

И.В. Янгиров, М.А. Нартайлаков, Р.С. Мингазов, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, А.Н. Батанов
**СТИМУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦИРРОТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОЙ
ПЕЧЕНИ ВВЕДЕНИЕМ АЛЛОГЕННОГО ДИСПЕРГИРОВАННОГО БИОМАТЕРИАЛА
И ФЕТАЛЬНОЙ ТКАНИ**

Башкирский государственный медицинский университет, 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, морфометрических и электронномикроскопических 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 превалирует на 21-30 сутки после операции. Произведено сопоставление морфологических изменений при сочетанном применении диспергированного биоматериала, фетальной ткани и раздельном их введении. Показано потенцирование влияния обоих материалов, 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.

I.V. Jangirov, M.A. Nartajlakov, R.S. Mingazov, S.A. Muslimov, L.A. Musina, A.N. Batanov
STIMULATION OF REGENERATIVE PROCESSES IN A CIRRHOTIC LIVER INTRODUCTION OF AN ALLOGENIC DISPERGATED BIOMATERIAL AND A FETAL TISSUE.

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, morphometries and a submicroscopy 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 Junctional units of a liver.

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

Хронический гепатит и цирроз печени являются одними из самых распространенных болезней органов пищеварения. Несмотря на определенные успехи этиологической и патогенетической терапии, эффективность последней остается достаточно низкой. Не случайно термин "выздоровление" по отношению к хроническому гепатиту и циррозу печени вообще не рассматривается. Определенные надежды в достижении длительной ремиссии патологического процесса многие исследователи связывают с изучаемой и доказанной возможностью регрессии фиброза и стимуляцией естественного механизма саногенеза - регенерацией. В 70-80-е годы прошлого века ряд хирургов активно изучал стимуляцию регенерации альтерацией печени (резекция печени, электрокоагуляция, криодеструкция и т.д.). Были получены определенные положительные результаты в эксперименте и в клинике. В последние годы внимание многих исследователей привлекает стимуляция регенеративных процессов в цирротически измененной печени нетравматическими способами: инъекцией фетальных тканей и стволовых клеток (Батанов А.Н., 2001; Тимербулатов В.М., Хасанов А.Г., Рахматуллин С.И. и со-

авт., 2001; Онищенко Н.А., 2004), введением биологических материалов Аллоплант (Мингазов Р.С., 1999; Мусина Л.А., 1999; Муслимов С.А., 2000).

Поиск новых методов лечения дегенеративных поражений печени натолкнул нас на идею сочетанного применения 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.

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

Материалы и методы

Эксперименты проведены на 150 белых крысах линии Вистар (т=250-300г). В начале эксперимента для определения нормальных (исходных) величин изучаемых показателей исследовали 6 здоровых крыс, составивших 1-ю группу.

Модель цирроза была получена путем длительного введения внутривенно гепатотропного яда - тетрахлорметана - в течение 3 месяцев (2-я

группа животных) по схеме (Шалимов С. А., Радзиховский А. П., 1989; Мингазов Р.С., 1998). Летальность составила 19,4 %. Отмечено снижение массы тела у каждой особи в среднем на $45 \pm 9,7$ г.

Для изучения активности репаративных процессов крыс с циррозом печени разделили на группы: 3-я группа - без каких-либо терапевтических воздействий; 4-я группа - лапаротомия с резекцией части печени; 5-я группа - лапаротомия со стимуляцией регенерации печени аллогенным биоматериалом; 6-я группа - с трансплантацией фетальной ткани; 7-я группа - лапаротомия с сочетанным применением аллогенного биоматериала и трансплантацией фетальной ткани (рис. 1).

Стимуляцию регенерации аллогенным биоматериалом проводили по следующей методике: под эфирным наркозом из лапаротомного доступа в

суспензии (3-57105 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 и электронной микроскопии.

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

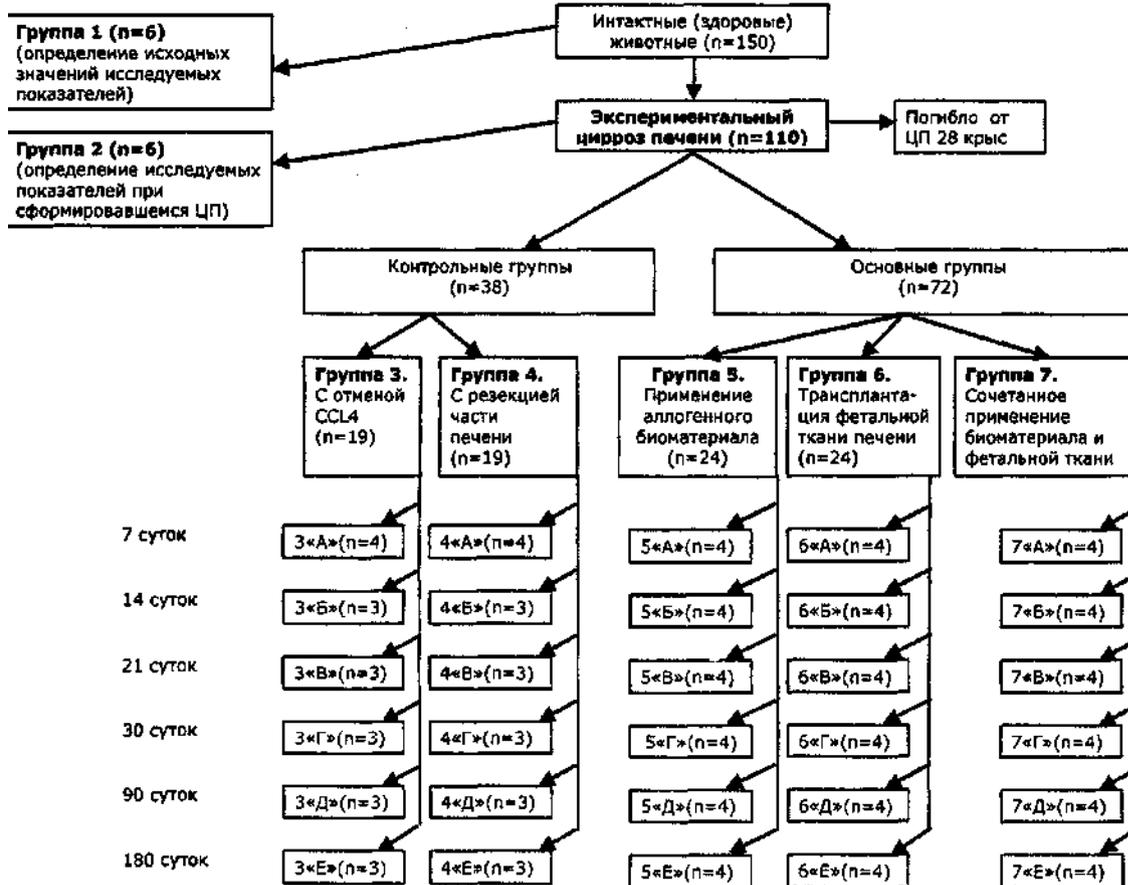


Рис. 1. Распределение экспериментального материала.

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

каждую долю 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.

Для стимуляции репаративных процессов трансплантацией фетальной ткани 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.

ну 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 ис-

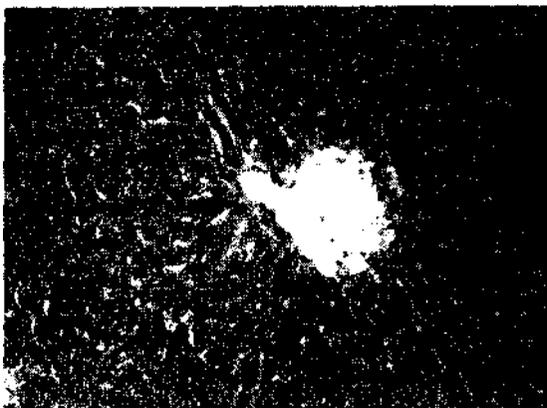


Рис. 2. Паренхима печени интактной крысы в области центральной вены. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х125

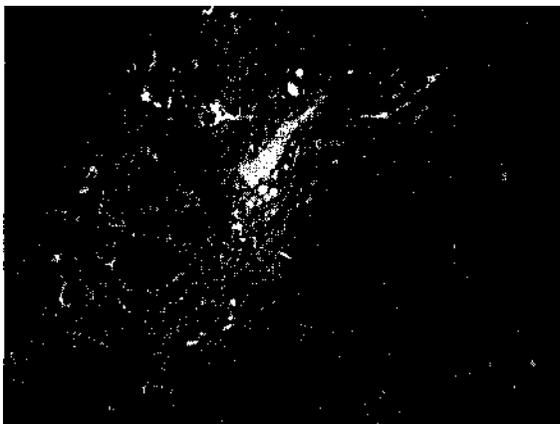


Рис. 3. Интенсивное разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов в печени крыс при циррозе. Окраска по Маллори. Увел.х32

следовании наблюдались 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, разделенных фиброзными септами. Отмечалось образование шунтирующих сосудов в соединительно-тканых прослойках (рис. 3).

У крыс контрольной третьей группы, выведенных из эксперимента в разные сроки после прекращения действия тетрахлометана, гистологическая и электронно-микроскопическая 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 долями (рис. 4, 5).

При гистологическом исследовании экспериментального материала в четвертой группе после частичной резекции печени крыс в паренхиме возникали репаративно-восстановительные процессы, выражающиеся в активации макрофагов и последующими гипертрофии и гиперплазии гепатоцитов

Значительным и основным фактором в восстановлении паренхимы являлись полиплоидия печеночных клеток, выражающаяся в увеличении раз-



Рис. 4. Цирротически измененная паренхима печени крысы на 90 сутки после прекращения интоксикации. Окраска по Маллори. Увел.х32

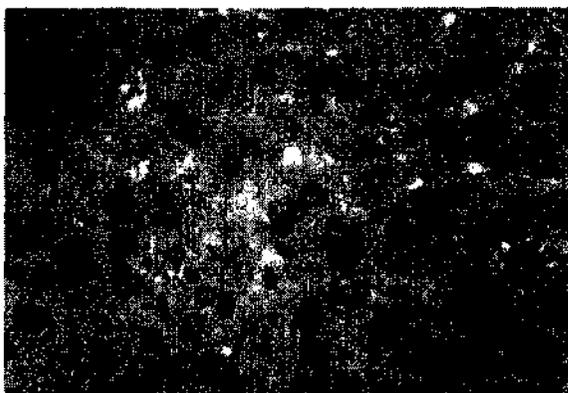


Рис. 5. Паренхима печени крысы на 180 сутки после прекращения интоксикации. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х125

меров ядер гепатоцитов, и гипертрофия самих клеток. Соединительно-тканые тяжи между печеночными долями исчезали не полностью (рис. 6).

В пятой группе опытов после введения аллогенного биоматериала в цирротически измененную 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 эксцентричного расположения центральных вен или их присутствия в количестве двух (рис. 7).

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

Значительным и основным фактором в восстановлении паренхимы являлась полиплоидия печеночных клеток, выражающаяся в увеличении размеров ядер гепатоцитов и гипертрофии самих кле-

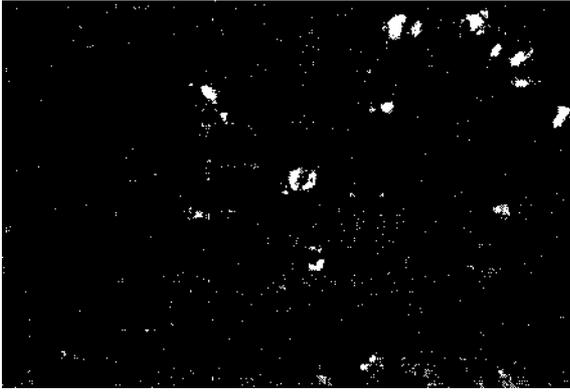


Рис. 6. Структура печени крысы на 90 сутки после резекции. Окраска по Ван Гизону. Увел.х125

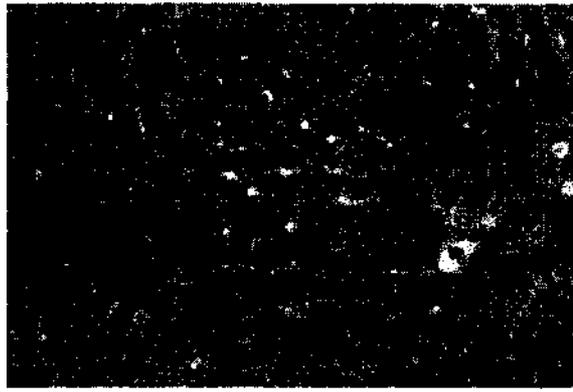


Рис. 7. Паренхима печени крысы при циррозе на 30 сутки после введения биоматериала. Восстановление балочной архитектоники. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х125

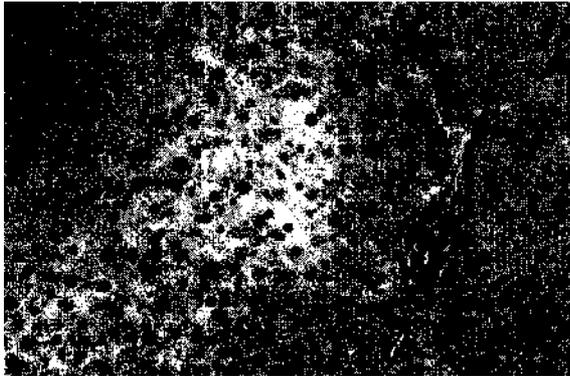


Рис. 8. Выраженная гипертрофия ядер гепатоцитов на фоне признаков дистрофии цитоплазмы гепатоцитов на 7 сутки после введения фетальной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х125



Рис. 9. Паренхима печени крысы на 180 сутки после введения фетальной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увел.х 125

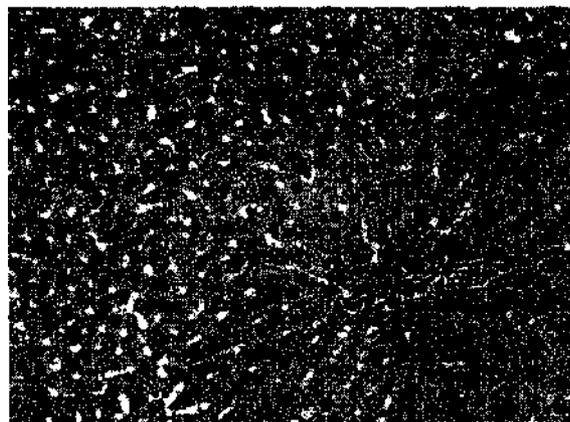


Рис. 10. Балочная архитектоника паренхимы печени крысы в восстановленных участках на 30 сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальной тканью. Окраска по Ван Гизону. Увел.х125

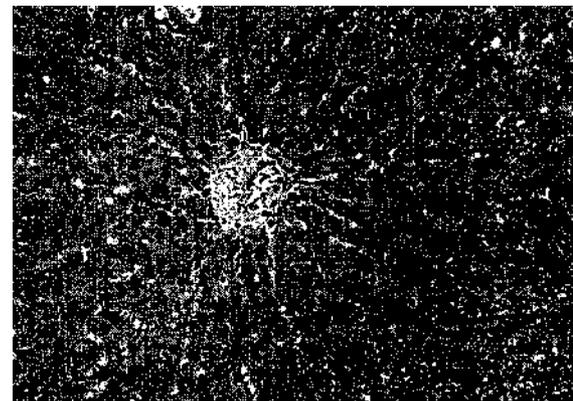


Рис. 11. Сформированные балочные структуры гепатоцитов вокруг центральной вены в печени крысы на 180 сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальной тканью. Окраска по Ван Гизону. Увел.х125

ток. Соединительнотканые тяжи между печеночными дольками к концу эксперимента исчезали не полностью, что свидетельствовало о частичном восстановлении структуры печени (рис. 8, 9).

В седьмой 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 гепа-

тоцитов. Гипертрофия и полиплоидизация ядер гепатоцитов преобладали в начальные сроки экспериментов (7-14 суток). В дальнейшие сроки преобладали процессы пролиферации печеночных клеток. Стимуляция регенерации печени аллогенным диспергированным биоматериалом и фетальными тканями приводит к активации печеночных макрофагов, которые резорбируют коллагеновые волокна, в результате чего цирротическая соединительная ткань между печеночными дольками подвергается инволюции. Через 180 суток структура

печени крыс восстанавливается полностью (рис. Ю, 11).

По окончании введения тетрахлорметана у крыс выявлено повышение в периферической крови уровня общего билирубина и активности аминотрансфераз сыворотки крови. Темп нормализации показателей холестаза и цитолиза был выше в седьмой группе и достоверно отличался от остальных групп в ранние сроки (7-30-е сутки) (рис. 12, 13,14).

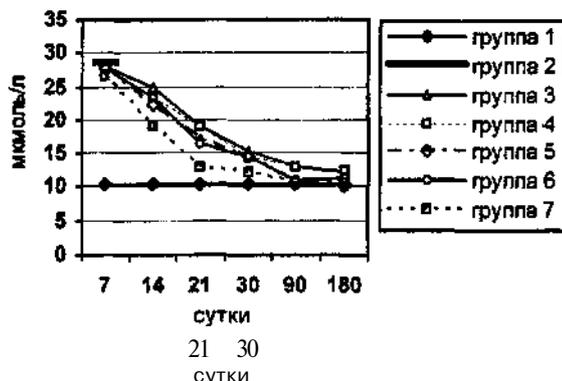


Рис. 12. Изменение показателя билирубина в процессе эксперимента

Выводы

Таким образом, на основании сравнительного анализа результатов хирургической стимуляции регенерации печени при экспериментальном циррозе показано, что при сочетанном применении алло-

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. Мингазов, Р.С. Внутрпеченочная стимуляция регенерации в комплексе хирургического лечения больных с хроническими диффузными заболеваниями печени (эксперим.-клинич. исслед.): автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Уфа, 1998. - 31 с.
3. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии / С.А. Муслимов. - Уфа, 2000. - 165 с.
4. Мусина, Л.А. Цирроз печени и его коррекция с применением биоматериала Аллоплант (эксперим.-морфол. исслед.): автореф. дис. ... канд. биолог. наук. - Оренбург, 1999. - 22 с.
5. 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.
6. Онищенко, Н.А. Клеточные технологии и современная медицина / Н.А.Онищенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2004. - № 4. - С. 2-11.
7. Здоровоохранение в Республике Башкортостан: статистический сборник. - Уфа, 2005. - 94 с.
8. Хирургия печени и желчных путей / под. ред. проф. М.А. Нартайлакова. - Уфа: Изд-во Здоровоохранение Башкортостана, 2005. - 212 с.

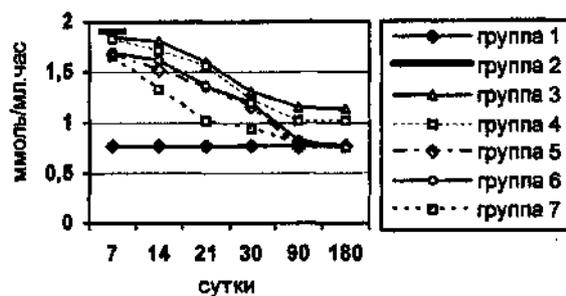


Рис. 13. Изменение показателя активности АсАТ

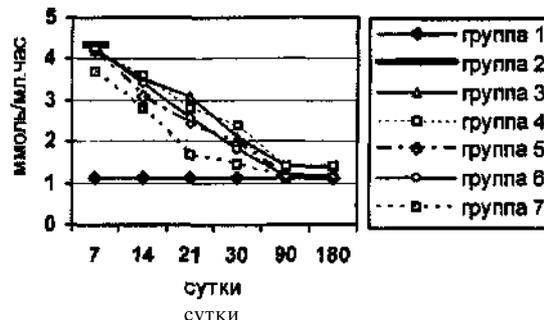


Рис. 14. Изменение показателя активности АлАТ генного биоматериала и фетальных тканей достигается наиболее полная инволюция цирротических изменений.