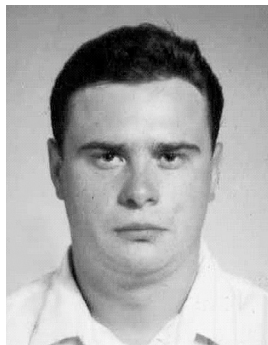


УДК 36–004–092.4–08:615.361.41.014.4



О.О. Олєфіренко, І.В. Слета, С.Є. Гальченко

Лікування експериментального цирозу печінки екстрактами кріоконсервованих фрагментів печінки та селезінки

Дорожня клінічна лікарня на станції Харків Південної залізниці
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

Ключові слова: цироз печінки, лікування, екстракти, регенерація.

Хронічний гепатит і цироз печінки посідають відповідно 2-ге та 4-те місця у структурі захворювань, які призводять до госпіталізації і втрати працездатності осіб віком 20–60 років [7–9], а також супроводжуються високим рівнем смертності. Це робить актуальним пошук 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. Однією з причин цього є відсутність підходів до стимулювання регенерації печінки.

Останніми роками для оптимізації процесів регенерації в органах і тканинах застосовують регуляторні пептиди. Вони не тільки підтримують цілісність органа або тканини в нормальних умовах, а й сприяють швидкому та ефективному їх відновленню при гострій чи хронічній дії будь-якого ушкоджуючого чинника, знижують ризик або виключають можливість розвитку патологічних форм регенерації (фіброз, метапластичне переродження клітин тощо) [6].

На сьогодні фізіологічно активні пептиди виділено практично з усіх внутрішніх органів. Однією з форм препаратів, що містять регуляторні пептиди, можуть бути екстракти тканин відповідних органів. Експериментальними дослідженнями встановлено стимулюючий регенерацію вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки новонароджених поросят і селезінки свиней при дифузних захворюваннях печінки [1].

Мета роботи – вивчення впливу суміші екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки на процеси відновлення в циротично зміненій печінці у щурів.

Матеріали та методи

Експерименти проведені на 195 безпородних білих щурах-самцях масою 200–250 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, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Експериментальну патологію печінки моделювали введенням 40%-го розчину тетрахлорметану [5]. Рівень смертності становив близько 15% від загальної кількості експериментальних тварин.

Щури з експериментальним цирозом були поділені на дві групи: контрольну (85 тварин, яким не проводили лікування цирозу печінки) та експериментальну (85 тварин, яким протягом 3 діб у черевну порожнину вводили по 1 мл суміші екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки новонароджених поросят і селезінки статевозрілих свиней (ЕПС)). Групу норми склали 25 тварин.

У роботі використана суміш водно-солевих екстрактів, одержаних з кріоконсервованих фрагментів печінки новонароджених поросят і селезінки статевозрілих свиней [1]. Вміст пептидів становив 100 мкг/мл.

Таблиця 1

Параметри мікроциркуляторного русла печінки щурів на 14-ту добу дослідження

Показник	Групи тварин		
	норма	контрольна	експериментальна
Середнє значення діаметра синусоїдів, мкм	9,28±2,18	7,67±0,84	8,91±2,01
Відносна площа мікросудин у полі зору	0,53±0,02	0,27±0,03	0,52±0,02

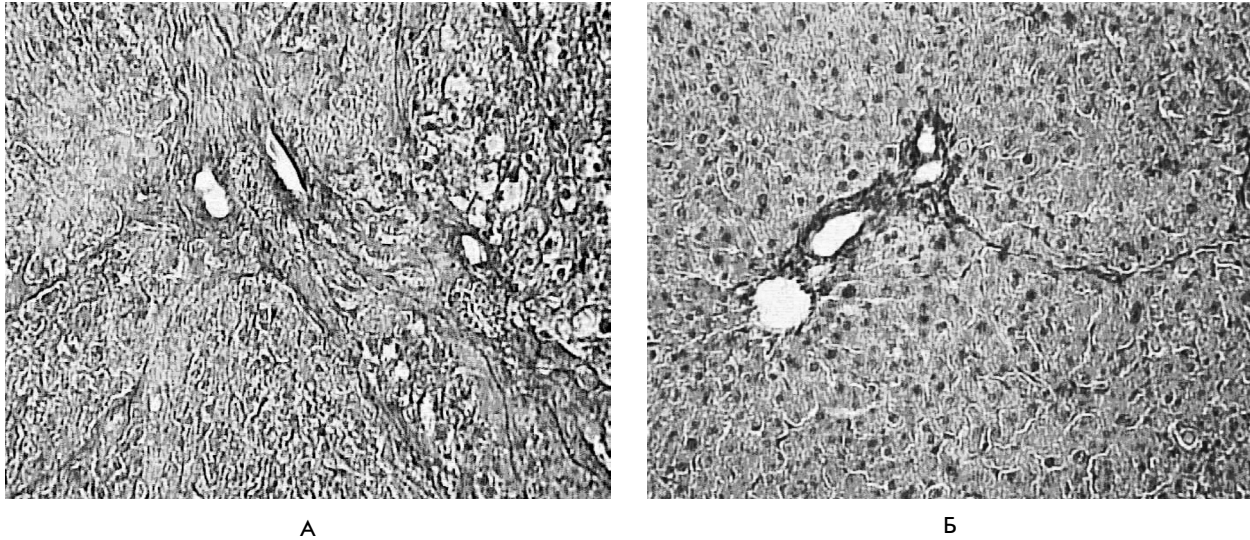


Рисунок. Гістологічна будова печінки щурів з експериментальним цирозом на 14-ту добу: без лікування (А); після введення ксеноекстрактів (Б). Гематоксилін та еозин. Об. $\times 20$, ок. $\times 12$

Мікрогемодикуляцію досліджували методом вітальної мікроскопії [4] за допомогою контактного мікроскопа «Люам К-1» у режимах поляризації і люмінесценції. Стан кровотоку в печінці оцінювали візуально при мікроскопії або на фотознімках об'єкта, одержаних за допомогою цифрового фотоапарата «Sony». Відеореєстрацію мікросудин печінки з об'єктива мікроскопа «Люам К-1» також проектували на чорно-білу телекамеру

«Panasonic VC 45 BSHRX-12» і вводили в комп'ютер у режимі on line. Аналіз одержаних зображень проводили за допомогою комп'ютерної програми «FRAM», призначеної для розрахунків морфометричних характеристик об'єкта [3].

Для гістологічних досліджень фрагменти печінки фіксували в 10%-му нейтральному формаліні і заливали у парафін. Одержані з парафінових блоків зрізи завтовшки 6–8 мкм забарвлювали ге-

Таблиця 2

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

Термін спостереження, доба	Групи тварин	
	контрольна	експериментальна
1-а	24,1 \pm 1,0 ¹ 58,12%	25,5 \pm 1,2 ¹ 61,4%
3-я	25,6 \pm 2,0 ¹ 61,7%	26,1 \pm 1,1 ¹ 62,9%
7-а	25,6 \pm 1,5 ¹ 61,8%	28,3 \pm 1,2 ¹ 68,2%
14-а	25,9 \pm 1,3 ¹ 62,55%	27,8 \pm 1,1 ¹ 67,0%
30-а	27,2 \pm 1,6 ¹ 65,5%	35,6 \pm 1,4 ^{1,2} 85,8%

Примітка. Концентрація альбуміну в нормі — (41,5 \pm 1,7) мг/мл; різниця статистично вірогідна ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин: ¹ — інтактних; ² — із цирозом печінки.

Таблиця 3

Активність АлАТ (ммоль·мл⁻¹·год⁻¹, % від норми) у сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки

Термін спостереження, доба	Групи тварин	
	контрольна	експериментальна
1-а	1,75±0,21 ¹ 473%	1,45±0,12 ¹ 392%
3-я	1,65±0,31 ¹ 446%	1,63±0,13 ¹ 440.5%
7-а	1,53±0,22 ¹ 413%	1,32±0,18 ¹ 357%
14-а	1,33±0,11 ¹ 359%	0,74±0,07 ¹ 200%
30-а	0,58±0,08 ¹ 157%	0,39±0,04 ² 105%

Примітка. Активність АлАТ у нормі — (0,37±0,04) ммоль·мл⁻¹·год⁻¹; різниця статистично вірогідна (p < 0,05) порівняно з показниками тварин: ¹ — інтактних; ² — із цирозом печінки.

мастоксиліном і еозином для отримання оглядових гістологічних препаратів. Стан сполучної тканини оцінювали на препаратах, забарвлених пікрофуксином за ван Гізоном для виявлення колагенових волокон.

Вміст ТБК-активних продуктів (ТБКАП) у сироватці крові визначали спектрофотометрично [2].

Активність аланін- і аспартатамінотрансферази (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, а також використовували пакет програм «Statistica» для Windows 5.1.

Результати та їхнє обговорення

Мікрогемоциркуляторне русло печінки щурів після двомісячного введення тетрахлорметану відповідало картині цирозу печінки. При цьому спостерігали різке зменшення кількості функціонуючих синусоїдів і феномен звивистості. Діаметр термінальних порталних венул був зменшений, а печінкових — значно збільшений. Відносна площа судинного русла була вдвічі меншою за норму і становила (27,35±2,92)% у полі зору. Спостерігали значну кількість шунтуючих судин. Про порушен-

ня мікрогемоциркуляції свідчила також внутрішньосудинна агрегація еритроцитів, уповільнення кровотоку, виключення з кровотоку частини синусоїдів. При введенні розчину ураніну виявлено зміни в архітектоніці жовчних каналців. При цирозі спостерігали різке зменшення жовчних каналців у полі зору, вони були потовщені, випрямлені, без сітчастої структури.

На гістологічних препаратах спостерігали картину вираженого цирозу печінки. 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. Часто спостерігали некротизовані клітини, переважно в центральних відділах печінкових часточок, а також вогнища некрозу всередині хибних часточок. Відношення строми до паренхіми становило 7,41±1,15 (у нормі — 0,98±0,09).

Дослідження лікувальної дії ЕПС на циротично змінену печінку щурів проведено на 7-му, 14-ту та 30-ту добу від початку експерименту.

На 7-му добу печінка тварин експериментальної групи була щільною, бурою, підтягнутою до діафрагми. Порушення архітектоніки мікроциркуляторного русла печінки, спричинені експериментальним цирозом, зберігалися в усіх тварин. Статистично достовірних відмінностей в основ-

Таблиця 4

Рівень ТБКАП (нмоль/мл, % від норми) у сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки

Термін спостереження, доба	Групи тварин	
	контрольна	експериментальна
1-а	9,83±1,12 ¹ 277%	9,27±1,06 ¹ 261%
3-я	8,86±1,01 ¹ 250%	8,69±1,08 ¹ 245%
7-а	8,52±0,85 ¹ 240%	6,87±0,74 ¹ 193%
14-а	7,75±0,65 ¹ 218%	5,34±0,44 ^{1,2} 150%
30-а	5,43±0,41 ¹ 153%	4,15±0,28 ² 117%

Примітка. Рівень ТБКАП у нормі — (3,55±0,17) нмоль/мл; різниця статистично вірогідна ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин: ¹ — інтактних; ² — із цирозом печінки.

них морфологічних показниках мікроциркуляторного русла та у гістологічній будові печінки тварин досліджуваних груп не виявлено.

На 14-ту добу печінка тварин експериментальної групи була більш еластичною, ніж у контрольній групі. В черевній порожнині виявлено невелику кількість асцитної рідини. У мікроциркуляторному руслі спостерігали збільшення площі судин із швидким струменевим кровотоком, агрегація еритроцитів була відсутня (табл. 1).

Мікроскопічне дослідження гістологічних препаратів печінки тварин експериментальної групи на 14-ту добу засвідчило, що в печінці формувалася 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 спостерігали застій крові з ознаками гемосидерозу. В окремих випадках виявлено переповнення жовчних капілярів. У гепатоцитах спостерігали переважно гідропічну та жирову дистрофію, трабекулярну будову паренхіми зафіксовано лише в 1/3 часточок.

У цей же строк спостереження в печінці тварин контрольної групи при мікроскопічному вивченні виявлено жирову і балонну дистрофію. Балонна будова часточок не визначалася. Фіброзна тканина, що оточувала вузли-регенерати і створювала хибні часточки, була розвиненою, в ній спос-

терігали фіброцити і фібробласти, що свідчило про подальше фіброзоутворення. Ознаками портальної гіпертензії були венозний застій, розширення центральних вен, гемосидероз, розширення артерій портальних трактів (рисунок).

На 30-ту добу в печінці тварин експериментальної групи кількість функціонуючих мікросудин помітно збільшилася, порівняно з тваринами контрольної групи, ділянки без судин були практично відсутні. Жовчні капіляри починали формувати мережу, близьку до нормальної.

Для виявлення ступеня фіброзу в печінці тварин контрольної та експериментальної груп проведено морфометричне дослідження величини співвідношення площі строми і паренхіми на гістологічних препаратах печінки в динаміці. При дослідженні препаратів, забарвлених за ван Гізоном, встановлено, що протягом 30 діб у циротично зміненій печінці величина цього показника практично не змінювалася. На 7-му добу вона дорівнювала 7,25±1,10 (норма — 0,98±0,09), а на 30-ту добу — 6,32±0,97. Це свідчить про необоротний характер фіброзу. У разі застосування ЕПС величина співвідношення площі строми і паренхіми зменшувалася і вже на 14-ту добу дорівнювала 3,16±0,62, а на 30-ту добу — 2,63±0,75, що статистично достовірно відрізняється від контрольного показника.

Дані щодо зміни концентрації альбуміну в сироватці крові щурів з цирозом печінки залежно від

Таблиця 5

Рівень загального білірубіну (мкмоль/л, % від інтактного контролю) в сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки

Термін спостереження, доба	Групи тварин	
	контрольна	експериментальна
1-а	16,18±1,12 ¹ 197%	16,08±1,15 ¹ 195%
3-я	16,05±1,35 ¹ 195%	15,56±1,03 ¹ 189%
7-а	15,74±0,78 ¹ 191%	12,54±0,87 ¹ 152%
14-а	13,95±1,1 ¹ 170%	10,15±0,76 ² 124%
30-а	9,68±0,85 118%	8,64±0,61 105%

Примітка. Рівень загального білірубіну в нормі — (8,21±0,54) мкмоль/л; різниця статистично вірогідна ($p < 0,05$) порівняно з показниками тварин: ¹ — інтактних; ² — із цирозом печінки.

умов експерименту наведено в табл. 2.

Одержані результати свідчать про те, що застосування ЕПС дає змогу через місяць досягти значного підвищення білоксинтетичної функції печінки у щурів з експериментальним цирозом.

Активність АЛАТ у тварин усіх груп протягом перших 3 діб спостереження перевищувала норму в 4 рази (табл. 3). На 7-му добу експерименту підвищення активності АЛАТ зберігалось на цьому ж рівні у тварин контрольної групи, а у тварин, які одержували ЕПС, намітилася тенденція до її зниження. Більш значну різницю у динаміці активності АЛАТ спостерігали на 14-ту добу від початку експерименту. В цей термін у тварин контрольної групи вона перевищувала норму в 3,6 рази, а у тварин, що одержували ЕПС, — в 2 рази.

На 30-ту добу спостереження тільки у тварин контрольної групи зберігалось підвищення активності АЛАТ (у 1,5 разу вище за норму). В експериментальній групі рівень активності ферменту знижувався до норми. Динаміка активності АсАТ принципово не відрізнялася від такої АЛАТ.

Нормалізація рівня печінкових амінотрансфераз через 14–30 діб у тварин з цирозом, що одержували ЕПС, свідчить про позитивний вплив ЕПС на внутрішньоклітинні репаративні процеси в гепатоцитах.

Загально визнано, що будь-які деструктивні процеси в організмі супроводжуються розвитком

синдрому пероксидації, тобто підвищенням рівня вільно-радикальних процесів у тканинах і викидом продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у кров.

У перші три доби рівень ТБКАП у сироватці крові був істотно підвищений у всіх групах досліджуваних тварин (табл. 4). Проте вже на 7-му добу спостереження швидкість зниження інтенсивності ПОЛ (за оцінкою рівня ТБКАП у сироватці крові) була різною. У групі тварин з цирозом, який не лікували, зберігався високий рівень ПОЛ (у 2,4 разу вищий за норму), тоді як у тварин, що одержували ЕПС, перевищення норми становило 1,9 разу. Ще більш виражені відмінності зафіксовані на 14-ту добу спостереження.

На 30-ту добу спостереження підвищений рівень ТБКАП в сироватці крові виявлено лише у тварин з цирозом печінки.

Загальноприйнятим показником стану екскреторної функції печінки є рівень білірубіну в сироватці крові. Білірубін — основний жовчний пігмент, який утворюється в результаті розпаду гемоглобіну та інших хромопротеїдів.

Динаміка загального білірубіну в сироватці крові щурів з експериментальним цирозом печінки наведена в табл. 5.

Отримані результати свідчать, що введення екстрактів кріоконсервованих фрагментів паренхіматозних органів забезпечує високу ефек-

тивність лікування експериментального цирозу печінки у щурів.

Висновки

1. Застосування екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки стимулює ангиогенез, відновлення гістологічної будови пошкодженого органа і сприяє зменшенню фіброзу печінки щурів з експериментальним цирозом.

2. Застосування екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і селезінки у щурів з експериментальним цирозом стимулює відновлення функціональної активності пошкодженої печінки: сприяє підвищенню рівня сироваткового альбуміну, зниженню секреції білірубину, поступовій нормалізації рівня печінкових амінотрансфераз, зниженню інтенсивності процесів ПОЛ.

Література

1. Гальченко С.Є. Склад водно-солевих екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней // Проблеми криобиол. — 2004. — Т. 14, № 4. — С. 72–78.
2. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — С. 176–234.
3. Луценко Д.Г., Марченко Н.В., Марченко В.С., Слета И.В. Комплекс для фрактальной морфометрии микроциркуляторного русла in vivo // Проблеми криобиол. — 2005. — Т. 15, № 3. — С. 516–518.
4. Сандомирский Б.П., Сигал Н.С., Дубровский К.В. и др. Низкие температуры при лечении хронических диффузных заболеваний печени. — К.: Наук. думка, 1992. — 134 с.
5. Слета И.В. Реакции микроциркуляции печени на низкотемпературное воздействие // Пробл. криобиологии. — 2002. — № 3. — С. 121–122.
6. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Чалисова Н.И., Григорьев Е.И. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста // Успехи геронтол. — 2002. — Вып. 9. — С. 278–285.
7. Яковенко Э.П., Григорьев П.Я. Хронические заболевания печени: диагностика и лечение // Рос. мед. жур. — 2003. — Т. 11, № 5. — С. 291–296.
8. Syong J.C., Ki S.M., Iijima K. Clinical and pharmacological studies on liver diseases treated with Kampo herbal medicine // Am. J. Chin. Med. — 2000. — Vol. 28, N 3–4. — P. 351–360.
9. Heidelbaugh J.J., Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation // Am. Fam. Physician. — 2006. — Vol. 74, N 5. — P. 756–762.

А.А. Олефиренко, И.В. Слета, С.Е. Гальченко

Лечение экспериментального цирроза печени экстрактами кріоконсервированных фрагментов печени и селезенки

Представлены результаты исследования влияния экстрактов кріоконсервированных фрагментов печени и селезенки на процессы регенерации в цирротически измененной печени. Установлено, что применение тканевых экстрактов стимулирует восстановление функциональной активности поврежденной печени: способствует повышению уровня сывороточного альбумина, снижению секреции билирубина, нормализации уровня печеночных аминотрансфераз, снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов. Выявлено нормализацию гистологического строения печени крыс с экспериментальным циррозом.

O.O. Olefirenko, I.V. Sleta, S.E. Galchenko

Experimental liver cirrhosis treatment with the extracts of liver and spleen cryopreserved fragments

The article presents results of the study of effects of extracts of liver and spleen cryopreserved fragments on the regeneration processes in the cirrhotic altered liver. It has been established that the use of tissue extracts results in the stimulation of regeneration of the functional activity of injured liver, promoting the increase of serum albumin levels, reduction of bilirubin secretion, normalization of the liver aminotransferases levels, decrease of the intensity of lipid peroxidation processes. Moreover the normalization of the histological structure of rodents' liver with experimental cirrhosis has been revealed.