

УДК: 616.36-002.2:612.354-092

О.Л. Холодкова, Д.М. Горчаг МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ ТЕРАПІЇ ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

Одеський національний медичний університет

Холодкова О.Л., Горчаг Д.М. Можливості використання збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальній терапії токсичного ураження печінки // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 63-65.

В роботі надані результати дослідження застосування аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) для лікування токсичного ураження печінки в експерименті на мишах. Показано, що введення ЗТП сприяє зниженню об'єму сполучної тканини та кількості колагенових волокон у місцях загибелі гепатоцитів внаслідок токсичного впливу, а також прискорює процес регенерації тканини печінки з відтворенням її нормальної мікроструктури.

Ключові слова: токсичне ураження печінки; збагачена тромбоцитами плазма; експеримент.

Холодкова Е.Л., Горчаг Д.М. Возможности использования обогащенной тромбоцитами плазмы при экспериментальной терапии токсического поражения печени // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 63-65.

В работе приведены результаты исследования применения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) для лечения токсического поражения печени в эксперименте на мышах. Показано, что введение ОТП способствует снижению объема соединительной ткани и количества коллагеновых волокон в местах гибели гепатоцитов вследствие токсического воздействия, а также ускоряет процесс регенерации ткани печени с восстановлением ее нормальной микроструктуры.

Ключевые слова: токсическое поражение печени; обогащенная тромбоцитами плазма; эксперимент.

Kholodkova O.L., Gorchag D.M. The possibilities of platelet-rich plasma usage in experimental treatment of toxic affection of the liver // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 63-65.

In the work the results of autologous platelet-rich plasma (PRP) usage in the treatment of toxic affection of the liver in mice is introduced. It is shown the PRP administration influences the decrease of the volume of connective tissue and the amount of collagen fibers at the places of hepatocytes destruction after the toxic affection, also rapid the process of regeneration of hepatic tissue with the restoration of its normal microstructure.

Key words: toxic affection of the liver; platelet-rich plasma; experiment.

На цей час токсичний гепатит є однією з найважливіших проблем сучасної гематології, оскільки його наслідком може бути фіброзування печінкової тканини з формуванням печінкової недостатності та цирозу [1]. У якості пошкоджуючих чинників виступає ціла низка речовин, що мають гепатотоксичний ефект [2].

Відсутність радикальних методів лікування тяжких наслідків токсичного ураження печінки викликає необхідність пошуку нових терапевтичних стратегій. На сьогодні розробляються методики, що засновані на використанні клітинних та генних технологій при лікуванні пацієнтів з цирозом печінки [3-5].

Одним з перспективних альтернативних підходів при відтворенні морфофункціонального стану різних органів являється застосування збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) [6]. ЗТП являє собою концентрат тромбоцитів у невеликому об'ємі плазми, при цьому вміст факторів росту, які беруть участь в процесах патологічної регенерації, перевищує їх концентрацію в периферичній крові в десятки разів [7]. Було показано, що тромбоцити містять велику кількість білкових молекул, в тому числі й сигнальних та мембранних протеїнів, цитокінів та інших біологічно активних речовин, які регулюють загоєння ран [8]. Використання ЗТП сприяє приживленню дентальних імплантатів, загоєнню хронічних трофічних норичь кінцівок, а також пошкоджених зв'язок та сухожилок та ін. [9-11].

У зв'язку з наведеним, метою нашої роботи було дослідження можливості використання ЗТП для відтворення печінки при токсичному гепатиті.

Матеріали та методи. Дослідження проведено на статевозрілих самцях мишей лінії ICR масою 28-32 г. Для моделювання фіброзу печінки перорально протягом 2 місяців внутрішньоплуноково вводили розчин чотирьох хлористого вуглецю концентрацією 50 % у дозі 0,05 мл [12].

ЗТП виділяли з цільної крові на апараті Smart-Prep (Harvester Corp., USA), свідоцтво про держреєстрацію № 10179/2011 згідно Наказу Держлікінспекції МОЗ України від 08 лютого 2011 р. № 69.

Розподіл тварин здійснювали наступним чином: I група – тварини з модельованим фіброзом печінки; II група – тварини з модельованим фіброзом печінки та наступним введенням ЗТП внутрішньопечінково двічі; III група – тварини з модельованим фіброзом печінки та наступним введенням фізіологічного розчину в ті ж самі терміни, що й ЗТП тваринам II групи; IV група – інтактні тварини.

Початком експерименту вважали перший день після останньої ін'єкції. Проводили патоморфологічне дослідження печінки з забарвленням за стандартними методиками [13, 14].

Підготування тварин до експерименту, всі інвазивні втручання, знеболювання та виведення з експерименту проводили згідно Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст.230 від 2006 р., із змінами, внесеними відповідно Закону № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст.76.

Результати. Через 2 тижні від початку експерименту у тварин I групи патоморфологічне дослідження виявило зменшення розмірів печінки у порівнянні з контролем. Спостерігалось утворення

вузлів по всій площі печінки. Розміри гепатоцитів були меншими порівняно з контрольною групою. Виявлялися зони некрозу та вакуольної дистрофії, монолобулярні вузлики. Судини характеризувалися кровонаповненням, порталні тракти біли розширені, виявлялися явища стазу та скупчення сполучної тканини навколо центральної вени. Спостерігалися сполучнотканинні тяжі від центру в напрямку периферії часточок (рис.1). В гепатоцитах виявлялися явища жирової дистрофії та зниження вмісту ШИК-позитивних речовин (рис.2).

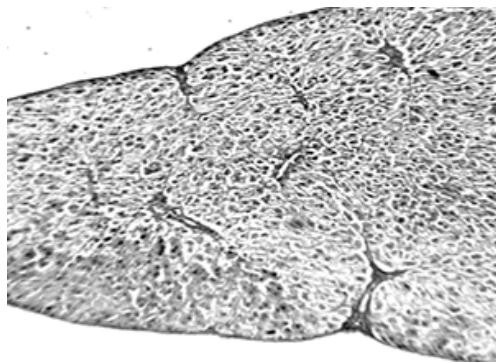


Рис. 1. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення. x 100. Печінка тварин через 2 тижні після закінчення введення тетрахлорметану – розростання сполучної тканини.

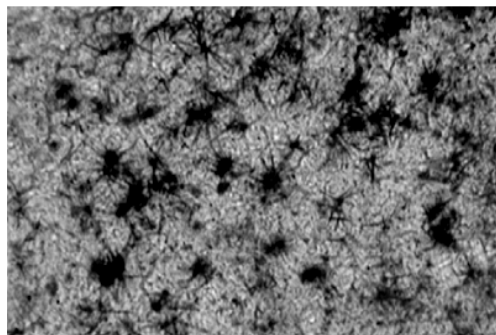


Рис. 2. Забарвлення Суданом III, збільшення x 200. Печінка тварин через 2 тижні після закінчення введення тетрахлорметану – ознаки жирової дистрофії.

У тварин II групи в цей самий термін розміри печінки повільно зменшені у порівнянні з контрольною групою. Спостерігаються поодинокі монолобулярні вузлики, поруч з якими розташовані велика кількість двоядерних гепатоцитів. Виявляються новоутворені судини та жовчні протоки в порталних трактах (рис.3). В окремих місцях знайдені ділянки з явищами лімфоцитарної інфільтрації центрального типу. Судини кровонаповнені. Портальні тракти помірно розширені. В центрі часточок виявлено розростання сполучної тканини, помірний периваскулярний фіброз з поодинокими явищами гіалінозу. У деяких тварин спостерігаються ознаки мікрокрапчастої жирової дистрофії на периферії часточок. Виявляється незначна кількість ШИК-позитивних речовин.

У тварин III групи розміри печінки зменшені у порівнянні з групою контролю. Паренхіма органу підлягла вузликовій трансформації. Виявляються гепатоцити з тіннями ядер. Спостерігаються зони некрозу, вакуольної дистрофії та порушення цілісності ядерної та цитоплазматичної мембран, розростання сполучної тканини з високим вмістом гістіоцитів та лімфоцитів.

чною мембран, розростання сполучної тканини з високим вмістом гістіоцитів та лімфоцитів.

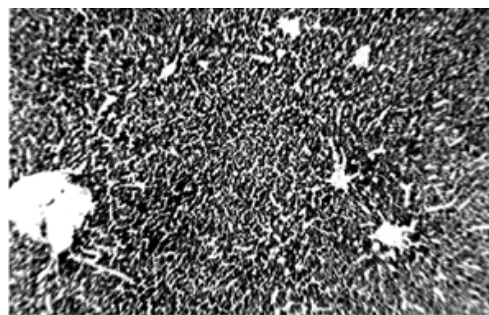


Рис. 3. Забарвлення гематоксилін-єозином. Збільшення x 100. Печінка тварин через 2 тижні після останнього введення ЗТП – велика кількість новоутворених судин.

Через 6 тижнів від початку експерименту у тварин I групи розміри печінки різко зменшені у порівнянні з контрольною групою. Гепатоцити значно зменшені в об'ємі, виявляються гранули гемосидерину, ознаки гідропічної дистрофії. В окремих ділянках спостерігається централобулярний некроз, атрофія трабекул. Портальні тракти розширені. Поміж широкими сполучнотканинними ділянками розташовані монолобулярні вузлики, що містять переважно, еластичні волокна (рис.4). Різко знижений вміст ШИК-позитивних речовин.

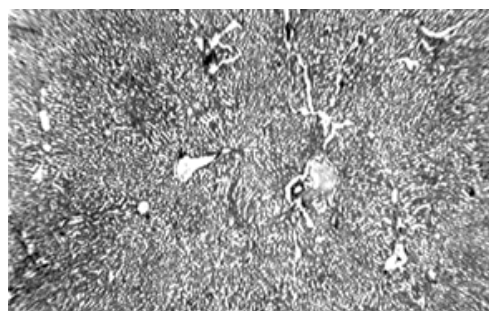


Рис. 4. Забарвлення гематоксилін-єозином. Збільшення x 100. Печінка тварин через 6 тижнів після закінчення введення тетрахлорметану – активне розростання сполучної тканини.

У тварин II групи в цей самий термін спостерігається нормалізація розмірів печінки. В поодиноких ділянках виявляються ознаки білкової дистрофії. Кількість двоядерних гепатоцитів різко зростає у порівнянні як з попереднім терміном дослідження, так і з контролем. В порталних трактах та септах виявлена велика кількість новоутворених судин та жовчних проток. Фіброзні перетинки різко потоншені, зменшений вміст колагенових судин. В центрі часточок спостерігається незначно виражений периваскулярний фіброз, помірно виражена мікрокрапчаста жирова дистрофія (рис.5). В центрі часточок виявляються ділянки з сполучнотканинними тяжами. Вміст ШИК-позитивних речовин значно підвищений у порівнянні з попереднім терміном спостереження та з даними тварин II групи.

Розміри печінки тварин III групи залишаються на рівні попереднього терміну. Спостерігається вузликова трансформація, вогнища некрозу, виражені сполучнотканинні тяжі.

Обговорення результатів та висновки. Співставлення результатів патоморфологічного до-

слідження печінки тварин на тлі експериментального фіброзу без лікування та після введення ЗТП показало, що застосування ЗТП сприяє активній регенерації тканини печінки. Вже через 6 тижнів після останнього введення ЗТП структура органу майже не відрізняється від такої у інтактних тварин. На протязі всього терміну спостереження у тварин без лікування спостерігалось розростання сполучної тканини на площі всього органу. В цей самий час у тварин після введення ЗТП виявлялося достовірне збільшення новоутворених судин, зберігалась балкова структура печінкових часточок, а наприкінці спостереження – збільшення кількості двоядерних гепатоцитів та синусоїдних клітин.

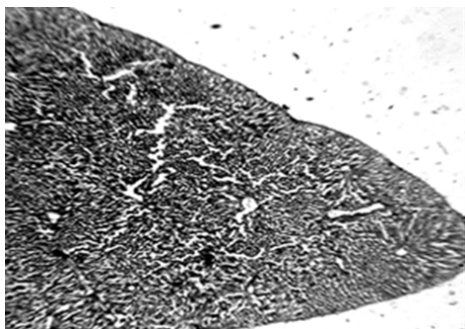


Рис. 5. Забарвлення за Ван Гізоном. Збільшення x 100. Печінка тварин через 2 тижні після останнього введення ЗТП – незначний фіброз та ознаки мікрокрасельної жирової дистрофії.

Збагачена тромбоцитами плазма являється автологічним концентратом крові, при використанні якого не потрібно імуносупресивної терапії, як це відбувається при застосуванні гетерогенних тканинних та клітинних препаратів. Крім того, ЗТП містить значну кількість цитокінів: епітеліальний фактор росту з тромбоцитів, фактор росту фібробластів, інсуліноподібний фактор росту, судинний ендотеліальний фактор росту та ін. [15]. Таке становище сприяє клітинному росту та диференціюванню, утворенню та росту судин, синтезу колагену, проліферації фібробластів, тобто процесам неоангіогенезу та регенерації тканини печінки після токсичного ураження. Той факт, що тромбоцити індують міграцію та адгезію стовбурових та прогеніторних клітин у ділянці ангіогенезу [16], може пояснити стимулювання проліферації та диференціації клітин у зрілі ендотеліальні попередники.

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити наступні **висновки**:

1. Застосування збагаченої тромбоцитами плазми сприяє зниженню об'єму сполучної тканини та кількості колагенових волокон у місцях загибелі гепатоцитів внаслідок токсичного впливу.

2. Введення ЗТП призводить до швидкої регенерації тканини печінки з відтворенням її нормальної мікроструктури.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати необхідно підтримати вивченням функціональної активності печінки з дослідженням біохімічних показників крові, а також відпрацювати найбільш оптимальні дози та кратність введення ЗТП.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Svegliati-Baroni G. Hepatic fibrinogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition / G. Svegliati-Baroni, S. De Minicis, M. Marzoni. // *Liver International*. – 2008. – Vol. 28 (8). – p. 1052-1064.
2. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved / C. Guyot, S. Lepreux, C. Combe, E. Dudnikoff, et al. // *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2006. – Vol. 38 (2). – p. 135-151.
3. Tangkijvanich P., Yee H.F.Jr. Cirrhosis – can we reverse hepatic fibrosis? / P. Tangkijvanich, H. F. Yee Jr. // *The European Journal of Surgery. Supplement*. – 2002. – Vol. 587. – p. 100-112.
4. Acute hepatotoxicity: a predictive model based on focused illumine microarrays / Zidek N., J. Hellmann, P. J. Kramer, P. G. Hewitt // *Toxicological Sciences*. – 2007. – Vol. 99 (1). – p. 289-302.
5. Terai Sh., Sakaida I. Current status of autologous bone marrow cell infusion therapy for liver cirrhosis patients / Sh. Terai, I. Sakaida // *The Japan Society of Hepatology Single Topic Conference: Resent Progress and Pathogenesis to Management, 28-29 September, 2007, Iwate, Japan*. – p. 72-75.
6. Robert E. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? / E. Robert // *DDS Implant Dentistry*. – 2001. – Vol.10, # 4. – p.7-9.
7. Fréchet J.-P. Platelet-rich Plasmas: Growth Factor Content and Roles in Wound Healing / J.-P. Fréchet, I. Martineau, G. Gagnon // *Journal Dental Resistant* – 2005. – Vol. 84. – P. 434.
8. Andia I. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies / I. Andia, M. Sanchez, N. Maffulli // *Expert Opinions on Biology and Therapy*. – 2010. – Vol. 10, N 10. – P. 1415 - 1426.
9. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF / P. Bendinelli, E. Matteucci, G. Dogliotti et al. // *Journal Cell Physiology* – 2010. – Vol. 225, N3. –P. 757 - 766.
10. Zhao Y. Research progress of platelet-rich plasma in promoting bone regeneration and repairing / Y. Zhao, W. Zhai // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. – 2010. – Vol. 24, N 8. – P. 1004 - 1008.
11. Cervelli V. Regenerative surgery: Use of fat grafting combined with platelet-rich plasma for chronic lower-extremity ulcers / V. Cervelli, P. Gentile, M. Grimaldi // *Aesthetic Plastic Surgery* – 2009. – Vol. 33. – P. 340 – 345.
12. Карташова О.Н., Блюгер А.И. Симуляция патологического процесса в печени. Рига: Звайгнэ, 1975. – 140 с.
13. Артишевский А.А. Гистология с техникой гистологических исследований / А. А. Артишевский, А.С. Леонтьев, Б.А. Слука. – Минск: Выпешная школа, 1999. – 236 с.
14. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. А.С. Саркисова и Ю.А. Петрова. – М.: Медицина, 1996. – 544.
15. Nonunions treated with autologous preparation rich in growth factors / M. Sanchez, E. Anitua, R. Cugat et al. // *Journal of Orthopaedic Trauma*. – 2009. – Vol. 23 (1). – P. 52-59.
16. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells / Lucarelli E., Beccheroni A., Donati D. et al. // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 3095 - 3100.

Надійшла 29.05.2013 р.
Рецензент: доц. В.М.Волошин