

С.А. Лепехова^{1, 2, 3}, О.А. Гольдберг¹, К.А. Апарцин^{1, 2, 3}, М.В. Прокопьев^{1, 4}**ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫЙ ПОДХОД К КЛЕТОЧНОЙ КОРРЕКЦИИ ОСТРОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА СПОСОБА ЛЕЧЕНИЯ**¹ ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (Иркутск)² ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России (Иркутск)³ ФГБУН «Иркутский научный центр» СО РАН (Иркутск)⁴ ГБУЗ «Иркутская ордена «Знак почета» областная клиническая больница» (Иркутск)

Представленная работа посвящена оценке морфологических изменений в печени у экспериментальных животных с острой печеночной недостаточностью, вызванной токсическим повреждением печени, под влиянием ксенотрансплантации культуры криоконсервированных клеток печени и изолированных криоконсервированных неонатальных гепатоцитов.

Установлено, что к шестым суткам в печени у животных с ксенотрансплантацией культуры криоконсервированных клеток печени преобладают неповрежденные гепатоциты с одновременным уменьшением числа вакуолизированных клеток, сохранность балочной структуры, уменьшение жировых включений. При трансплантации изолированных неонатальных гепатоцитов количество гепатоцитов с сохраненной структурой снижалось, а количество поврежденных гепатоцитов — возрастало. Таким образом, клетками выбора коррекции острого токсического повреждения печени являются культивированные криоконсервированные клетки печени.

Ключевые слова: острая печеночная недостаточность, клетки печени, трансплантация, морфология

DIFFERENTIATED APPROACH TO CELL CORRECTION OF ACUTE HEPATIC FAILURE AT THE ACUTE TOXIC INJURY. MORPHOLOGICAL BASIS OF CHOOSING THE WAY OF TREATMENTS.A. Lepekhova^{1, 2, 3}, O.A. Goldberg¹, K.A. Apartsin^{1, 2, 3}, M.V. Prokopyev^{1, 4}¹ Scientific Center of Reconstructive and Restorative Surgery SB RAMS, Irkutsk² Irkutsk State Medical University, Irkutsk³ Irkutsk Scientific Center, Irkutsk⁴ Irkutsk Regional Clinical Hospital

The article is devoted to the estimation of morphological changes in liver of experimental animals with acute hepatic failure caused by toxic injury of liver under the influence of xenotransplantation of culture of cryopreserved cells of liver and isolated cryopreserved neonatal hepatocytes.

It was determined that undamaged hepatocytes with simultaneous decrease of number of vacuolated cells, preservation of beam structure, decrease of fat insertions prevailed in the liver of animals with xenotransplantation of culture of cryopreserved cells of liver to the 6th day. At the transplantation of isolated neonatal hepatocytes number of hepatocytes with undamaged structure decreased and number of damaged hepatocytes increased. Thus, cultivated cryopreserved cells of liver are the cells of choice of correction of acute toxic liver injury.

Key words: acute hepatic failure, cells of liver, transplantation, morphology

Неудовлетворительные результаты лечения больных с острой печеночной недостаточностью с использованием традиционных методов лечения диктуют необходимость поиска новых методов. По мнению многих исследователей, наиболее перспективным направлением в лечении печеночной недостаточности является использование «клеточной терапии», включающей изолированные ксено- или аллогепатоциты [3, 6]. В настоящее время механизм действия клеток печени, применяемых для коррекции печеночной недостаточности, нельзя считать выясненным окончательно. Обсуждаются виды клеток и способы их введения.

Ряд авторов полагает, что лечебный эффект в основном связан с органозамещающей функцией [4, 6].

Однако известно, что трансплантированные изолированные гепатоциты не столько увеличивают функционирующую массу печени, сколько

изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функций оставшихся гепатоцитов реципиента и регенерацию путем выработки регуляторных пептидов, среди которых ведущая роль принадлежит факторам роста [5, 7, 8].

Для оценки дифференцированного подхода к клеточной коррекции острой печеночной недостаточности при остром токсическом повреждении печени было проведено морфологическое исследование.

Целью настоящего исследования была оценка морфологических изменений в печени у экспериментальных животных с острой печеночной недостаточностью, вызванной токсическим повреждением печени, под влиянием ксенотрансплантации культуры криоконсервированных клеток печени и изолированных криоконсервированных неонатальных гепатоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена на базе научного отдела экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН.

Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к воде и пище соответственно нормативам ГОСТа «Содержание экспериментальных животных в питомниках НИИ» (вет. удостоверение 238 № 0000023 от 28 ноября 2011 г., служба ветеринарии Иркутской области). В эксперимент включали крыс-самцов породы Вистар в возрасте не менее 6 месяцев, весом 200 – 250 г. Опыты на животных выполнялись в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР № 742 от 13.11.84 г. «Об утверждении правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и № 48 от 23.01.85 г. «О контроле за проведением работ с использованием экспериментальных животных», а также основывались на положениях Хельсинской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983 и 1989 гг.

У всех экспериментальных крыс моделировали острое токсическое повреждение печени (ОТП). Моделирование ОТП печени выполняли путем подкожного введения четыреххлористого углерода (ЧХУ) чистого для анализов (ЧДА) из расчета 0,5 мг\100г массы животного по А. Фишеру (1961) [2].

Через сутки после индукции острого токсического повреждения печени животных относили к экспериментальным группам методом случайного распределения, таким образом, в исследование вводили животных с индуцированной ОПН. Отправной точкой эксперимента было введение крысам препарата, определяющего в дальнейшем их групповую принадлежность. Проведено исследование морфологических изменений под влиянием ксенотрансплантации криоконсервированной культуры эмбриональных клеток свиной печени (КТ ККП) (1.1), ксенотрансплантации криоконсервированных неонатальных гепатоцитов (КТ НГ)

(1.2) после введения физиологического раствора (1.3), лекарственного препарата гептрал (1.4) и питательной среды для культивирования клеток печени (1.5).

Распределение животных на группы в зависимости от характера воздействия представлено в таблице 1.

Клетки печени получали по оригинальной методике (ферментативно-механический способ дезагрегации). Суспензию клеток в концентрации 2×10^6 в 1 мл вводили инъекционно в подкожно-жировую клетчатку передней брюшной стенки через сутки после введения четыреххлористого углерода.

Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Исследовали депарафинированные срезы, окрашенные гематоксилином и эозином, ПАС-реакцией и с окраской на липиды.

Препараты исследовали в фотомикроскопе 111 (К. Цейсс, Германия). Для определения клеточного состава ткани печени, выведенных из эксперимента животных на 2-е, 5-е, 11-е сутки эксперимента проводили количественную оценку методом счетного квадрата по Автандилову с использованием окуляр-микрометра [1].

С помощью окулярной морфометрической сетки подсчитывали количество паренхиматозных клеток и непаренхиматозных клеточных элементов (площадь каждого поля зрения составляла 25600 мкм²) на препаратах печени 6 крыс каждой группы. Подсчет паренхиматозных клеток по диаметру ядер ГЦ (7, 9, 12 мкм и более). Среди непаренхиматозных клеток определяли клетки Купфера (КК), эндотелиоциты, лимфоциты, сегментоядерные лейкоциты. Для оценки морфологических изменений применяли интегрированные показатели – коэффициенты соотношения паренхиматозных и непаренхиматозных клеток [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование морфологии печени крыс основной 1.1 и контрольных групп 1.2 – 1.5 на 2-е сутки эксперимента при световой микроскопии выявило однотипные изменения, характерные для острого токсического повреждения: центрлобулярные коагуляционные некрозы гепатоцитов, вакуолизация

Таблица 1

Характеристика экспериментальных групп

Распределение животных на группы и методы исследования в первой серии экспериментов			
№ п/п	Характер воздействия	Кол-во животных	Методы исследования
1.1	Подкожная инъекция 2×10^6 криоконсервированной ККП в 1 мл взвеси	20	световая микроскопия, электронная микроскопия
1.2	Подкожная инъекция 2×10^6 криоконсервированных НГ в 1 мл взвеси	20	
1.3	Подкожная инъекция 1 мл физиологического раствора	20	
1.4	Подкожная инъекция 0,5 мл гептрала	20	
1.5	Подкожная инъекция 1 мл питательной среды	20	
Всего		100	

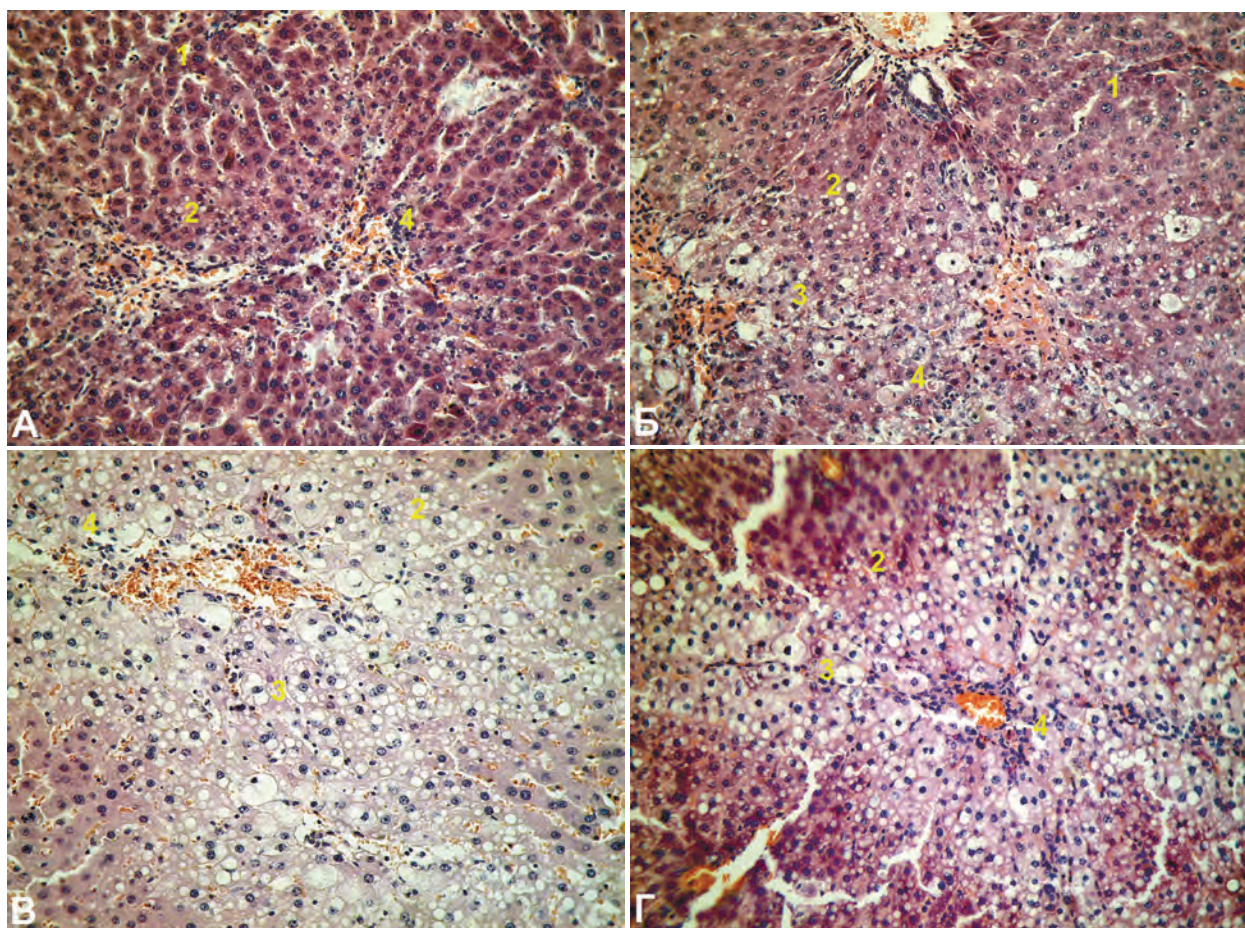


Рис. 1. Структура печени при ОТП, 4-е сутки эксперимента, световая микроскопия: А – основная группа 1.1; Б – контрольная группа 1.2; В – контрольная группа 1.3; Г – контрольная группа 1.4; 1 – балки ГЦ; 2 – вакуолизованные ГЦ; 3 – очаги, соответствующие локализации липидов при окраске суданом III; 4 – макрофаги, лейкоциты, лимфоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 150$.

гепатоцитов и их липидная инфильтрация, участки дисконформации балочных структур.

Различия патоморфологической картины становились заметными на 4-е сутки эксперимента (рис. 1).

В отличие от картины выраженных деструктивных изменений, характерной для контрольных групп (расширение синусоидальных капилляров со скоплениями эритроцитов; скопления нейтрофилов и лимфоцитов около некротически измененных гепатоцитов; увеличенные в объеме, выступающие в просвет капилляров ядра ретикулоэндотелиальных клеток; прогрессирующая или тотальная жировая и гидропическая дистрофия гепатоцитов), изменения в печени животных основной группы с ксенотрансплантацией криоконсервированной культуры клеток печени были умеренными. Так, выявляли полнокровие сосудов, гидропическую и балонную дистрофию единичных гепатоцитов, мононуклеарную инфильтрацию. Характерным было восстановление архитектоники балок. Отметим, что в группе 1.2 с ксенотрансплантацией криоконсервированных неонатальных гепатоцитов изменения были менее выраженными, чем в других контрольных группах, но более выраженными, по сравнению с группой, где выполняли

ксенотрансплантацию криоконсервированной культуры клеток печени.

К шестым суткам исследования (рис. 2) в печени животных основной группы 1.1 с ксенотрансплантацией криоконсервированной культуры клеток печени отмечали небольшое количество вакуолизованных гепатоцитов, восстановление архитектоники балок. В контрольной группе 1.2 с ксенотрансплантацией криоконсервированных неонатальных гепатоцитов отмечали выраженные изменения, характерные для токсического повреждения с явлениями гидропической, жировой дистрофии гепатоцитов; мостовидными некрозами гепатоцитов. В контрольной группе 1.4 нарастают явления жировой и гидропической дистрофии до 1/2–2/3 паренхимы печени, сохраняется дисконформация балочных структур.

Для количественной оценки гепатопротективных эффектов ксенотрансплантации весь спектр клеток печени крысы был условно разделен нами на три группы. Выделяли ГЦ без признаков повреждения и ГЦ с разной степенью вакуолизации цитоплазмы (с крупными вакуолями) и непаренхиматозные фагоцитирующие клетки (макрофаги, нейтрофильные лейкоциты, эндотелиальные клетки) (табл. 2).

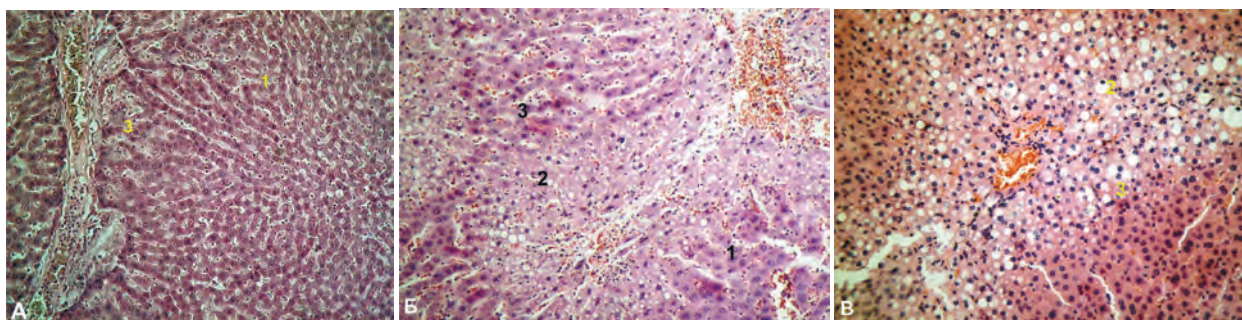


Рис. 2. Структура печени при ОТП, 6-е сутки эксперимента, световая микроскопия: А – основная группа 1.1; Б – контрольная группа 1.2; В – контрольная группа 1.4; 1 – балки ГЦ; 2 – вакуолизованные ГЦ; 3 – дисконкомплексация балочных структур. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. × 150.

Таблица 2
Результаты количественной морфометрии печени животных по данным световой микроскопии в первой серии экспериментов (медиана, квартили)

Клеточные элементы	Сутки	Экспериментальные группы				
		1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
Сохранившиеся гепатоциты	4-е	30,6*;** (27,8–34,6)	24,0*;** (23,0–25,0)	14,6*;*;*;*;* (13,8–16,8)	14,9*;*;*;*;* (11,4–17,0)	15,6*;*;*;*;* (14,0–16,0)
	6-е	47,6# (34,6–56,6)	33,5*;*;*;*# (30,0–36,0)	–	13,6*;*;*;*;* (12,0–15,6)	–
Норма		49,3 (46,4–52,0)				
Вакуолизованные гепатоциты	4-е	2,9*;** (1,8–4,4)	5,7*;** (3,4–6,4)	16,0*;*;*;*;* (15,0–16,8)	16,2*;*;*;*;* (11,6–21,8)	15,7*;*;*;*;* (10,6–17,2)
	6-е	1,0# (1,0–2,0)	5,6*;*;* (4,6–7,1)	–	17,2*;*;*;*;* (14,8–18,4)	–
Норма		0				
Непаренхиматозные клетки печени	4-е	14,3 (12,6–17,4)	14,5 (12,9–16,8)	19,6*;*;*;*;* (18,0–21,8)	22,6*;*;*;*;* (21,4–23,2)	16,6* (14,4–18,4)
	6-е	20,2*;*# (14,4–27,2)	15,6 (13,9–17,5)	–	19,2*;*# (17,6–19,8)	–
Норма		11,0 (8,0–12,0)				

Примечания: * – значимые различия по критерию Даннета, в сравнении с нормальным показателем ($p_0 \leq 0,05$); ** – значимые различия по критерию Ньюмана – Кейлса, по сравнению с 1.3 ($p_{N-K} \leq 0,05$); *** – значимые различия по критерию Манна – Уитни, по сравнению с группой 1.1 ($p_U \leq 0,05$); **** – значимые различия по критерию Манна – Уитни, по сравнению с группой 1.2 ($p_U \leq 0,05$); # – значимые различия по критерию Вилкоксона, по сравнению с предыдущим показателем в той же группе ($p_W \leq 0,05$).

Соотношение клеточных элементов в печени животных основной и контрольных групп оказалось различным к 4-м суткам эксперимента. В основной группе удельный вес неповрежденных гепатоцитов был существенно ($p_U \leq 0,0001$) выше, а вакуолизованных – ниже ($p_U \leq 0,0001$), чем в контроле (1.3–1.5).

К 6-м суткам выявлено достоверное повышение ($p_W = 0,008$) количества неповрежденных ГЦ в печени крыс основной группы с одновременным уменьшением ($p = 0,001$) числа вакуолизованных клеток. В группах контроля, напротив, количество гепатоцитов с сохраненной структурой несколько снижалось, а поврежденных – возрастало. Лишь в отношении пула фагоцитирующих клеток был определен однонаправленный сдвиг – количество этих элементов не имело межгрупповых различий и существенно ($p < 0,03$) возрастало к следующему сроку исследования, по сравнению с предыдущим.

Установлено, что к 6-м суткам в печени у животных с ксенотрансплантацией культуры криоконсервированных клеток печени преобладают

неповрежденные гепатоциты с одновременным уменьшением числа вакуолизованных клеток, сохранность балочной структуры; уменьшение жировых включений. При трансплантации изолированных неонатальных гепатоцитов, количество гепатоцитов с сохраненной структурой снижалось, а поврежденных – возрастало. Таким образом, клетками выбора являются культивированные криоконсервированные клетки печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Морфометрия в патологии. – М.: Медицина, 1973. – 248 с.
2. Лепехова С.А., Апарцин К.А., Прокопьев М.В., Гольдберг О.А. Экспериментальное исследование эффектов ксенотрансплантации клеток печени // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2006. – Т. 11, № 3. – С. 49.
3. Фишер А. Физиология и экспериментальная патология печени. – Будапешт, 1961. – 230 с.
4. Castell J.V., Gómez-Lechón M.J. Liver cell culture techniques // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 481. – P. 35–46.

5. Heping Y. et al. Effects of hepatocyte growth factor on glutathione synthesis, growth, and apoptosis in cell // Exp. Cell Res. — 2008. — Vol. 314, N 2. — P. 398 — 412.

6. Liu K.X., Kato Y., Matsumoto K., Nakamura T. et al. Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes // Pharm Res. — 2009. — Vol. 26, N 4. — P. 1012 — 1021.

7. Shimizu M., Takakuwa Y., Nitta S. et al. Study of stimulation-secretion coupling in a flow culture system: periodic secretion of hepatocyte growth factor by interleukin-1 alpha-stimulated human embryonic lung fibroblasts // Biochem. Biophys. Acta. — 2001. — Vol. 1244, N 2 — 3. — P. 357 — 362.

8. Weber A. et al. Hepatocyte transplantation in animal models // Liver Transpl. — 2009. — Vol. 15, N 1. — P. 7 — 14.

Сведения об авторах

Лепехова Светлана Александровна – доктор биологических наук, заведующая научным отделом экспериментальной хирургии с виварием ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100; тел.: 8 (3952) 40-76-67)

Гольдберг Олег Аронович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патоморфологии ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664003, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100; тел.: 8 (3952) 40-76-66)

Апарцин Константин Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора центра по научно-лечебной работе ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН (664079, г. Иркутск, мкр. Юбилейный, 100; тел.: 8 (3952) 40-78-25)

Прокопьев Максим Владимирович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии» СО РАМН, заведующий операционным блоком ГБУЗ «Иркутская область «Знак почета» областная клиническая больница»