



Ю. В. Иванова, В. В. Бойко,
И. А. Криворучко,
П. Н. Замятин, Ю. И. Исаев,
А. В. Кравцов, Е. В. Мушенко,
В. К. Иванов, А. М. Стадник,
С. В. Ткач

ГУ «Институт общей
и неотложной хирургии
им. В. Т. Зайцева НАМНУ»,
г. Харьков

Харковский национальный
медицинский университет,

Институт радиофизики
и электроники НАНУ, г. Харьков

© Коллектив авторов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОЦЕНКИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ТКАНЕЙ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Резюме. Определение жизнеспособности кишки и глубины ожогов является одним из основных факторов, влияющих на выбор лечебной тактики. Одним из малоинвазивных и достоверных способов определения диэлектрических параметров тканей является исследование тангенса угла отклонения (ϵ''). В проведенном экспериментальном исследовании было показано прогрессивное снижение параметра ϵ'' с увеличением времени ишемии по сравнению с контрольной группой с $9,0 \pm 0,15$ перед ущемлением до $8,25 \pm 0,11$ на 120 мин ущемления. В дальнейшем было показано, что реперфузионные повреждения, возникающие после 60-минутной ишемии приводят к летальному исходу всех экспериментальных животных в разные сроки эксперимента. На третьем этапе эксперимента было доказано достоверное снижение параметра ϵ при увеличении глубины термического поражения с $18,7 \pm 2,3$ у неизменной кожи до $16,5 \pm 2,0$ при 60 секундном термическом воздействии, что соответствует ожогу IV ст. Полученные данные позволяют предположить, что параметр ϵ'' может стать эффективным, неинвазивным индексом диагностики в реальном времени для оценки жизнеспособности тканей.

Ключевые слова: жизнеспособность кишки, глубина ожогов, диэлектрические параметры тканей.

Введение

Одной из главных проблем в хирургии является определение жизнеспособности тканей для определения объема и характера хирургического вмешательства.

Так, интраоперационная оценка жизнеспособности ущемленной кишки традиционно осуществляется на основании определения макроскопических параметров: цвета кишки, пульсации периферических сосудов или кровотечения из резецированного края кишки. Однако эти критерии не являются объективными и надежными [8]. Известно также, что повреждение стенки кишки происходит не только во время ишемии, но также и после реперфузии [9, 10].

Определение границ и глубины повреждения тканей при термической травме имеет принципиальное значение не только при лечении, но и для прогноза. Однако в литературе нет четких положений по диагностике глубины термических поражений и критериев оценки тяжести пострадавших. Лечение ожоговых ран проводят дифференцированно в зависимости от глубины поражения, стадии раневого процесса, локализации поражения и ряда других факторов [2]. Ранее иссечение ожогового некроза является методом выбора в комбустиологии [1].

В литературе можно встретить исследования, посвященные изучению изменений электрических свойств тканей при отеке легких [7], в диагностике опухолей [13], для измерения сердечного выброса [6]. Некоторые исследования показали, что электрические свойства тканей могут быть использованы для оценки жизнеспособности органов, подвергшихся ишемии и повреждению [4, 8, 9, 10]. Если биологические ткани подвергнуть воздействию электрического поля переменного тока, они начинают генерировать диэлектрические колебания. β -колебания связаны с эффектом изменения мембран, таких как клеточные, ядерные и митохондриальные мембраны, называемые эффектом Максвелла-Вагнера, являются специфичными для каждого вида ткани [11, 12]. Степень β -колебаний количественно выражается с помощью простого параметра — тангенса угла отклонения (ϵ'') [16].

С другой стороны, электрические свойства биологических веществ, измеренные в реальном времени, отражают различия и изменения в структуре тканей и химическом составе [4, 8, 10, 11].

Цель исследования

Оценка соотношения между диэлектрическими параметрами тонкой кишки до и во

время ишемии кишки, а также взаимосвязи между диэлектрическими параметрами и глубины термического повреждения.

Материалы и методы исследований

Экспериментальная часть исследования выполнялась на 85 белых крысах-самцах линии Wistar массой 200–350 г и состояли из трех блоков. Эксперименты на крысах проводились с соблюдением международных принципов европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для опытов и других научных целей (г. Страсбург, 1985) и «Общезащитных принципов экспериментов на животных», одобренных Первым национальным конгрессом по биоэтике (г. Киев, 2001) и закона Украины «О защите животных от жестокого обращения» от 21.02.06 г. № 3477. Крыс оперировали в асептических условиях под наркозом тиопентал натрия (15 мг/100 г массы тела внутримышечно).

Моделирование синдрома ишемии/реперфузии осуществлялось путем наложения катетера Фогарти на брыжейку тонкой кишки с дозированным пережатием сосудов следующим образом: дистальные 5 см подвздошной кишки вместе с брыжейкой и, соответственно, брыжеечными сосудами ущемляли с помощью лигатуры и катетера Фогарти; кровоток в ущемленном сегменте выключался путем раздувания баллона с экспозицией 30, 60 и 120 минут, реперфузия достигалась путем сдувания баллона. Реперфузия подтверждалась изменением цвета кишки и появлением видимой пульсации сосудов брыжейки (рис. 1). Внутривентриальная температура поддерживалась на уровне $36,5 \pm 0,5$ °С, а температура поверхности тонкой кишки - $35,5 \pm 0,5$ °С.



Рис. 1. Моделирование синдрома ишемии/реперфузии

Термическое поражение кожи наносили путем контакта аппликатора размерами $1 \times 1,5$ см овальной формы, с экспозицией 15, 30, 45 и 60 секунд, температура поддерживалась в пределах $90,2 \div 110,1 \pm 0,5$ °С,

Экспериментальные исследования разделены на три блока.

Блок 1. Изменения ϵ'' тонкой кишки. С целью оценки эффектов теплового ишемического повреждения на основании ϵ'' животные были разделены на две группы: группа с моделированной ишемией: в течение 30 мин ($n=7$); в течение 60 мин ($n=7$); и в течение 120 мин ($n=7$); и группа без моделированной ишемии (контроль; $n=6$). В конце каждого ишемического периода, измеряли диэлектрические параметры, а также выполняли забор тканей для гистологического исследования.

Блок 2. Определение взаимосвязи между ϵ'' и выживаемостью крыс после разрешения ущемления. Время ущемления варьировало от 30 до 120 мин. Известно, что ишемия тонкой кишки крыс в течение 30 минут является обратимой, а свыше 60 минут – необратимой. После измерения диэлектрических параметров выполняли дестрангуляцию, затем удаляли коаксиальный зонд и ущемляющую лигатуру, брюшную полость ушивали наглухо ($n=29$). Крыс кормили и поили без ограничения в течение следующих 7 дней. Крысы были разделены на две подгруппы: подгруппа А – животные, выжившие в течение 7 дней, которых затем выводили из эксперимента, и подгруппа В – животные, которые погибли в течение 7 дней. Погибшие животные сразу были подвергнуты аутопсии, во время которой осуществляли забор участка тонкой кишки, подвергшейся ущемлению, фиксировали ее 10 % раствором формальдегида и выполняли микроскопию образцов после окраски гематоксилин-эозином. Повреждение тонкой кишки оценивали по шкале Park P. O. и соавт. [17].

Блок 3. Измерение ϵ'' обожженной кожи. Животные были разделены на пять групп по 7 животных в каждой: группа А (контроль) – без повреждения кожи; группа В (основная) термическое воздействие в течение 15, 30, 45 и 60 секунд. Животных выводили из эксперимента путем передозировки тиопентала натрия, после чего осуществляли забор участка кожи, подвергшейся термическому воздействию, фиксировали его 10 % раствором формальдегида и выполняли микроскопию образцов после окраски гематоксилин-эозином.

Комплексная диэлектрическая проницаемость (ϵ'') исследуемых образцов была измерена на частоте 5 ГГц методом открытого конца коаксиальной линии. Суть метода заключается в измерении входного комплексного коэффициента отражения зонда в виде отрезка полужесткого коаксиального кабеля, один конец которого (армированный радиочастотным соединителем) подсоединяется к измерительному прибору, а второй – или погружается



в исследуемую среду, или просто плотно контактирует с ней. В данном случае использовался зонд, изготовленный из кабеля с фторопластовым наполнением РК50-4-25 с внутренним диаметром наружного проводника 4 мм.

Первая задача решается с помощью калибровки, которая, как правило, выполняется по измерениям входных коэффициентов отражения зонда, нагруженного на три эталонные нагрузки. В качестве эталонных нагрузок использовали открытое пространство (воздух), короткое замыкание (ртуть) и химически чистый ацетон, комплексная диэлектрическая проницаемость которого на данной частоте была принята равной 21-и1,98.

Для решения второй задачи использовали различные математические модели зависимости между адмитансом (или комплексным коэффициентом отражения) открытого конца коаксиальной линии, погруженной в среду и диэлектрическими параметрами среды на определенной частоте. В данном случае применялся метод модового согласования, учитывающий эффекты излучения и возбуждения высоких мод на открытом конце зонда.

Измеренные и рассчитанные значения выражаются как среднее стандартное отклонение ($M \pm m$). Результаты регрессионного анализа для эксперимента 2 и тест Манна-Уитни для эксперимента 3, были использованы для сравнения между группами. Значения p менее 5 % считались статистически значимыми.

Результаты исследований и их обсуждение

Блок 1. В ходе проведенного эксперимента установлено, что значение параметра ϵ'' до ущемления было $9,0 \pm 0,15$. Этот параметр снизился после ущемления до $8,75 \pm 0,14$ через 30 минут после странгуляции. В дальнейшем отмечено значительное снижение параметра ϵ'' до $8,25 \pm 0,11$ через 60 минут и до $8,15 \pm 0,10$ через 120 мин после ущемления. Изменения значения ϵ'' в контрольной группе в течение 120 мин были незначительны и составили $9,02 \pm 0,16$; $9,02 \pm 0,16$; $9,03 \pm 0,18$ и $9,03 \pm 0,17$ на 0, 30, 60, и 120 минутах эксперимента соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Диэлектрические характеристики тонкой кишки крыс с моделированной ишемией (частота 5 ГГц, зонд 2 мм)

	ϵ'	ϵ''
Без ущемления	$25,4 \pm 2,6$	$9,0 \pm 0,15$
Ишемия 30 мин.	$23,7 \pm 2,3$	$8,75 \pm 0,5$
Ишемия 60 мин.	$20,8 \pm 1,9$	$8,25 \pm 0,11$
Ишемия 120 мин.	$20,5 \pm 2,1$	$8,15 \pm 0,10$

Индекс ϵ'' является менее инвазивным параметром ишемического повреждения в реальном времени, поэтому может применяться

для определения жизнеспособности кишки в клинической практике.

Блок 2. Следует отметить, что в разные сроки эксперимента умерли все крысы, сегмент кишки которых находился в условиях ишемии свыше 60 минут. В данном блоке эксперимента была оценена корреляция между ϵ'' непосредственно перед реперфузией и выживаемостью крыс с целью определения возможности и целесообразности определения диэлектрических параметров в реальном времени.

Литературные данные свидетельствуют, что период обновления эпителиальных клеток кишки у крыс составляет 2–3 дня [3, 14], а срок в 7 дней является достаточным для восстановления кишечника при ишемически-реперфузионных повреждениях, поэтому срок наблюдения за крысами за крысами составил 7 дней.

Все образцы кишки крыс выживших в группе А, имели некроз кишки класса 0, что свидетельствовало о том, что их кишечник восстановился от ишемически-реперфузионных повреждений (рис. 2).



Рис. 2. Крыса подгруппы А. Реперфузия после 30 минут ишемии

В группе В 3 крысы погибли в первый день, 8 — на 2 день, 2 — на 3-й и 2 — на 4-й день (в среднем: 2,1 день) после операции (рис. 3, 4). Гистологическое исследование после аутопсии показало некроз ущемленной кишки уровня 7 или 8, у всех крыс группы В, в то время, как гистологические исследования в группе А, выживших в течение 7 дней и выведенных из эксперимента, показали отсутствие ишемического повреждения. При этом перед реперфузией параметр ϵ'' в группе А был значительно выше, чем в группе В ($p < 0,01$).

Семидневная выживаемость крыс составила 82,4 %, когда показатель ϵ'' непосредственно перед реперфузией был выше, чем 8,25. Примечательно, что выживаемость составила 100%, когда показатель ϵ'' был более 8,40. С другой стороны, выживаемость 8,3 % отмечена при ϵ'' менее 8,25.



Рис. 3. Крыса подгруппы В. Реперфузия после 60 минут ишемии



Рис. 4. Крыса подгруппы В. Реперфузия после 120 минут ишемии

Таким образом, в результате проведения данного блока эксперимента установлено, что у выживших животных параметр ϵ'' в конце ущемления был 8,36 или более, а у умерших — менее 8,25. Все крысы с ущемлением более 60 мин погибли в течение 4 дней.

Блок 3. В ходе проведенного эксперимента установлено, что значение параметра ϵ'' неизменной кожи было $49,00 \pm 3,8$ (табл. 2).

Таблица 2

Диэлектрические характеристики кожи крыс с экспериментальными ожогами (частота 5 ГГц, зонд 2 мм)

	ϵ'	ϵ''
Термическое воздействие 15 сек	$44,8 \pm 3,6$	$18,7 \pm 2,3$
Термическое воздействие 30 сек	$43,1 \pm 4,1$	$18,1 \pm 2,0$
Термическое воздействие 45 сек	$41,8 \pm 3,2$	$16,7 \pm 2,3$
Термическое воздействие 60 сек	$41,3 \pm 2,1$	$16,5 \pm 2,0$

Этот параметр снизился до $18,7 \pm 2,3$ после ожога в течении 15 секунд, после 30 секунд термического воздействия — до $18,1 \pm 2,0$, в дальнейшем отмечено значительное снижение показателя ϵ'' — после термического воздействия в течении 45 секунд — до $16,7 \pm 2,3$

и до $16,5 \pm 2,0$ после термического воздействия в течении 60 секунд.

Проведенные гистологические исследования показали, что термическое воздействие на кожу в течении 15 секунд соответствует ожогу II степени, в течении 30 секунд — ожогу III А степени, 45 секунд — ожогу III Б и 60 секунд — ожогу IV степени (рис. 5, 6, 7).

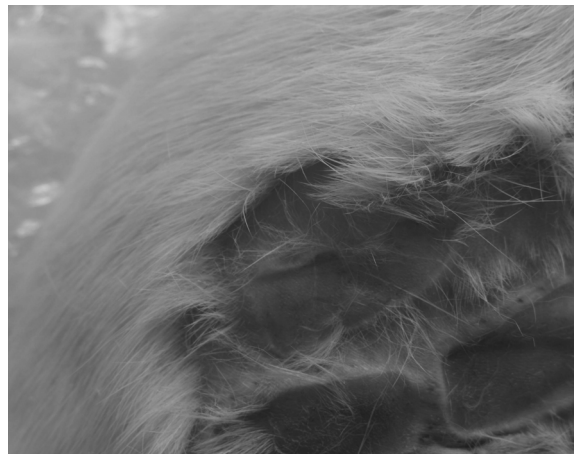


Рис. 5. Термическое воздействие в течение 15 сек



Рис. 6. Термическое воздействие в течении 30 сек

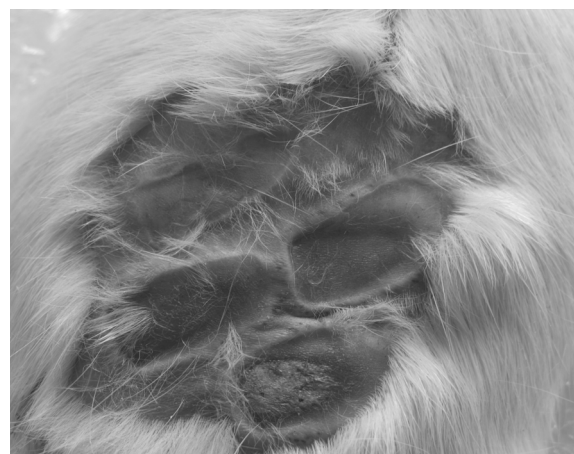


Рис. 7. Термическое воздействие в течении 45 сек.

**Выводы**

Полученные данные позволяют предположить, что параметр ϵ'' может стать эффективным, неинвазивным индексом диагностики в реальном времени для оценки жизнеспособности тканей. Метод может быть полезным для определения объема резекции ущемленной кишки, без разрешения странгуляции, когда определяется ϵ'' ниже поро-

вого значения для профилактики синдрома реперфузии. Кроме того, значение ϵ'' может быть показательным при определении тактики лечения ожогов кожи: при снижении его до определенного порогового значения показана активная тактика лечения. Надеемся, что исследования у больных позволят оценить значения ϵ'' для определения выбор тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азолов В.В Основные тенденции динамики ожогового травматизма в России и показателей лечения обожженных за последние двадцать лет / В. В. Азолов, В. А. Жегалов, Н. А. Пономарева / Актуальные проблемы термической травмы : матер. междунар. конф., посвященной 70-летию НИИСП им. И.И. Джанелидзе (2 мая 2002 г.). — СПб, 2002. — С. 28-30.
2. Козинец Г. П. Нова концепція розвитку комбустіологічної служби в Україні / Г. П. Козинец, М. П. Комаров, А. В. Воронін // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. — 2014. — Т. 15, №1. — С. 6.
3. Adaptation of the gastrointestinal tract to extrauterine life / P. Sunshine, J. J. Herbst, O. Koldovsky [et al.] // Ann NY Acad. Sci. — 1971. — № 76. — P. 16–29.
4. An experimental estimation of the maximum period of liver preservation using dielectric parameters / T. Yamada, H. Hirose, Y. Mori [et al.] // Transplant Proc. — 2002. — № 34. — P. 1098–1104.
5. Boros M. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine / M. Boros, S. Takaichi, K. Hatanaka // J. Surg. Res. — 1995. — № 59. — P. 311–320.
6. Development and evaluation of an impedance cardiac output system / W. G. Kubicek, J. N. Karnegis, R. P. Patterson [et al.] // Aerospace Med. — 1966. — №37. — P. 1208–1212.
7. Diagnosis of pulmonary edema with thoracic electrical resistivity / N. Okuda, K. Ieda, K. Horie [et al.] // Jpn. J. Med. Electrobiol. Eng. — 1991. — №29. — P. 105–108.
8. Dielectric spectrogram for instantaneous evaluation of ischemic injury of the liver / E. Sasaki, H. Hirose, H. Ito // ASAIO J. — 1995. — №41. — P. 356–359.
9. Evaluation of ischemic damage in the skeletal muscle with the use of electrical properties / M. Hayashi, H. Hirose, E. Sasaki [et al.] // J Surg Res. — 1998. — № 80. — P.266–271.
10. Evaluation of myocardial viability during cold storage with the use of electrical properties in broad frequencies / M. Ishikawa, H. Hirose, E. Sasaki [et al.] // J. Heart. Lung Transplant. — 1996. — № 15. — P. 1005–1011.
11. Foster K. R. Dielectric properties of tissues and biological materials / K. R. Foster, H. P. Schwan // Crit Rev Biomed Eng. — 1989. — № 17. — P. 25–104.
12. Foster K. R. Dielectric properties of tissues / K. R. Foster, H. P. Schwan // Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, 2nd ed. / [C. Polk, E. Postow]; Boca Raton. — Florida: CRC Press, 1996. — P. 25–102.
13. In vivo measurement and evaluation of bioimpedance of breast tumors / N. Mitsuyama, T. Morimoto, Y. Kinouchi [et al.] // J Jpn Surg Soc. — 1988. — №89. — P. 251–255.
14. Leblond C.P. The time dimension in histology / C. P. Leblond // Am. J. Anat. — 1963. — №116. —P. 1–27.
15. Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia / R. S. Poggetti, F. A. Moore, E. E. Moore [et al.] // Arch Surg. — 2001. — №127. — P. 175–179.
16. Surowiec A. Use of the loss-tangent function in dielectric spectroscopy / A. Surowiec, S. S. Stuchiy // Bioelectromagnetics. — 1986. — №7. — P. 259–269.
17. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion / P. O. Park, U. Haglund, G. B. Bulkley // Surgery. — 1990. — № 107. — P. 574–580.
18. The significance of cytological examination on reperfusion in rat small intestinal transplantation / T. Taguchi, T. Yamada, S. Suita [et al.] // Virchows Arch. — 1996. — № 427. — P. 71–76.
19. Yamada T. Energy metabolism and tissue blood flow as parameters for the assessment of graft viability in rat small bowel transplantation / T. Yamada, T. Taguchi, S. Suita // J Pedia Surg — 1996. — №31. —P.1475–1481.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ
ДОСЛІДЖЕННЯ ОЦІНКИ
ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТКАНИН
НА ПІДСТАВІ ВИЗНАЧЕННЯ
ДІЕЛЕКТРИЧНИХ
ПАРАМЕТРІВ

*Ю. В. Іванова, В. В. Бойко,
І. А. Криворучко,
П. Н. Замятін, Ю. І. Ісаєв,
А. В. Кравцов, Є. В. Мушенко,
В. К. Іванов, А. М. Стадник,
С. В. Ткач*

Резюме. Визначення життєздатності кишки та глибини опіків є одним з основних факторів, що впливають на вибір лікувальної тактики. Одним з малоінвазивних і достовірних способів визначення діелектричних параметрів тканин є дослідження тангенса кута відхилення (ϵ''). У проведеному експериментальному дослідженні було показано прогресивне зниження параметра ϵ'' зі збільшенням часу ішемії в порівнянні з контрольною групою з $9,0 \pm 0,15$ перед утиском до $8,25 \pm 0,11$ на 120 хв утиску. Надалі було показано, що реперфузійні пошкодження, що виникають після 60-хвилинної ішемії призводять до летального результату всіх експериментальних тварин у різні терміни експерименту. На третьому етапі експерименту було доведено достовірне зниження параметра ϵ'' при збільшенні глибини термічного ураження з $18,7 \pm 2,3$ у незмінній шкірі до $16,5 \pm 2,0$ при 60 секундному термічному впливі, що відповідає опіку IV ст. Отримані дані дозволяють припустити, що параметр ϵ'' може стати ефективним, неінвазивним індексом діагностики в реальному часі для оцінки життєздатності тканин.

Ключові слова: *життєздатність кишки, глибина опіків, діелектричні параметри тканин.*

EXPERIMENTAL STUDY
ASSESSING TISSUE
VIABILITY ON THE BASIS
OF DETERMINING THE
DIELECTRIC PARAMETERS

*Yu. V. Ivanova, V. V. Boiko,
I. A. Krivoruchko, P. N. Zamyatin,
Yu. I. Isaev, A. V. Kravtsov,
E. V. Mushenko, V. K. Ivanov,
A. M. Stadnik, S. V. Tkach*

Summary. Determination of the viability of the intestine and the depth of burns is one of the main factors that influence on treatment tactics. Definition of the dielectric parameters of tissues and determination the tangent of the angle of deviation (ϵ'') is one of minimally invasive and reliable method. In this experimental study is shown a progressive decrease in the parameter ϵ'' with increasing of ischemia time compared with the control group with $9,0 \pm 0,15$ before the strangulation compared to $8,25 \pm 0,11$ on 120 minutes strangulation. Further it was shown that reperfusion injury occurring after 60 min ischemia lead to death of all experimental animals in different terms of the experiment. At the third stage of the experiment was proved significant decrease of the parameter ϵ'' due to increasing depth of thermal injury to $18,7 \pm 2,3$ in intact skin compared to $16,5 \pm 2,0$ after 60-seconds thermal exposure, that equal to burns of stage IV. These data suggests that the parameter ϵ'' can be an effective, non-invasive diagnostic index in real time, to identify tissue viability.

Key words: *viability of the intestine, the depth of burns, dielectric properties of tissues.*