 2013; (7): 52–5. Ukrainian.