

ГЕПАТОТРОПНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАННЕЙ ГЕТЕРОТРАНСПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТКАНИ ПЕЧЕНИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

И.С. Выборова, Л.С. Васильева, Н.Г. Макарова

(Иркутский государственный медицинский университет, ректор — д.м.н., проф. И.В. Малов, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии человека, зав. — д.б.н., проф. Л.С. Васильева)

Резюме. В эксперименте на крысах показано, что в условиях интоксикации этиленгликолем трансплантация эмбриональной ткани печени, совпадающая по времени с образованием высокотоксичных метаболитов этиленгликоля, увеличивает токсическое поражение печени.

Ключевые слова: печень, этиленгликоль, интоксикация, ксенотрансплантация, эмбриональная ткань печени.

Зарубежные и российские ученые давно и успешно применяют фетальные ткани для коррекции многих заболеваний в эксперименте и в клинике [6,10,13,14]. К сожалению, при острых отравлениях этиленгликолем сведений о действии эмбриональных трансплантатов на структуру органов-мишеней, в том числе печени, практически нет. Между тем, исход острых отравлений этиленгликолем до сих пор сохраняет высокую летальность, несмотря на полный объем традиционной терапии [7]. В связи с этим, проблема поиска новых подходов к лечению отравления этиленгликолем, как одной из самых тяжелых интоксикаций, остается актуальной.

В последние годы возрос интерес исследователей к эмбриональному материалу как к потенциальному донору биологически активных веществ, способных корригировать многие патологические процессы. Показано, что эмбриональная ткань печени нормализует и стимулирует обмен веществ, активность иммунной и нейроэндокринной систем, обладает выраженным противоопухолевым действием и многогранным лечебным эффектом при различных заболеваниях, омолаживает организм, задерживая преждевременное старение. Большинство этих эффектов обусловлено действием ростовых факторов, выделяющихся из трансплантированной эмбриональной ткани печени [10,13,14]. Эмбриональная ткань печени обладает высоким пластическим потенциалом и способна в организме реципиента стимулировать нарушенные функции аналогичного органа. Эмбриональную ткань печени применяют для лечения диффузных процессов в печени [6,14]. На основании этих данных представляется целесообразным апробировать трансплантацию эмбриональной ткани печени для коррекции нарушений структуры и функции печени в условиях интоксикации этиленгликолем.

Целью исследования явилось выявление эффектов ранней ксенотрансплантации эмбриональной ткани печени на структуру стромы и паренхимы печени при интоксикации этиленгликолем.

Материалы и методы

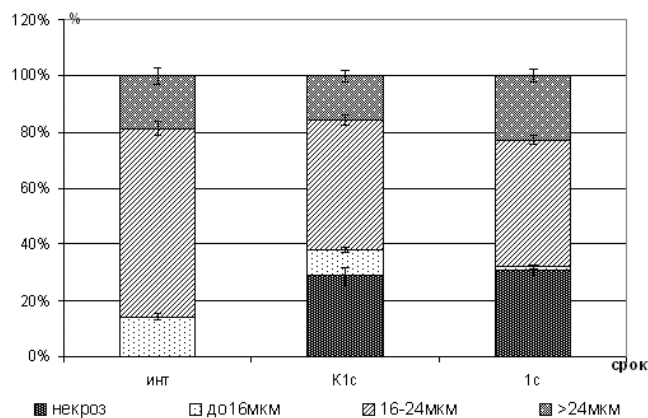
Экспериментальное моделирование острой интоксикации этиленгликолем выполнено на 30 беспородных белых крысах-самцах массой 170–190 г. Животных разделили на 3 группы. Первая группа (10 животных) — оставались интактными, остальным парентерально через зонд вводился 60% раствор этиленгликоля в дозе 4,8 мг/кг. Вторая группа (10 животных) — контрольная. Третьей группе (10 животных) вводилась эмбриональная ткань печени (ЭТП) в дозе 50 мг/кг в виде суспензии с концентрацией клеток 134×10^4 /мл, однократно, через 6 часов после интоксикации в подкожную соединительную ткань спины.

Материал для исследования брали через 24 часа. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином

эозином, морфометрическими методами изучали структуру печени. С помощью окулярной сетки и микрометрической линейки определяли объемные доли участков некроза, сосудистого русла и гепатоцитов, измеряли диаметр гепатоцитов, подсчитывали процентное соотношение нормальных, разрушенных и дистрофически измененных гепатоцитов (с жировой, гидропической и баллонной дистрофией). Методом окраски пикрофуксином по Ван Гизону на срезах выявляли новообразованный коллаген и оценивали его количество морфометрически. С помощью окраски срезов по Маллори оценивали общее количество коллагена в строме печени. ШИК-реакцией (с контролем амилазой) выявляли гликоген в гепатоцитах и оценивали его количество в баллах (0, 1, 2, 3 балла), затем вычисляли цитохимический индекс по формуле: $ЦХИ = (0 \cdot n_1 + 1 \cdot n_2 + 2 \cdot n_3 + 3 \cdot n_4) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$, где n_1, n_2, n_3, n_4 — количество гепатоцитов [1,9]. Результаты исследования имели нормальное распределение и обработаны статистически стандартными параметрическими методами с последующей оценкой различий по критерию Стьюдента [11]. Значимыми были различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При интоксикации этиленгликолем (ЭГ) в 1 сутки наблюдения некроз одинаково выражен в центре и периферии долек, его объемная доля составляет $40,4 \pm 4,5\%$ (рис. 1). Из оставшихся жизнеспособных клеток в 5,3 раза, по сравнению с интактными животными, увеличена доля гепатоцитов с гидропической дистрофией (до

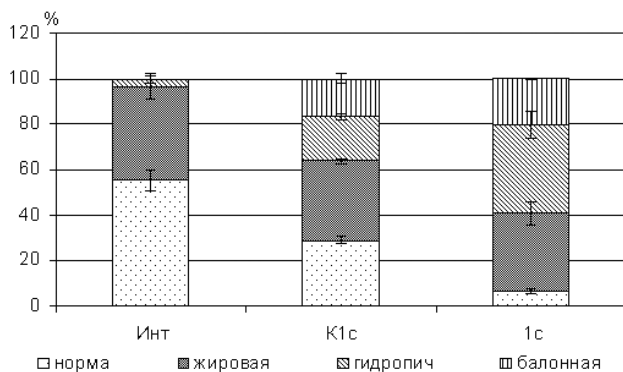


Обозначения: до 16 мкм — мелкие гепатоциты, 16–20 мкм — гепатоциты среднего размера, >20 мкм — крупные гепатоциты; К1с — 1 сутки после интоксикации ЭГ, 1с — 1 сутки после интоксикации ЭГ и трансплантации ЭТП.

Рис.1. Объемная доля (%) очагов некроза и гепатоцитов разного размера в паренхиме печени у интактных животных и при интоксикации ЭГ в условиях трансплантации ЭТП и без нее.

$20 \pm 1,2\%$, $p < 0,05$; рис. 2), появляются клетки с баллонной дистрофией ($16,3 \pm 2,1\%$), а доля клеток с нормальной структурой снижена почти в 2 раза (у интактных — $55,4 \pm 4,3\%$, у подопытных — $29,0 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$). На $25,0\%$ уменьшается доля двуядерных гепатоцитов ($p < 0,05$), по-видимому, в связи с их разрушением, причем этот процесс более выражен в центре долек. Соот-

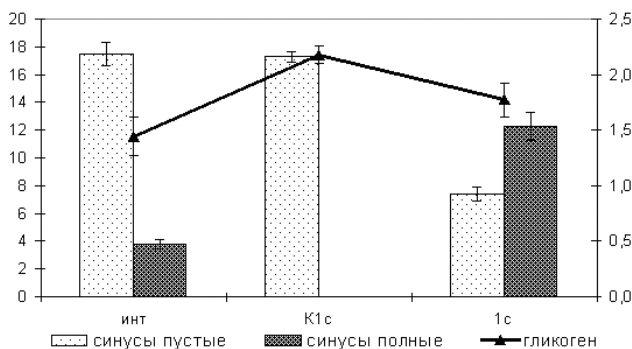
ношение крупных, средних и мелких гепатоцитов остается таким же, как у интактных животных (рис. 1), но прослеживается тенденция к увеличению процентной



Обозначения: K1c — 1 сутки после интоксикации ЭГ, 1c — 1 сутки после интоксикации ЭГ и трансплантации ЭТП.

Рис. 2. Соотношение гепатоцитов, дистрофически измененных, и с нормальной структурой у интактных животных и при интоксикации ЭГ.

доли крупных клеток, что связано с набуханием гепатоцитов и подтверждается увеличением числа клеток с гидропической и баллонной дистрофией. При этом объемная доля внутридольковых капилляров (рис. 3) снижается до $17,3 \pm 0,4\%$ ($p < 0,01$) в результате сдавливания их набухшими гепатоцитами. Следует отметить, что в синусоидных капиллярах не обнаруживается кровь (рис. 3), это свидетельствует об увеличении скорости кровотока в них и, соответственно, о частичной утрате функциональной активности печени. Тем не менее,



Обозначения: K1c — 1 сутки после интоксикации ЭГ, 1c — 1 сутки после интоксикации ЭГ и трансплантации ЭТП.

Рис. 3. Объемная доля синусоидных капилляров в дольках печени (%; левая шкала) и содержание гликогена (ГХИ, усл. ед., правая шкала) в печени у интактных крыс и при интоксикации ЭГ.

среднее количество гликогена в гепатоцитах увеличивается ($p < 0,05$; ГХИ = $2,18 \pm 0,08$ усл. ед.) в 1,5 раза (рис. 3), что можно оценить как нарушение утилизации гликогена гепатоцитами в результате торможения гликогенолиза. В междольковой строме прослеживается тенденция к снижению общего количества коллагена с $19,9 \pm 1,2\%$ до $17,8 \pm 0,9\%$.

Суммируя полученные данные, можно сделать заключение о том, что интоксикация ЭГ в течение первых суток вызывает значительные нарушения структуры печени, которые выражаются в развитии дистрофической и баллонной дистрофии гепатоцитов, формировании очагов некроза, нарушении микроциркуляции в дольках печени, потере способности гепатоцитов утили-

лизировать гликоген.

У животных, которым через 6 часов после интоксикации ЭГ трансплантировали ЭТП, к концу 1 суток объемная доля очагов некроза в печени не изменялась и составляла $45 \pm 2,8\%$ (рис. 1), но при этом регистрировалось частичное разрушение соединительнотканной стромы печени, количество выявляемого коллагена снижалось на 30% (до $11,5 \pm 2,01$; $p < 0,05$). Среди клеток, оставшихся жизнеспособными, лишь $3,5 \pm 0,7\%$ сохраняли нормальную структуру, а в остальных развивались дистрофические процессы, причем более 50,0% клеток находились в состоянии гидропической и баллонной дистрофии (рис. 2). Более половины синусоидных капилляров были полнокровными (рис. 3). Количество гликогена в клетках не снижалось и оставалось на уровне этого показателя у интактных животных (рис. 3), что говорит о неспособности паренхимы печени утилизировать гликоген. Мелкие клетки составляли всего $1,0 \pm 0,6\%$ (рис. 1), т.е. камбиальный резерв практически отсутствовал. Таким образом, резервные возможности печени для восстановления паренхимы были настолько малы, что репаративные процессы, по-видимому, были невозможны. Все животные этой серии эксперимента погибли в течение вторых суток после интоксикации ЭГ.

Обсуждая результаты исследования, прежде всего, следует учесть высокую осмотическую активность этиленгликоля и его метаболитов, которая способствует перераспределению жидкости по осмотическому градиенту с развитием гидропической дегенерации клеток [2,3,4,8]. Основные продукты биотрансформации этиленгликоля — глиоксиловая кислота, гликолевый альдегид, оксалат, гликолевая кислота [7]. Все эти вещества способны ингибировать митохондриальный транспорт электронов, блокируя цикл Кребса, разобщать окисление и фосфорилирование, вызывая лактат-ацидоз и дефицит АТФ, угнетать синтез белка [2,7]. Высокая токсичность продуктов летального синтеза ЭГ и быстрое повреждение гепатоцитов препятствуют утилизации гликогена клетками на ранних этапах интоксикации. Таким образом, гидрофильность этиленгликоля и инактивация ферментов продуктами реакций токсификации этиленгликоля приводит к метаболическим и структурным нарушениям в тканях, развитию токсической альтерации и образованию в организме продуктов распада.

Ранняя эмбриогистотерапия (ксенотрансплантация ЭТП, проведенная через 6 часов после введения ЭГ), вопреки ожиданиям, усугубляет поражение печени ЭГ и его метаболитами, провоцируя развитие застойных явлений в синусоидных капиллярах печени ($p < 0,01$), частичное разрушение междольковой соединительной ткани, еще большее увеличение числа гепатоцитов в состоянии гидропической и баллонной дистрофии ($p < 0,01$) и значительное снижение камбиального резерва паренхимы ($p < 0,01$). Таким образом, создаются условия, исключающие возможность репаративной регенерации печени, что приводит к гибели животных. Обсуждая эти факты, необходимо принять во внимание, что трансплантированная ЭТП выделяет, по данным ряда авторов [10,13], такие биологически активные вещества, как фактор роста нервов, фактор, стимулирующий рост макрофагальных и эритроидных колоний, инсулиноподобный и эндотелиотропный факторы ро-

ста, и, что особенно важно, антипролиферативные цитокины, предотвращающие гиперстимуляцию пролиферации. Вместе с тем, в работе О.В. Колбасевой [5] показано, что ранняя ксенотрансплантация эмбриональной ткани печени в условиях отравления ЭГ задерживает активацию неспецифических защитных механизмов, препятствует стимуляции гранулоцитарных, лимфоцитарных и моноцитарного ростков, снижает пролиферативную активность клеток гемопоэза. Автор подчеркивает особенность сегментоядерных нейтрофилов в условиях ранней ксенотрансплантации ЭТП, которая заключается в гиперсегментации ядра, что характерно для старых, малоактивных нейтрофилов. Возможно, ЭТП ускоряет процесс старения нейтрофилов, что может быть одной из причин недостаточности нейтрофильного звена, участвующего в детоксикации.

По-видимому, трансплантация ЭТП, совпадающая по времени с образованием высокотоксичных метаболитов ЭГ, существенно ослабляет способность организма к детоксикации, что приводит к пролонгации сроков действия высоких доз ЭГ и его метаболитов и, как следствие, увеличивает токсическое поражение печени. Кроме того, можно предположить, что действие ростовых факторов, выделяемых ЭТП, перестраивает гепатоциты на программу пролиферации, тем самым лишая клетки способности реализовать внутриклеточную программу защиты от действия токсинов. Следствием этого является высокая смертность животных в первые сутки интоксикации этиленгликолем.

Представленные данные свидетельствуют о нецелесообразности проведения эмбриогистотерапии в ранние сроки интоксикации этиленгликолем.

HEPATOTROPIC EFFECTS OF EARLY HETEROTRANSPLANTATION OF LIVER EMBRION TISSUE IN ETHYLENGLICOL INTOXICATION

I.S. Vyborova, L.S. Vasilieva, N.G. Makarova
(Irkutsk State Medical University)

In the experiment on rats it is shown, that in conditions of an ethylenglicol intoxication the transplantation of liver embrion tissue, coinciding on time with formation of highly toxic ethylenglicol metabolites, increases toxic damage of a liver.

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1982. — С.511-514.
3. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Патологическая физиология: [учебник] в 2 кн. Изд. 2. — СПб.: Элби, 2001. — Т. 1. — 624 с.
4. Зайчик А.Ш., Чурилов Л.П. Механизмы развития болезней. — СПб.: Элби, 2002. — С.178-186.
5. Колбасева О.В. Нарушение в лейкоцитарном звене системы крови при отравлении этиленгликолем и патогенетическое обоснование их коррекции с помощью арабиногалактана и эмбриональной ткани печени. Автореф. ... дис. канд. биол. наук. — Иркутск, 2006. — С.16-19.
6. Кулаков В.И., Сухих Г.Т., Молнар Е.М. Трансплантация фетальных тканей человека: анализ состояния проблемы и перспективы развития // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека: Сб. статей / Под ред. Г.Т. Сухих. — М., 1996. — С.5-8.
7. Лузников Е.А. Клиническая токсикология. — М.: Медицина, 1999. — 288 с.
8. Маянский Д.Н. Роль стромы печени в патогенезе гепатитов // Вест. АМН СССР. — 1988. — № 5. — С.81.
9. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. — Л.: Медицина, 1969. — 424 с.
10. Мешавкин В.К., Торопов А.В., Соколов О.Ю. и др. Стимулирующее действие белково-пептидного препарата из фетальных тканей человека на репаративные процессы у крыс // Трансплантация фетальных тканей и клеток человека: Сб. статей / Под ред. проф. Г.Т. Сухих. — М., 1996. — С.107-109.
11. Справочник по прикладной статистике: в 2 т.: Пер. с англ. / Под ред. Э. Ллойда, У. Ледермана, Ю.Н. Тюрина. — М.: Финансы и статистика, 1990. — Т. 1. — 510 с.
12. Субботина Н.П., Пашинский П.П., Розанова З.Д. Биологические свойства криоэкстрактов эмбриональных тканей // Проблемы криобиологии. — 1998. — Вып. 3. — С.35-42.
13. Сухих Г.Т. Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее // Бюлл. экспер. биол. и медицины. — 1998. — Т. 126, Прил. 1. — 3 с.
14. Хлыстов З.С. Закономерности превращения тканей в условиях их трансплантации // Бюлл. экспер. биол. и медицины. — 1994. — Т. 4. — С.341.

© ЦЫБИКОВ Н.Н., ПРУТКИНА Е.В. — 2007

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОБ ПЕЧЕНИ

Н.Н. Цыбиков, Е.В. Пруткина

(Читинская государственная медицинская академия, ректор — д.м.н., проф. А.В. Говорин, кафедра патологической физиологии, зав. — д.м.н., проф. Н.Н. Цыбиков)

Резюме. В качестве методов оценки метаболической (детоксикационной) функции печени исследовались анаприлиновый и антипириновый тесты, проводимые с использованием слюны. Проведено сравнение их диагностических возможностей между собой и общепринятыми методами оценки состояния печени. Доказана большая чувствительность анаприлинового теста.

Ключевые слова: анаприлиновый тест, антипириновый тест, функциональные пробы печени, хронический гепатит, цирроз печени.

В настоящее время заболевания печени, в структуре которых преобладает вирусная и алкогольная этиология процессов, являются одной из важнейших клинических проблем во всем мире [2,6]. При ведении таких больных, особенно в случае сочетанной патологии, когда требуется назначение лекарственной терапии, решающим является вопрос о функциональном состо-

янии органа. Нарушение метаболизирующей (в практическом применении — детоксикационной) функции печени принято оценивать чаще всего косвенно, опираясь на изменение уровня билирубина, индикаторов цитолиза и мезенхимально-воспалительного синдромов, показателей белковосинтетической функции. Также принимаются во внимание данные УЗИ и радиоизо-