
ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.36-004-003.93-089.843-032:615.36:611-013.8-092.9

© М.А. Нартайлаков, Р.С. Мингазов, И.В. Янгиров, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, 2007

М.А. Нартайлаков, Р.С. Мингазов, И.В. Янгиров, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СТИМУЛЯЦИИ
РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ФЕТАЛЬНОЙ ТКАНЬЮ
И АЛЛОГЕННЫМ ДИСПЕРГИРОВАННЫМ БИОМАТЕРИАЛОМ**
ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава», г. Уфа

Целью данной работы явилось исследование регенераторных процессов в печени при воздействии фетальных и биологических материалов на экспериментальной модели цирроза печени. С применением биохимических, гистологических и морфометрических методов на экспериментальном материале (150 крыс) определена регенеративная активность печени при циррозе на фоне воздействия различных видов хирургической стимуляции регенерации. Доказано, что при предбрюшинной имплантации фетальной ткани основным фактором в восстановлении паренхимы является полиплоидия клеток печени и их гипертрофия, что приводит к повышению функциональной активности гепатоцитов, которая проявляется в ранние сроки лечения (7-14 суток). Регенерация печени при внутривенном введении диспергированного биоматериала выражается в активной резорбции избыточной соединительной ткани и пролиферации гепатоцитов, поэтому лечебный эффект преобладает на 21-30-е сутки после операции. Произведено сопоставление морфологических изменений при сочетанном применении диспергированного биоматериала, фетальной ткани и раздельном их введении. При совместном использовании биоматериала и фетальной ткани показано потенцирование их эффектов, выражающееся в резорбции избыточной соединительной ткани, пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов, а также в раннем восстановлении функциональных показателей печени. Сочетанное применение аллогенного биоматериала и фетальной ткани печени создает оптимальные условия для формирования структурно-функциональных единиц печени.

Ключевые слова: стимуляция регенерации печени, фетальная ткань печени, аллогенный диспергированный биоматериал.

M.A. Nartajlakov, R.S. Mingazov, I.V. Yangirov, S.A. Muslimov, L.A. Musina
**EXPERIMENTAL EXPLANATION OF THE STIMULATION
OF LIVER REGENERATION BY FETAL TISSUE
AND ALLOGENIC DISPERGATED BIOMATERIAL**

The purpose of the given activity was probe of regeneration processes in a liver at influence of fetal and biological materials on a test model of hepatic cirrhosis. With application of biochemical, histological methods and a morphometries on an experimental material (150 rats) regenerative activity of a liver is determined at a cirrhosis on a background of influence of different species of a surgical stimulation of regeneration. It is proved, that at a preperitoneal implantation of a fetal tissue a major factor in restoration of a parenchyma is the polyploidy of cells of a liver and their hypertrophy that results in increase of the functional activity of hepatocytes which shows in early times of treatment (7-14 day). Regeneration of a liver at intraliver introduction of a dispergated biomaterial expresses in an active resorption of an exuberant connective tissue and a proliferation of hepatocytes, therefore the medical effect prevails for 21-30 day after the operation. Comparison of morphological variations is made at combined application of a dispergated biomaterial, a fetal tissue and their partite introduction. The potentiation of influence of both materials, expressed in a resorption of an exuberant connective tissue, a proliferation and a polyploidy of hepatocytes, and also in early restoration of the functional parameters of a liver is exhibited. Combined application of an allogenic biomaterial and a fetal tissue of a liver creates optimum conditions for formation of structurally functional units of a liver.

Key words: a stimulation of regeneration of a liver, a fetal tissue of a liver, an allogenic dispergated biomaterial.

В настоящее время вопросы патогенеза, диагностики и лечения диффузных заболеваний печени остаются одними из актуальных в медицине как ввиду сложности диагностики и выбора оптимальных методов лечения, так и вследствие тенденции к росту количества больных этими заболеваниями [8]. Появление малоинвазивных методов (внутрипеченочное введение аллогенного биоматериала Аллоплант) [4, 5, 6], развитие клеточных технологий создали серьезные научные предпосылки в этой области [1, 2]. Поиск новых методов лечения дегенеративных поражений печени натолкнул нас на идею сочетанного приме-

нения аллогенного биоматериала и трансплантации фетальной ткани печени, так как разные механизмы стимулирующего воздействия на ее регенерацию могут привести к потенцированию эффекта в органе с тяжелыми функциональными нарушениями.

Целью работы явилось исследование регенераторных процессов в печени при воздействии фетальных и биологических материалов на экспериментальной модели цирроза печени.

Материалы и методы

Нами проведены эксперименты на 150 белых крысах линии Вистар (m=250-300 г). В

начале эксперимента для определения нормальных (исходных) величин изучаемых показателей исследовали 6 здоровых крыс, составивших 1-ю опытную группу.

Модель цирроза была получена путем длительного введения внутривенно гепатотропного яда – тетрахлорметана - в течение 3 месяцев (2-я опытная группа животных) по схеме [4, 8]. Летальность составила 19,4%. Отмечено снижение массы тела у каждой особи в среднем на $45 \pm 9,7$ г. Для изучения актив-

ности репаративных процессов крыс с циррозом печени разделили на группы: 3-я опытная группа – без каких-либо терапевтических воздействий; 4-я опытная группа – лапаротомия со стимуляцией регенерации печени аллогенным биоматериалом; 5-я группа – с трансплантацией фетальной ткани; 6-я группа – лапаротомия с сочетанным применением аллогенного биоматериала и трансплантацией фетальной ткани (рис. 1).

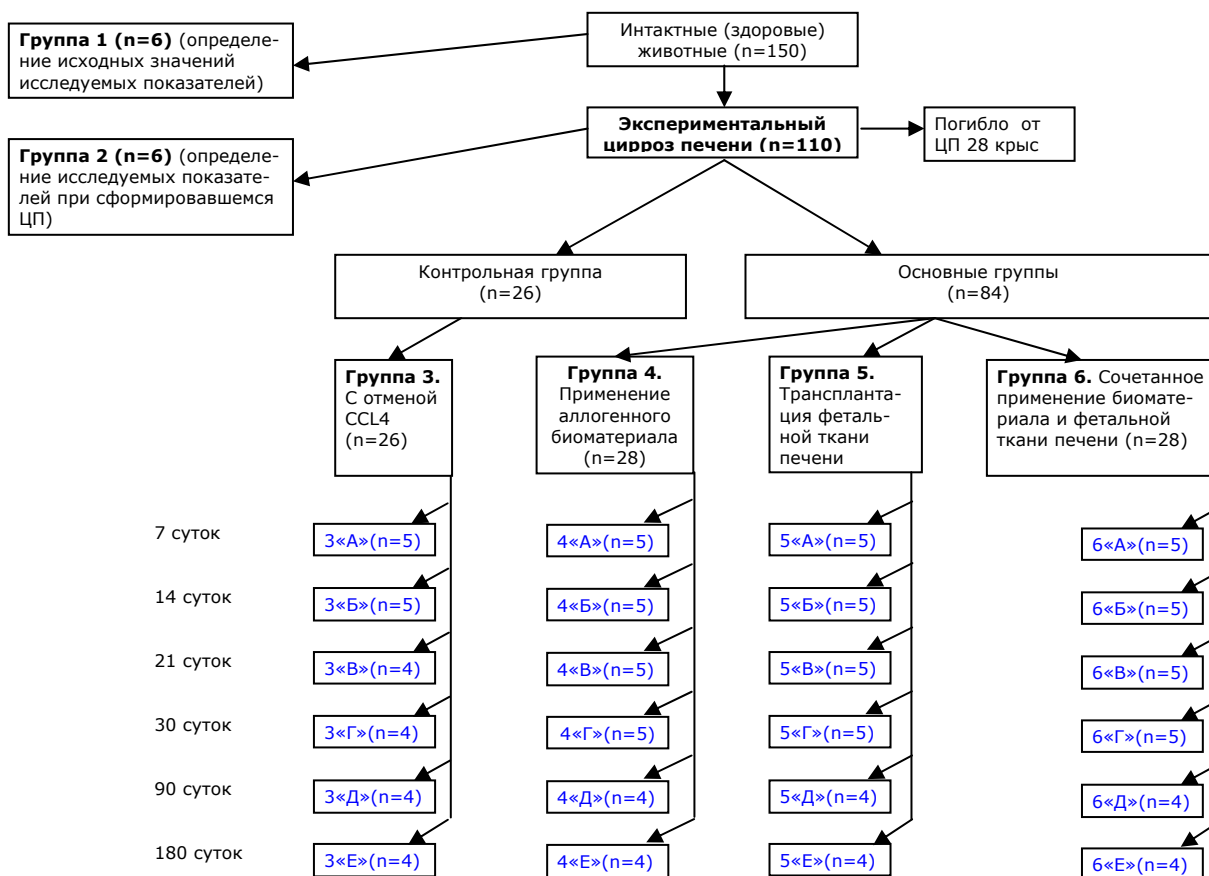


Рис. 1. Распределение экспериментального материала

Примечание: животные разделены на серии «А», «Б», «В», «Г», «Д», «Е» в соответствии со сроками вывода из эксперимента.

Стимуляцию регенерации аллогенным биоматериалом проводили по следующей методике: под эфирным наркозом из лапаротомного доступа в каждую долю печени вводили по 0,1-0,2 мл суспензии биоматериала, который заготавливался из тканей крыс по технологии Аллоплант® в тканевом банке Всероссийского центра глазной и пластической хирургии (директор – проф. Э.Р. Мулдашев). Для стимуляции репаративных процессов фетальной тканью использовали печень 19-дневных эмбрионов крыс. Материал готовили сотрудники Челябинского биомедицинского центра на основании лицензии ЛАКО Челябинской

области № 435. Трансплантацию проводили предбрюшинно инъекцией 1 мл суспензии ($3-5 \times 10^5$ ядросодержащих клеток). В процессе эксперимента оценку состояния крыс проводили на основании макроскопических признаков (выпадение волос, гиподинамия, желтушность кожных покровов, изменение массы тела, визуальный осмотр печени при оперативных вмешательствах), изменений биохимических показателей сыворотки крови и данных световой микроскопии.

Животные выводились из опыта на 7, 14, 21, 30, 90, 180-е сутки после операции. Методом макромикроскопического препариро-

рования производили прицельный забор ткани для гистологического исследования под микроскопом МБС-2. Препараты для гистологического исследования готовили по стандартной методике, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и по Маллори. Результаты оценивали по воспалительно-клеточной инфильтрации паренхимы, степени некроза печеночных клеток, фиброза, гипертрофии, гиперплазии ядер, пролиферации желчных протоков, дистрофии гепатоцитов.

Результаты и обсуждение

В *первой группе* мы наблюдали гистологическую структуру печени крысы в норме (рис. 2).

Во *второй группе* цирроз печени был подтвержден к концу 3-го месяца интоксикации визуальным осмотром брюшной полости и гистологическим исследованием печени. При гистологическом исследовании наблюда-

лась белковая и жировая дистрофии печеночных клеток, потеря балочной структуры паренхимы печени, интенсивное разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов, узловая трансформация паренхимы печени с формированием ложных долек, ложные дольки разделены фиброзными септами. Отмечалось образование шунтирующих сосудов в соединительно-тканых прослойках (рис. 3).

У крыс *третьей группы*, выведенных из эксперимента в разные сроки после прекращения действия тетрахлорметана, гистологическая картина соответствовала вышеописанной картине цирротически измененной печени. У них выявлялся монолобулярный цирроз с образованием ложных долек и прорастанием шунтирующих сосудов в соединительно-тканых прослойках между ложными дольками (рис. 4, 5).

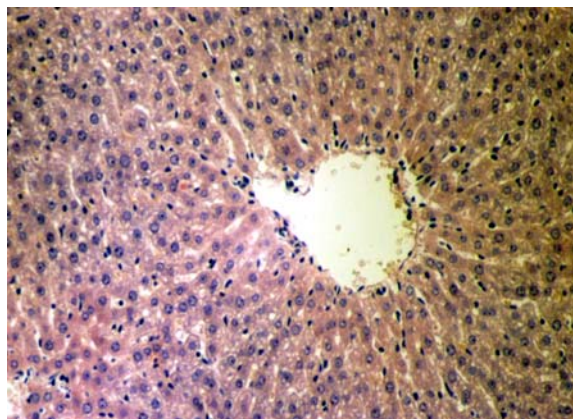


Рис. 2. Паренхима печени интактной крысы в области центральной вены. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. X125.

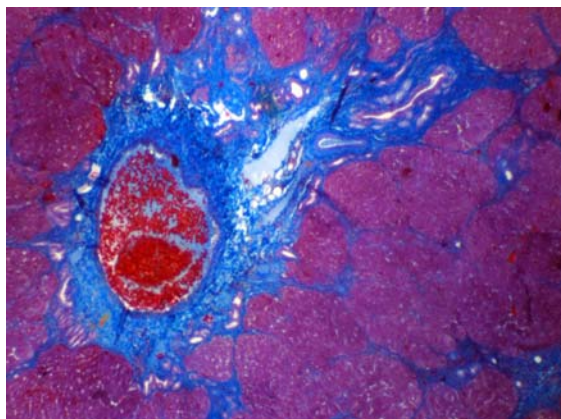


Рис. 3. Интенсивное разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов в печени крыс при циррозе. Окраска по Маллори. Увел. X32.

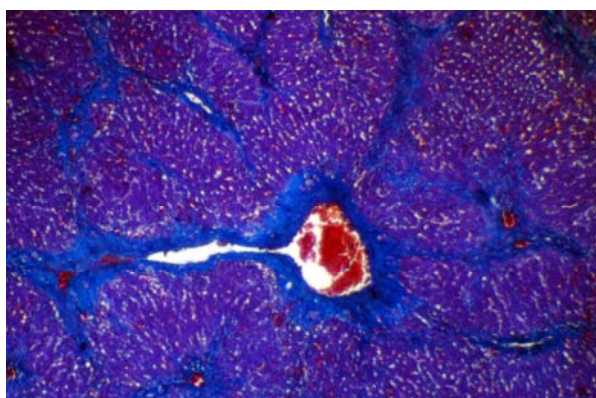


Рис. 4. Цирротически измененная паренхима печени крысы на 90-е сутки после прекращения интоксикации. Окраска по Маллори. Увел. X32.

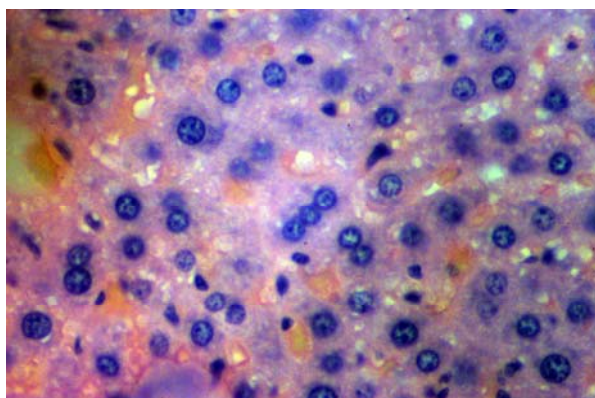


Рис. 5. Паренхима печени крысы на 180-е сутки после прекращения интоксикации. Окраска гематоксилином и эозином. Увел. X125.

В *четвертой группе* после введения аллогенного биоматериала в цирротически из-

мененную печень крыс в паренхиме на 21-30-е сутки возникают репаративно-

восстановительные процессы, выражающиеся в увеличении количества и стимуляции активности печеночных макрофагов, а также в интенсивной пролиферации гепатоцитов. Все эти слагаемые приводят к инволюции цирротической соединительной ткани и через 180 суток – к восстановлению структуры печени, хотя местами сохранялись признаки некоторой атипичности паренхимы в виде эксцен-

тричного расположения центральных вен или их присутствия в количестве двух (рис. 6, 7).

Результаты морфологического исследования печени крыс в *пятой группе* после предбрюшинного введения фетальной ткани при экспериментальном циррозе в паренхиме печени возникали репаративно-восстановительные процессы, выражающиеся, главным образом, в гипертрофии и гиперплазии гепатоцитов.

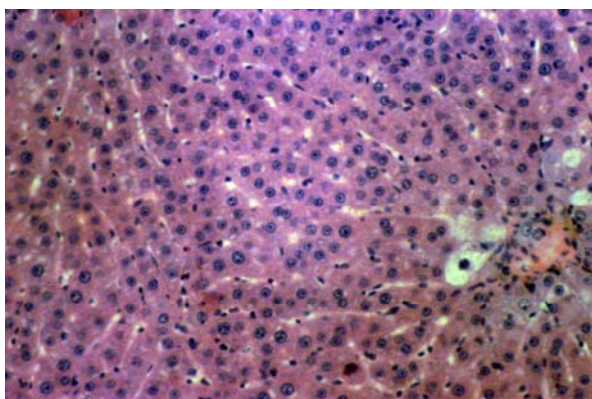


Рис. 6. Паренхима печени крысы при циррозе на 30-е сутки после введения биоматериала. Восстановление балочной архитектоники. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х125.

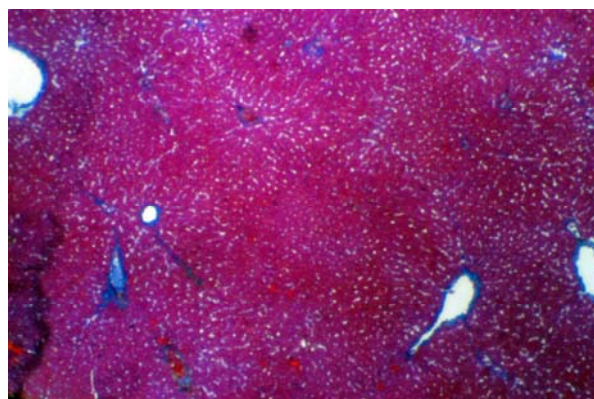


Рис. 7. Паренхима печени крысы на 180-е сутки после введения биоматериала. Окраска по Маллори. Увел.Х32.

Значительным и основным фактором в восстановлении паренхимы являлась полиплоидия печеночных клеток, выражающаяся в увеличении размеров ядер гепатоцитов и гипертрофии самих клеток. Соединительнотканые тяжи между печеночными дольками к концу эксперимента исчезали не полностью, что свидетельствовало о частичном восстановлении структуры печени (рис. 8, 9).

В *шестой группе* после введения в цирротически измененную печень диспергированного биоматериала и предбрюшинной имплантации фетальной ткани в паренхиме печени возникали репаративно-восстановительные процессы, выражающиеся как в интенсивной пролиферации гепатоцитов, так и в гипертрофии и полиплоидизации ядер гепатоцитов.

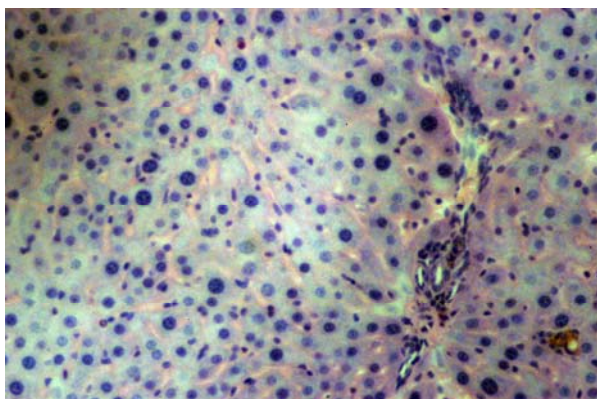


Рис. 8. Выраженная гипертрофия ядер гепатоцитов на фоне признаков дистрофии цитоплазмы гепатоцитов на 7-е сутки после введения фетальной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х125.

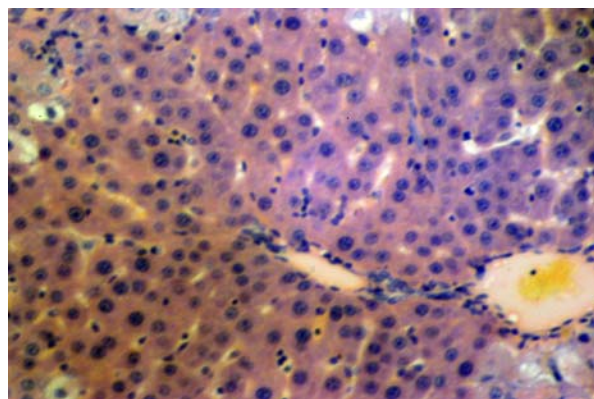


Рис. 9. Паренхима печени крысы на 180-е сутки после введения фетальной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.Х125.

Гипертрофия и полиплоидизация ядер гепатоцитов преобладали в начальные сроки

экспериментов (7-14 суток). В дальнейшие сроки превалировали процессы пролиферации

печеночных клеток. Стимуляция регенерации печени аллогенным диспергированным биоматериалом и фетальными тканями приводит к активации печеночных макрофагов, которые резорбируют коллагеновые волокна, в резуль-

тате чего цирротическая соединительная ткань между печеночными дольками подвергается инволюции. Через 180 суток структура печени крыс восстанавливается полностью (рис. 10, 11).

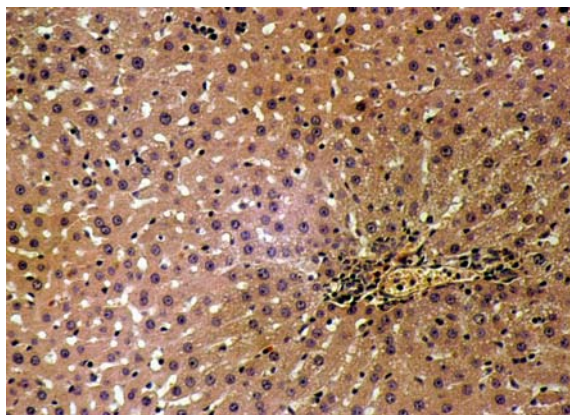


Рис. 10. Балочная архитектура паренхимы печени крысы в восстановленных участках на 30-е сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальной тканью. Окраска по Ван Гизону. Увел. X125.

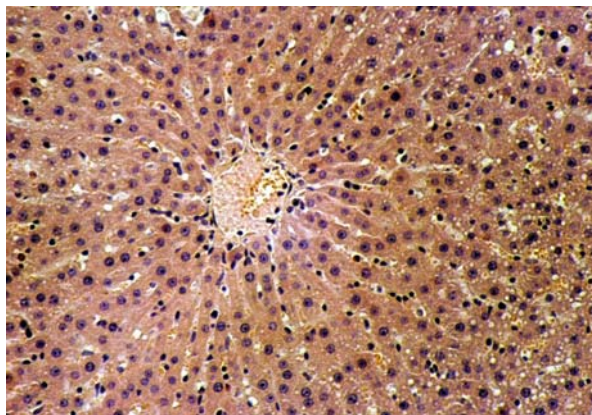


Рис. 11. Сформированные балочные структуры гепатоцитов вокруг центральной вены в печени крысы на 180-е сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальной тканью. Окраска по Ван Гизону. Увел. X125.

По окончании введения тетрахлорметана у крыс выявлено повышение в периферической крови уровня общего билирубина и активности аминотрансфераз сыворотки кро-

ви. Темп нормализации показателей холестаза и цитолиза был выше в шестой группе и достоверно отличался от остальных групп в ранние сроки (7-30-е сутки) (рис. 12, 13, 14).

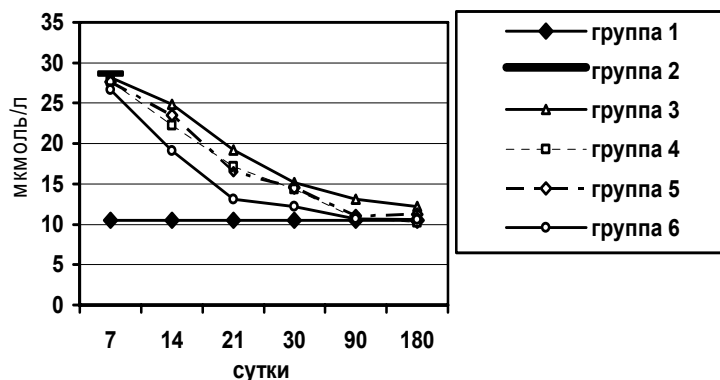


Рис. 12. Изменение показателя билирубина в процессе эксперимента

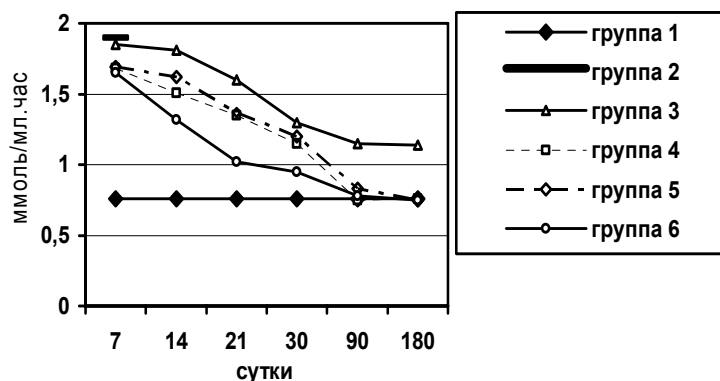


Рис. 13. Изменение показателя активности АсАТ

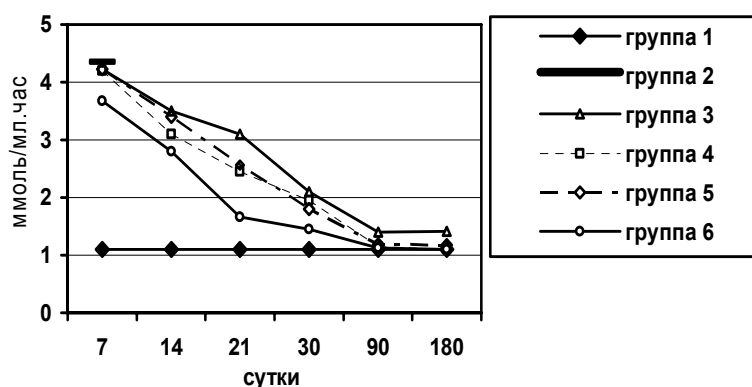


Рис. 14. Изменение показателя активности АЛТ

Выводы

Таким образом, на основании сравнительного анализа результатов хирургической стимуляции регенерации печени при экспериментальном циррозе показано, что при сочетанном применении диспергированного биоматериала и фетальной ткани происходит

потенцирование влияния обоих материалов, выражающееся в резорбции избыточной соединительной ткани, пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов, восстановлении структуры и массы органа, а также раннее восстановление функциональных показателей печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батанов, А.Н. Влияние трансплантации фетальной ткани печени на репаративные процессы при экспериментальном циррозе печени (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Челябинск, 2001. - 25 с.
2. Возможности пересадки эмбриональной печеночной ткани при декомпенсированных формах цирроза печени / В.М. Тимербулатов, А.Г. Хасанов, С.И. Рахматуллин [и др.] // Анналы хирургической гепатологии: материалы пленума правления Ассоциации хирургов-гепатологов России и стран СНГ. - Пермь, 2001. - С. 170-171.
3. Здравоохранение в Республике Башкортостан: статистический сборник / Территориальный орган Федеральной службы государственной статистики по Республике Башкортостан. - Уфа, 2005. - 94 с.
4. Мингазов, Р.С. Внутривенная стимуляция регенерации в комплексе хирургического лечения больных с хроническими диффузными заболеваниями печени: (эксперим.-клинич. исслед.): автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Уфа, 1998. - 31 с.
5. Мусина, Л.А. Цирроз печени и его коррекция с применением биоматериала Аллоплант: (эксперим.-морфол. исслед.): автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Оренбург, 1999. - 22 с.
6. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии / С.А. Муслимов. - Уфа, 2000. - 165 с.
7. Онищенко, Н.А. Клеточные технологии и современная медицина / Н.А. Онищенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2004. - № 4. - С. 2-11.
8. Хирургия печени и желчных путей / под. ред. М.А. Нартайлакова. - Уфа, 2005. - 212 с.