© Хворостов Є.Д., Бичков С.О., Олефіренко О.О. Слета І.В. Сандомирський Б.П., 2009

УДК 36-004-092.4-08:615.361.41.014.4

ВПЛИВ КРІОДЕСТРУКЦІЇ ТА ТКАНИННИХ ЕКСТРАКТІВ НА ВІДНОВНІ ПРОЦЕСИ В ПЕЧІНЦІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ

Хворостов Є.Д.[1], Бичков С.О.[1], Олефіренко О.О. [2,] Слета І.В. [2,] Сандомирський Б.П.[2]

1 – Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, медичний факультет, м. Харків;

2 – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

РЕЗЮМЕ: в роботі проведено комплексне вивчення стану печінки щурів з експериментальним цирозом після лікування за допомогою дозованої кріогепатодеструкції або/і введення екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки. Показано, що кріогепатодеструкція ініціює зворотний розвиток фіброзу та нормалізацію трабекулярної будови печінкової паренхими щурів з експериментальним цирозом печінки.

Встановлено, що введення екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки та селезінки щурам з експериментальним цирозом печінки стимулює ангіогенез і прискорює нормалізацію біохімічних показників крові.

Показана також ефективність та доцільність поєднання кріохірургічної гепатодеструкції та введення природної суміші регуляторних пептидів, які входять до складу екстрактів паренхіматозних органів, при лікуванні експериментального цирозу у щурів.

Ключові слова: цироз печінки, кріодеструкція, екстракт органів

Вступ. Лікування хронічних дифузних захворювань печінки, до яких належать хронічний гепатит і цироз печінки, є актуальною проблемою сучасної гепатології. Відомо, що до 20% населення земної кулі страждає на печінкові недуги [5, 7], причому хронічний гепатит і цироз печінки посідають 2-4 місце серед тих захворювань, які приводять до госпіталізації і втрати працездатності населення у віці 20-60 років, а також до збільшення смертності. Ці обставини обумовлюють необхідність пошуку нових методів лікування хронічних дифузних захворювань печінки.

Незважаючи на багаторічний досвід і успіхи консервативного та оперативного лікування хронічних дифузних захворювань печінки, на сьогодні не існує ефективних методів лікування цих захворювань. Для стимуляції процесів регенерації використовується метод локальної кріодеструкції печінки [2, 3, 4]. Також в останні роки для оптимізації процесів регенерації в органах і тканинах застосовують регуляторні пептиди. Вони сприяють не тільки підтримці цілісності органа або тканини в нормальних умовах, але й швидкому та ефективному їх відновленню при гострій чи хронічній дії будь-якого ушкоджуючого чинника, зниженню або виключенню можливості розвитку патологічних форм регенерації (фіброз, метапластичне переродження клітин та інше).

Тому в даній роботі ми вважали доцільним вивчити в порівняльному аспекті вплив локальної кріогепатодеструкції, екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки, а також їх спільну дію на процеси відновлення в циротично зміненій печінці у щурів.

Мета дослідження полягала у визначенні особливостей дії дозованої кріогепатодеструкції та екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки на характер та динаміку відновних процесів в печінці щурів з експериментальним цирозом.

Матеріали та методи. Експерименти були проведені на 398 безпородних білих щурах-самцях масою 250-300 г. відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених II Національним конгресом з біоетики (Київ, 2004 р.) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Щури з експериментальним цирозом були поділені на такі групи: 1 (контроль) – тварини, яким не проводили лікування цирозу печінки (110 щурів); 2 – тварини після кріодеструкції 8-10% печінки (85 щурів); 3- тварини, яким протягом 3-х діб в черевну порожнину вводили по 1 мл суміші екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки новонароджених поросят і селезінки статевозрілих свиней (ЕПС) (87 щурів); 4- тварини після кріодеструкції 8-10% печінки, яким протягом 3-х діб в черевну порожнину вводили по 1 мл ЕПС (91 щур). Групу норми склали 25 тварин.

Експериментальну патологію печінки моделювали введенням 40%-го розчину тетрахлорметану. Смертність складала близько 35% від загальної кількості експериментальних тварин.

Кріодеструкцію циротично зміненої печінки здійснювали на 5-ту добу після закінчення введення тетрахлорметану. На лівій латеральній частці печінки виконували кріодеструкцію за допомогою автономного азотного кріоінструмента з діаметром аплікатора 2,0мм та температурою на поверхні – 120^{o}С. Кріовплив протягом 2 хв призводив до утворення зон заледеніння, що становили 8-10% загальної маси органа. Рану черевної порожнини ушивали пошарово з дотриманням правил асептики.

В роботі використані водно-сольові екстракти, одержувані з кріоконсервованих фрагментів печінки новонароджених поросят і селезінки статевозрілих свиней з вмістом поліпептидів 100 мкг/мл [1].

Мікрогемоциркуляцію досліджували методом вітальної мікроскопії [6], який дозволяє оцінити швидкість кровотока, визначити діаметр і контури внутрішньої і зовнішньої стінок мікросудин, кількість функціонуючих мікросудин, взаємодію формених елементів крові. Прижиттєву мікроскопію печінки здійснювали за допомогою контактного мікроскопа Люмам К-1 в режимах поляризації і люмінесценції.

Внутрішньовенне введення флюоресцеїну натрію (ураніну) дозволило охарактеризувати стан кровотока і транспорт ураніну в органі. Розподіл мітки в печінці та інтенсивність її світіння оцінювали візуально при мікроскопії або на фотознімках об'єкта, одержаних за допомогою цифрового фотоапарата Sony.

Для дослідження мікрогемоциркуляції відеореєстрацію мікросудин печінки з об'єктива мікроскопа Люмам К-1 проектували на чорно-білу телекамеру Panasonic VC 45 BSHRX-12 і вводили в комп'ютер в режимі on line. Аналіз одержаних зображень проводили за допомогою комп'ютерної програми «FRAM», призначеної для розрахунків морфометричних характеристик об'єкта.

Для гістологічних досліджень фрагменти печінки фіксували в 10%-му нейтральному формаліні з подальшою заливкою в парафін. Одержані з парафінових блоків зрізи завтовшки 6-8 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином для отримання оглядових гістологічних препаратів. Стан сполучної тканини оцінювали в препаратах, забарвлених пікрофуксином по ван Гізон для виявлення колагенових волокон.

Вміст ТБК-активних продуктів (ТБКАП) в сироватці крові визначали спектрофотометрично.

Активності аланін- і аспартатамінотрансфераз (АлАТ і АсАТ) досліджували за методом Райтмана-Френкеля за допомогою стандартних наборів виробництва НПП "Фелісит діагноста" (Дніпропетровськ, Україна).

Статистичну обробку результатів проводили параметричним методом Фішера-Стьюдента з використанням t-критерію або непараметричним методом ANOVA. Кількісні дані в тексті дисертації представлені в середніх величинах і середніх квадратичних похибках. Для статистичної обробки результатів використовували пакет програм Statistica for Windows 5.1.

Результати досліджень та їх обговорення. Дослідження мікроциркуляції крові в печінці інтактних тварин показали, що кровоток в мікросудинах венулярного типу був швидкий, безперервний, гомогенний, із збереженням пристінного плазматичного шару. Функціонуючі синусоїди мали нормальне наповнення, їх діаметр складав 9,28±2,18 мкм. Термінальні печінкові венули мали середній діаметр 18,75±2,51 мкм. Відносна площа судинного русла у полі зору – 52,5±1,6 %.

Метод прижиттєвої мікроскопії в режимі люмінесценції дозволив досліджувати не тільки стан мікросудин печінки, але й жовчних канальців в поверхневих шарах паренхіми органа. У нормальній печінці жовчні канальці утворювали рівномірну мережу з яскравим світінням.

Мікрогемоциркуляторне русло печінки щурів після двомісячного введення тетрахлорметану (1 група) відповідало картині цирозу печінки. При цьому спостерігалися різке зменшення кількості функціонуючих синусоїдів і присутність феномена звивистості. Діаметр термінальних портальних венул був зменшений, а діаметр печінкових венул – значно збільшений. Відносна площа судинного русла була вдвічі менша за норму і становила 27,35±2,92% у полі зору. Спостерігалася значна кількість шунтуючих судин. Порушення мікрогемоциркуляції виявлялося також у внутрішньосудинній агрегації еритроцитів, уповільненні кровотока, виключенні з кровотока частини синусоїдів. При введенні розчину ураніну виявлялись зміни в архітектоніці жовчних канальців. При цирозі спостерігалось різке зменшення жовчних канальців в полі зору, вони були потовщені, випрямлені, без сітчастої структури.

Біомікроскопічні дослідження печінки були проведені на 7, 14 та 30-ту добу з початку експерименту.

На 7-му добу експерименту порушення архітектоніки мікроциркуляторного русла печінки зберігалися у всіх групах тварин. Статистично достовірних відмінностей в основних морфологічних показниках мікроциркуляторного русла не виявлено.

На 14-ту добу печінка дослідних тварин 2 та 3 груп була більш еластичною, ніж в контролі (1 група). В черевній порожнині спостерігалася невелика кількість асцитної рідини. У мікроциркуляторному руслі визначалося збільшення площі судин із швидким струменевим кровотоком, агрегація еритроцитів була відсутня. Статистично вірогідних відмінностей між досліджуваними показниками не виявлено (табл. 1).

У тварин 4 групи, де кріодеструкція частини печінки була поєднана з введенням екстрактів, зникала звивистість синусоїдів, яка характерна для цирозу, збільшувалася кількість функціонуючих мікросудин.

Таблиця 1

Параметри мікроциркуляторного русла печінки щурів на 14-ту добу дослідження

Параметри	Групи тварин				
	Норма	1	2	3	4
Середнє значення діаметра синусоїдів, мкм	9,28±2,18	7,67±0,84	8,35±1,73	8,91±2,01	9,33±1,39
Відносна площа мікросудин в полі зору	0,53±0,02	0,27±0,03	0,45±0,03	0,52±0,02	0,54±0,06

При гістологічному дослідженні циротично зміненої печінки встановлено, що часточкова структура печінкової тканини була порушена, балочна будова нерегулярна. Паренхіма печінки фрагментована сполучнотканинними тяжами, в окремих ділянках з утворенням хибних часточок. Гепатоцити мали різний розмір і форму. Нерідко зустрічалися некротизовані клітини, переважно в центральних відділах печінкових часточок, а також осередки некрозу у середині хибних часточок. Відношення строми до паренхіми складало 7,41±1,15 (в нормі 0,98±0,09).

На 14-ту добу експерименту в печінці тварин 1 групи (контроль) при мікроскопічному вивченні виявлялася жирова і балонна дистрофія. Балочна будова часточок не визначалася. Фіброзна тканина, що оточувала вузли-регенерати і створювала хибні часточки, була розвиненою, в ній спостерігалися фіброцити і фібробласти, що свідчило про подальше фіброзоутворення. Ознаки портальної гіпертензії відзначалися венозним застоєм, розширенням центральних вен, гемосидерозом, розширенням артерій портальних трактів.

У тварин 2 групи у цей же строк мікроскопічно визначалися вузли-регенерати, при цьому дистрофія гепатоцитів мала, в основному, гідропічний і балонний характер і лише подекуди виявлялася жирова дистрофія. Фіброзна тканина, яка оточувала хибні часточки, була розвинена, в ній поряд з одиничними фібробластами були наявні, в основному, фіброцити, що може свідчити про закінчення фіброзоутворення. Синусоїди були помірно розширені. Ознаки портальної гіпертензії виявлялися помірною дилатацією центральних вен і артерій портальних трактів. Трабекулярна будова в часточках печінки, що збереглися, починала відновлюватися.

Мікроскопічне дослідження гістологічних препаратів печінки тварин 3 групи на 14-ту добу показало, що в печінці формувався дрібновузловий цироз. Вузли-регенерати паренхіми не мали нормальної часточкової структури і були оточені фіброзною тканиною. Артерії в портальних трактах печінки були розширені, навколо центральних вен визначався застій крові з ознаками гемосидерозу.

При мікроскопічному дослідженні препаратів печінки тварин 4 експериментальної групи на 14-ту добу виявлено, що вузли-регенерати паренхіми печінки були майже одного розміру. При цьому дистрофія окремих гепатоцитів, в основному, визначалась як гідропічна. Паренхіма печінки нормалізувалася – навколо центральних вен формувались радіально розташовані печінкові балки (трабекули) і синусоїди. Сполучна тканина, яка оточувала тріади, була слабо інфільтрована, складалась переважно з фіброцитів – зрілих клітин сполучної тканини, що свідчило про закінчення фіброзоутворення. Сполучнотканинних тяжів, що йшли углиб паренхіми і створювали хибні часточки, виявлялось значно менше, ніж у контролі.

На 30 та 60-ту добу відбувалась подальша нормалізація будови печінки тварин, яка була найбільше виражена в 4 групі.

Для виявлення ступеня фіброзу в печінці тварин контрольної і 3-х експериментальних груп було проведено морфометричне дослідження показника співвідношення площі строми і паренхіми на гістологічних препаратах печінки в динаміці.

При морфометричному дослідженні препаратів, забарвлених по ван Гізон, було встановлено, що протягом 2-х місяців в циротично зміненій печінці показник співвідношення площі строми і паренхіми практично не змінювався. Це свідчить про необоротний характер фіброзу.

При всіх видах впливу на циротично змінену печінку показник співвідношення площі строми і паренхіми зменшувався. Проте при кріодеструкції печінки і, особливо, при поєднаній дії кріодеструкції та ЕПС цей показник інтенсивно знижувався і вже на 14-ту добу став вищим за норму лише в 1,9 рази, а на 30-ту добу відповідав нормі.

При дослідженні впливу кріогепатодеструкції і введення ксеноекстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки та селезінки на функціональну активність печінки щурів з експериментальним цирозом було встановлено, що такий підхід дозволяє через місяць досягти практично повного відновлення білоксинтетичної функції печінки (табл. 2).

Дані табл. 3 свідчать, що активність АлАТ у тварин всіх груп була вища за норму в 4 рази протягом перших 3-х діб спостереження. На14-ту добу у тварин 1 та 2 груп цей показник був в 3,6 та 2,6 рази вищий за норму, а у тварин, що одержували тільки ЕПС, – в 2 рази. Рівень активності АлАТ у тварин 4 групи (кріодеструкція +

ЕПС) перевищував норму всього в 1,5 рази і був вірогідно нижчим за аналогічні показники у решті груп.

На 30-ту добу спостереження тільки у тварин з цирозом печінки, який не лікували, зберігалося підвищене значення активності АлАТ (у 1,5 рази вище за норму). У решті груп рівень активності ферменту знижувався до норми. Динаміка активності АсАТ принципово не відрізнялася від динаміки активності АлАТ.Нормалізація рівня печінкових амінотрансфераз через 14-30 діб у тварин з цирозом, що одержували ЕПС, свідчить про їхній позитивний вплив на внутрішньоклітинні репаративні процеси в гепатоцитах. Застосування екстрактів особливо ефективне в поєднанні з методом кріодеструкції частини печінки.

Таблиця 2

Вплив кріодеструкції і ЕПС на концентрацію альбуміну (мг/мл і % від норми) в сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки

Термін спостереження	Групи тварин			
	1	2	3	4
1-а доба	24,1±1,0[1] 58,12%	25,2±1,7[1] 60,7%	25,5±1,2[1] 61,4%	25,3±0,9[1] 61,0%
3-я доба	25,6±2,0[1] 61,7%	24,8±1,1[1] 59,8%	26,1±1,1[1] 62,9%	25,9±2,0[1] 62,5%
7-а доба	25,6±1,5[1] 61,8%	26,1±1,1[1] 62,9%	28,3±1,2[1] 68,2%	27,3±1,9[1] 65,83%
14-а доба	25,9±1,3[1] 62,55%	27,0±1,2[1] 65,1%	27,8±1,1[1] 67,0%	31,6±1,2[1,2,3,4] 76,2%
30-а доба	27,2±1,6[1] 65,5%	30,1±1,3[1] 72,43%	35,6±1,4[1,2,3] 85,8%	38,4±1,1[2,3] 92,6%

Примітки: концентрація альбуміну в нормі – 41,5±1,7 мг/мл; відмінності статистично вірогідні ($p < 0,05$) в порівнянні з показниками тварин: 1 – інтактних; 2 – з цирозом печінки; 3 – з цирозом і кріодеструкцією печінки; 4 – з цирозом печінки і введенням ЕПС

Загальновизнано, що будь-які деструктивні процеси в організмі супроводжуються розвитком синдрому пероксидації, тобто підвищенням рівня вільно-радикальних процесів у тканинах і викидом продуктів ПОЛ у кров.

Рівень ТБКАП в сироватці крові був істотно підвищений у тварин з цирозом. Проте вже на 7-му добу спостереження рівень ТБКАП у тварин 4 групи був вірогідно нижчий за аналогічний показник у тварин з цирозом, який не лікували, ($p<0,05$). Ще більш виражені відмінності були зафіксовані на 14-ту добу спостереження.

В той час, як у тварин 1 та 2 груп ще зберігався досить високий рівень продуктів ПОЛ в сироватці (перевищення норми в 2,2 і 1,7 рази відповідно), у тварин 3 групи (введення ЕПС) рівень ТБКАП перевищував норму лише в 1,5 рази, а в 4 групі (кріодеструкція + ЕПС) в цей період зафіксована нормалізація даного показника. На 30-ту добу спостереження підвищений рівень ТБКАП в сироватці крові був тільки у тварин з цирозом печінки.

Таблиця 3

Активність АлАТ (ммоль/мл/год, % від норми) в сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки

Термін спосте-реження	Групи тварин			
	1	2	3	4
1-а доба	1,75±0,21[1] 473%	1,68±0,18[1] 454%	1,45±0,12[1] 392%	1,48±0,09[1] 400%
3-я доба	1,65±0,31[1] 446%	1,67±0,28[1] 451%	1,63±0,13[1] 440.5%	1,59±0,11[1] 430%
7-а доба	1,53±0,22[1] 413%	1,46±0,13[1] 394%	1,32±0,18[1] 357%	1,24±0,09[1] 335%
14-а доба	1,33±0,11[1] 359%	0,97±0,14[1] 262%	0,74±0,07[1] 200%	0,52±0,07[2,3,4] 140%
30-а доба	0,58±0,08[1] 157%	0,41±0,03 111%	0,39±0,04[2] 105%	0,32±0,02[2,3] 86.5%

Примітки: активність АлАТ в нормі – 0,37±0,04 ммоль/мл/год; відмінності статистично вірогідні ($p < 0,05$) в порівнянні з показниками тварин: 1 – інтактних; 2 – з цирозом печінки; 3 – з цирозом і кріодеструкцією печінки; 4 – з цирозом печінки і введенням ЕПС.

Висновки. Експериментальні результати дослідження свідчать, що найбільш активна стимуляція репаративних процесів в циротично зміненій печінці експериментальних тварин спостерігалася при поєднанні кріодеструкції та введення ЕПС. Це виражалося в тому, що тільки в цій групі протягом місяця відновилися до нормального рівня всі досліджувані функції печінки. Через місяць повністю відновився вміст альбуміну в сироватці крові, ще раніше (через 2 тижні) нормалізувалася активність амінотрансфераз, а також рівень продуктів ПОЛ і білірубіну. Тобто одночасне застосування кріодеструкції та екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки при лікуванні експериментального цирозу не тільки сприяло відновленню більшості найважливіших функцій печінки, але й удвічі прискорило їх нормалізацію на відміну від застосування вказаних методів окремо.

Вищевикладене свідчить про те, що поєднане застосування кріодеструкції і екстрактів кріоконсервованих фрагментів паренхіматозних органів забезпечує високу ефективність лікування експериментального цирозу печінки у щурів.

Автори висловлюють подяку ст. наук. співр., докт. біол. наук С.Є. Гальченку за методичну допомогу при виконанні цієї роботи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія / С.Є. Гальченко // Пробл. кріобіології. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 403-406.
2. Альперович Б.И. Криодеструкция как метод лечения хронического гепатита и цирроза печени (экспериментальное исследование) / Б.И. Альперович, А.В. Орлов, Ю.В. Киселева // Анналы хирургич. гепатологии.- 2005. – Т. 10, № 3. – С. 26–30.
3. Криохирургия – теория и практика / [В.В. Шафранов, Д.И. Цыганов, В.А. Виссарионов и др.] // Мед. криология: Сб. науч. тр. – Н.Новгород, 2001. – Вып.1. – С. 183–192.
4. Локальная криодеструкция печени / [Б.М. Даценко, Б.П. Сандомирский, Т.И. Тамм. и др.] // Анналы хирургич. гепатологии. – 1998. – Т. 3, № 3. – С. 269–270.
5. Подымова С. Д. Болезни печени / С. Д. Подымова. – М.: Медицина, 2005. – 767 с.
6. Слета И.В. Реакции крови на низкотемпературное повреждение нормальной и цирротически измененной печени кроликов / И.В. Слета // Вісник біології і медицини. – 2002. – № 9-10. – С. 45–47.
7. Стимуляция регенерации в лечении хронических гепатитов и циррозов печени / [С.А. Пышкин, П.Г. Димов, И.Ю. Пирогова, А.Н. Батанов] // Анналы хирургич. гепатологии.- 2004. – Т. 9, № 1. – С. 60–68.

SUMMARY

INFLUENCE OF CRIODESTRUCTION AND TISSUE EXTRACTS ON REGENERATION PROCESSES IN THE LIVER AT EXPERIMENTAL CIRRHOSIS

Hvorostov E.D., Bychkov S.O., Olefirenko O.O., Sleta I.V., Sandomyrski B.P.

The paper covers a combined study of the state of rat's liver with experimental cirrhosis after treatment by means of dosed cryohepatodestruction or/and injection of extracts of cryopreserved liver and spleen fragments. It was established that cryohepatodestruction initiates an opposite development of fibrosis and normalization of trabecular structure of hepatic parenchyma of rats with experimental cirrhosis of liver.

It also was established that the injection of extracts of cryopreserved fragments of liver and spleen in rats with experimental hepatic cirrhosis stimulates angiogenesis and accelerates the normalization of biochemical blood indices.

The efficiency and expediency of combination of cryosurgical hepatodestruction and injection of natural mixture of peptides being the components of extracts of parenchymatous organs when treating experimental cirrhosis in rats have been also shown.

Key words: hepatic cirrhosis, cryodestruction, organs' extract