

Головнева Е.С.², Онищенко Н.А.², Кравченко Т.Г.¹, Ревель–Муроз Ж.А.¹,
Гиниатуллин Р.У.¹, Еловских И.В.², Шевцова Е.Ю.¹

Особенности репаративных процессов в печени после лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга

1 - ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск; 2 - ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Челябинск

Golovneva E.S., Onischenko N.A., Kravchenko T.G., Revel-Muroz J.A., Giniatullin R.U., Elovskikh I.V., Shevtsova E.Yu.

Reparative processes in liver after laser exposure of bone marrow localization zones

Резюме

Исследованы особенности репаративных процессов в резецированной печени после лазерного воздействия на зоны локализации красного костного мозга. В эксперименте на крысах моделировали клиновидную резекцию доли печени. Лазерное воздействие осуществляли инфракрасным лазером в течение 5 суток после операции. После морфометрического анализа препаратов печени отмечено усиление пролиферации гепатоцитов с повышением индекса ki-67 и ядерно-цитоплазматического отношения, увеличение содержания двуядерных гепатоцитов, повышение уровня экспрессии VEGF и Hsp 70, что является свидетельством успешно протекающих восстановительных процессов и неоангиогенеза. Полученные данные об активации регенерации печеночной ткани после лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга могут являться основой для разработки методов лечения пациентов с заболеваниями печени.

Ключевые слова: печень, лазер, регенерация, костный мозг

Summary

We investigated the features of reparative process in the resected liver after laser irradiation of the zones of red bone marrow localization. In rat experiment, the wedge-shaped resection of a liver lobe was performed. Infrared laser was applied for 5 days after the operation. The histological analysis of liver specimens demonstrated the increase in hepatocyte proliferation with the increase in the ki-67 index and the nuclear-cytoplasmic ratio, the increase in binuclear hepatocytes number, the increase in the expression level of VEGF and Hsp 70 in the laser treatment group that is the evidence of successful recovery process and neoangiogenesis. The activation of hepatic tissue regeneration after laser irradiation of bone marrow localization zones may be the basis for the development of methods for treatment of liver disease patients.

Keywords: liver, laser, regeneration, bone marrow

Введение

Нарушения структуры и функции печени достаточно распространены в медицинской практике и связаны не только с заболеваниями гепато-билиарной системы, но и с проводимым хирургическим лечением цирроза печени, опухолей, паразитарных инвазий. В норме потенциала печени достаточно для самостоятельной регенерации, но при хронических тяжелых заболеваниях и резекции свыше 80% объема ткани этих ресурсов может не хватать. В таком случае, для быстрого восстановления ткани печени могут быть использованы методики активации собственных клеточных резервов организма, представленных как дифференцированными гепатоцитами, так и стволовыми клетками [1,2,3].

Одним из главных продуцентов регуляторных стволовых клеток является красный костный мозг. В периферическую кровь постоянно поступает небольшое количество так называемых циркулирующих стволовых клеток (ЦСТ). Показано, что ЦСТ содержат целый ряд факторов роста, цитокинов и медиаторов, влияющих на репарацию поврежденных тканей, регулирующих апоптоз, стимулирующих неоангиогенез и пролиферацию других клеток. [3,4,5,6].

При массивных повреждениях тканей, хронической ишемии, сахарном диабете наблюдается дефицит ЦСК, усугубляющийся при физиологическом старении организма и приводящий к нарушениям репарации тканей [4,5]. Применение различных экстремальных факторов

(ультразвуковое воздействие, лазерное излучение, гипертермическое воздействие) может стимулировать миграцию стволовых клеток из костного мозга в кровь [5].

Ранее было показано, что после лазерного воздействия на костный мозг происходит усиление миграции CD34+ клеток в кровь и стимуляция репарации различных тканей - миокарда, мышц, кожи [5,7], но влияние этого метода терапии на репаративные процессы в печени не изучалось.

Цель работы

Изучение особенностей репаративных процессов в печени с хирургическим повреждением после лазерного воздействия на зоны локализации красного костного мозга.

Материалы и методы

Исследование проведено на 48 белых беспородных половозрелых крысах, (масса 120-150 г.)

Операция клиновидной резекции доли печени проводилась под внутримышечным наркозом Золетилом (Вирбак, Франция). В положении животного на спине осуществляли разрез кожи и мышц передней брюшной стенки по белой линии живота, после фиксации сосудистой ножки левой боковой доли печени сосудистым пластиковым зажимом, производили скальпельную резекцию печеночной ткани на глубину 0,5 см и шириной 0,5 см. Гемостаз проводили прижатием марлевого тампона к зоне резекции на 3 минуты, после чего сосудистый зажим снимали и производили ушивание мышц и кожи передней брюшной стенки узловым швом.

Прооперированных животных путем случайной выборки делили на две группы: контроль (резекция печени без воздействия лазером на костный мозг) и опыт (резекция печени с воздействием лазера).

Для воздействия на красный костный мозг применялся инфракрасный лазер с длиной волны 980 нм, мощностью 0,5 Вт. Лазерное воздействие начинали сразу после операции клиновидной резекции печени, 1 раз в сутки по 1 минуте на зону (бедренные, подвздошные кости, крестец и основание хвоста).

Выведение животных из эксперимента осуществляли путем дислокации спинного мозга в шейном отделе позвоночника под эфирным наркозом на сроках 1, 3, 5, 10 суток после оперативного вмешательства. Препараты печени фиксировались нейтральным формалином, парафиновые срезы после стандартной гистологической проводки окрашивали гематоксилин-эозином. Иммуногистохимически, с применением специфических антител и системы мечения на основе биотин-стрептавидин-пероксидазного метода выявляли экспрессию ki-67, HSP 70 и VEGF (Biorbyt, США). Морфометрически производилась оценка ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО), количества двуядерных гепатоцитов, относительной площади экспрессии VEGF, HSP 70 и индекса экспрессии ki-67.

Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Statistica 6.0 методом Манна-Уитни, результаты представлены в виде медианы (25;

75 процентиль), отличия между группами признавались значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Визуальная оценка зоны резекции печени показала, что в опытной группе (лазерное воздействие на костный мозг) с 5 суток эксперимента, площадь сформированного рубца была меньше по сравнению с контролем, отсутствовали спайки между поверхностью печени и окружающими тканями.

При морфометрическом исследовании гистологических препаратов ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) у животных контрольной группы и опытной группы увеличивалось на протяжении всего срока эксперимента. Однако в группе лазерного облучения зон локализации костного мозга, ЯЦО было достоверно выше, чем в группе контроля на 1, 3 и 10 сутки (Таблица 1).

Количество двуядерных гепатоцитов увеличивалось после резекции печени как в опытной, так и в контрольной группе, но на сроках 1 и 3 суток было достоверно выше в группе лазерного воздействия на костный мозг (Таблица 1).

Индекс экспрессии ki-67 в группе лазерного воздействия был достоверно выше показателей контроля с 1-х суток эксперимента и до 10 суток (Таблица 1).

Относительная площадь экспрессии HSP 70 и VEGF в группе лазерного воздействия превышала уровень контрольной группы на всех сроках эксперимента, начиная с 1 суток (Таблица 1).

Ускорение процессов регенерации печени после увеличения концентрации стволовых клеток в периферической крови в ответ на лазерное облучение костного мозга могло быть объяснено несколькими причинами. Во-первых, дифференцировкой стволовых клеток с маркерами CD34+ до эндотелиальных клеток, формирующих новые сосуды, а клеток с маркерами мезенхимальных стволовых клеток - до гепатоцитов. Однако количество клеток, вступающих на подобный путь дифференцировки крайне мало [3,4]. Основные эффекты от повышения концентрации стволовых клеток в кровотоке реализуются благодаря содержащимся в них цитокинам и факторам роста, которые паракринно влияют на восстановление поврежденных тканей и заживление ран, ингибируют апоптоз, являются хемоаттрактантами для других CD34+ клеток, стимулирующих сосудистый рост и микроциркуляцию. Это позволяет поле лазерного воздействия на костный мозг запустить пролиферацию собственных клеток печени, как за счет звездчатых клеток, так и делящихся гепатоцитов, что подтверждают наши результаты. Увеличение ядерно-цитоплазматического отношения отражает ускорение пролиферации клеток, в частности подготовку клетки к митозу, поэтому наблюдаемый прирост этого показателя свидетельствует об увеличении количества клеток готовых вступить на путь деления.

В настоящее время известно, что образование двуядерных гепатоцитов из одноядерных при репаративной регенерации представляет собой резерв полиплоидизации [8]. Общим принципом регенерации является вос-

Таблица 1. Динамика маркеров пролиферации в ткани печени после лазерного воздействия на красный костный мозг

Параметр/маркер	Группы эксперимента	1 сутки	3 суток	5 суток	10 суток
ki-67	контроль	8(7;8)	9(9;10)	15(13;15)	15(15;16)
	опыт	11(10;11)*	15(15;15)*	25(24;25)*	25(25;25)*
Hsp70, у.е.	контроль	10(10;11)	12(11;12)	15(15;15)	13(13;14)
	опыт	22(21;22)*	23(23;25)*	22(22;23)*	16(15;17)*
VEGF, у.е.	контроль	13(12;13)	14(12;15)	16(16;17)	15(15;16)
	опыт	24(24;25)*	30(30;32)*	45(44;45)*	35(35;37)*
ЯЦО	контроль	0,15(0,13;0,18)	0,2(0,17;0,21)	0,27(0,25;0,28)	0,23(0,21;0,25)
	опыт	0,20(0,18;0,22)*	0,26(0,22;0,32)*	0,30(0,25;0,33)	0,27(0,23;0,30)*
Количество двуядерных гепатоцитов /1мм ²	контроль	35,4(33,2;49,8)	43,2(33,2;49,8)	71,4(66,4;83,0)	65,6(49,8;83,0)
	опыт	44,8(33,2;49,8)*	56,4(49,8;66,4)*	79,7(66,4;83,0)	73,1(49,8;83,0)

Примечание: * при сравнении опытной и контрольной групп $p \leq 0,05$

становление суммарного тканевого генома. Это достигается или делением клеток, или увеличением геномов в не разделившейся клетке, т.е. полиплоидизацией. Часть митозов не заканчивается цитотомией. При редуцировании митотического цикла не расходуется столько энергии, сколько потребляется при полном митозе. Показано, что из-за исключения цитотомии происходит удлинение активной жизни клетки, секреторная активность полиплоидной клетки становится выше, чем у диплоидных клеток. В полиплоидной клетке возрастает количество РНК и интенсифицируется белковый обмен, т.е. полиплоидизация интенсифицирует потенциал белково-синтетического аппарата клетки [8]. Таким образом, после повреждения печени образование двуядерных гепатоцитов играет немаловажную роль и его интенсификация после лазерного воздействия на костный мозг способствует быстрому восстановлению структуры ткани.

Ядерный антиген ki-67 представляет собой часть нуклеарного матрикса, ассоциированную с хромосомами. Выявление ki-67 позволяет визуализировать клетки, находящиеся в активной фазе клеточного цикла, т.к. ki-67 отсутствует только в G0-периоде, поэтому отмеченное нами повышение индекса экспрессии этого антигена свидетельствует об активации пролиферативных процессов в печени после лазерного воздействия на костный мозг.


Белки теплового шока, играют существенную роль как в обеспечении выживания клетки в стрессовых условиях, так и в нормальном метаболизме. Белки теплового шока оказывают влияние на микроциркуляцию, контролируют клеточный цикл и препятствуют развитию апоптоза [9]. Повышение уровня экспрессии Hsp 70 в печеночной ткани после лазерного воздействия можно рас-

ценивать как маркер успешно протекающих восстановительных процессов.

Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) является главным регулятором процессов взаимодействия ферментов и других факторов роста в процессе репарации и неоангиогенеза. Активация пролиферации под действием VEGF затрагивает эндотелий и гладкие мышцы сосудов. VEGF воздействует на синтетические возможности клеток, в том числе по производству ими активаторов плазминогена и матриксных металлопротеиназ, что важно для перестройки тканей в процессе репарации [5, 6, 9]. VEGF является регулятором синтеза фактора роста гепатоцитов, необходимого для пролиферации клеток. Стволовые клетки являются одним из важнейших источников VEGF и модулируют его продукцию другими клетками [3,4,10]. Отмеченное нами усиление экспрессии VEGF в печени после лазерного воздействия на костный мозг видимо является следствием миграции в печень стволовых клеток и активации ими его локальной продукции.

Заключение

После хирургического повреждения печени в ее ткани активируются процессы репаративной регенерации. Лазерное воздействие на костный мозг способно усиливать интенсивность репарации за счет активации пролиферации гепатоцитов (повышение индекса ki-67 и ЯЦО) и увеличения содержания полиплоидных гепатоцитов. Повышение уровня экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия и белка теплового шока 70 в печени после лазерного воздействия на костный мозг также является маркером успешно протекающих восстановительных процессов и неоангиогенеза. Данные об активации

регенерации в печени после лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга могут являться основой для применения этой технологии в постоперационном периоде у пациентов с заболеваниями печени. ■ 

Головнева Е.С. д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Челябинск; Онищенко Н.А. студент VI курса ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Челябинск; Кравченко Т.Г. к.б.н., старший научный сотрудник ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; Ревель-Муроз Ж.А. д.м.н., руководитель

клинического отдела ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; Гиниятуллин Р.У. д.м.н., профессор, зам. директора по научно работе ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; Еловских И.В. к.м.н., старший преподаватель кафедры патологической анатомии и судебной медицины ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России» г. Челябинск; Шевцова Е.Ю. к.м.н., старший научный сотрудник ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины» г. Челябинск; Автор, ответственный за переписку: Головнева Елена Станиславовна, micron30@mail.ru, +7(351)7412368, 454092, г. Челябинск, ул. Ворожского, 64

Литература:

1. Титова А.А., Бурганова Г.Р., Шарипова Э.И. Звездчатые клетки печени стимулируют регенерацию печени крыс после частичной гепатэктомии на фоне подавления пролиферации гепатоцитов. *Гены и Клетки* 2014; 9(3):131-4.
2. Шарипова Э.И., Газизов И.М., Гумерова А.А., Киясов А.П. Перибиллиарные железы жёлчных протоков как ниша мультипотентных стволовых клеток. *Гены и Клетки* 2014; 9 (3):29-5.
3. Prasetyo R.H, Hestianah E.P. Honey can repairing damage of liver tissue due to protein energy malnutrition through induction of endogenous stem cells. *Vet World* 2017;10(6):711-6.
4. Majka M. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001;97(10):3075-10.
5. Головнева Е.С., Кравченко Т.Г., Кудрина М.Г., Гужина А.О., Попов Г.К. Локальные эффекты системного лазерного облучения повышенной мощности. *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2012; 2(39):126-2.
6. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., Кая О.В. Эндогенные прогениторы как источники клеточного материала для репарации зоны ишемического повреждения при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации вазоэндотелиального фактора роста. *Клеточные технологии в биологии и медицине* 2014; 4: 212-4.
7. Головнева Е.С., Гужина А.О., Игнатъева Е.Н., Гужин В.Э., Кравченко Т.Г., Козель А.И. Способ стимуляции выхода стволовых клеток из костного мозга в периферическое кровяное русло. *RUS 2305573, 2007, дата регистрации 28.12.2004, номер заявки: 2004138434/14.*
8. Бродский В.Я., Урываева И.В. Клеточная полиплоидия. Пролiferация и дифференцировка. М:Наука; 1981.
9. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции. *Цитология.* 2009; 2:130-8.
10. Kron P., Linecker M., Limani P., Schlegel A., Kambakamba P., Lehn J.M., Hypoxia-driven Hif2a coordinates mouse liver regeneration by coupling parenchymal growth to vascular expansion. *Hepatology* 2016;64(6):2198-11.