

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК ЭМБРИОНАЛЬНОГО ГОЛОВНОГО МОЗГА НА МОРФОГЕНЕЗ ПЕЧЕНИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛКОГОЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ

А.Ю. Петренко, Т.П. Якимова, Г.А. Ковалёв

Институт проблем криобиологии и криомедицины, Харьков

Харьковская медицинская академия последипломного образования

Ключевые слова: клетки эмбрионального головного мозга, печень, хроническое отравление алкоголем.

Широкое распространение алкоголизма в Украине представляет важную медицинскую и социальную проблему [9]. Этиловый спирт негативно влияет на все органы и системы, однако главным органом, то есть мишенью, безусловно, является печень, в которой происходит метаболизм алкоголя и наиболее опасного его метаболита — ацетальдегида. Этанол относят к прямым гепатотоксичным агентам [5, 10], который среди многообразия этиологических факторов, поражающих печень, является одним из ведущих [1, 2]. В связи с перспективой терапевтического применения стволовых клеток при различных заболеваниях актуальной задачей медицины является изучение механизмов их действия на различных экспериментальных моделях [3], в том числе и на моделях патологии печени. Наши предыдущие исследования продемонстрировали способность клеток эмбрионального головного мозга (КЭМ) к улучшению функционального состояния печени при хроническом отравлении алкоголем (ХОА) [8]. Однако механизм реализации их терапевтического потенциала изучен недостаточно, в частности, не ясно, как изменяется морфологическая картина в печени после введения КЭМ.

Цель исследования: изучение влияния клеток эмбрионального головного мозга на морфогенез печени крыс при алкогольном поражении.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили согласно с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, Франция, 1985). Исследования выполнялись на 30 трехмесячных самках белых беспородных крыс. Моделирование ХОА выполняли по описанной методике [8]. После развития алкогольного поражения печени (АПП) животные продолжали получать 15% раствор этилового спирта как единственный источник жидкости. В качестве источника КЭМ использовали головной мозг эмбрионов человека 9—12-недельной гестации. Эмбрионы получены в результате планового прерывания беременности после письменного согласия донора. Клетки получали неферментативным методом, криоконсервировали под защитой 5% диметилсульфоксида по трехэтапной программе замораживания, включающей охлаждение до -40°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$; от

-40 до -80°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ и погружение в жидкий азот. Пробы отогревали на водяной бане при 40°C непосредственно перед введением. Всех животных разделили на три группы ($n = 10$). Первую группу составили крысы после формирования АПП. Вторая и третья группы включали животных, которым на фоне продолжающегося ХОА однократно внутривенно вводили криоконсервированные КЭМ из расчета 10^7 клеток на 0,3 мл криозащитной среды (КЗС) на 100 г массы тела (основная группа) или КЗС в дозе 0,3 мл / 100 г массы тела (контрольная группа). Морфологическое исследование печени проводили спустя 14 сут после введения КЭМ. Срезы печени готовили общепринятым методом [6]. Выполняли окрашивание гематоксилином и эозином, по методу Вана Гизона и Судана III. Учитывали характер повреждения ткани печени на клеточном и тканевом уровнях. Степень повреждения гепатоцитов оценивали по трехбалльной системе [7], где выраженная и резко выраженная степень повреждения гепатоцитов была равна 2,5 и 3,0 баллам соответственно. Наряду с процессами альтерации печеночной ткани учитывали также и процессы регенерации, для чего подсчитывали количество митотически делящихся клеток в дольках и число двуядерных гепатоцитов. Кроме того, оценивали состояние кровеносного русла и реакцию системы мононуклеарных фагоцитов путем подсчета количества звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (ЗРЭЦ) на 100 гепатоцитов. Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи пакета программ Statistica 5.5 с использованием U критерия Манна-Уитни ($P < 0,05$).

Результаты и их обсуждение

В ходе патоморфологического исследования в печени животных основной группы (введение КЭМ) выявлено достоверно меньшее, чем в контроле (введение КЗС), количество поврежденных гепатоцитов (рисунков). Количество полностью лизированных гепатоцитов было ниже в 2,0, а погибших, но еще лизирующихся печеночных клеток, сохранивших свою очертания, — в 1,6 раза. Численность морфологически не измененных гепатоцитов в 1,5 раза превышала аналогичный показатель в контрольной группе. Такая морфологическая картина четко указывает на стимуляцию регенераторного потенциала печени, несмотря на продолжающееся ХОА. Помимо этого,

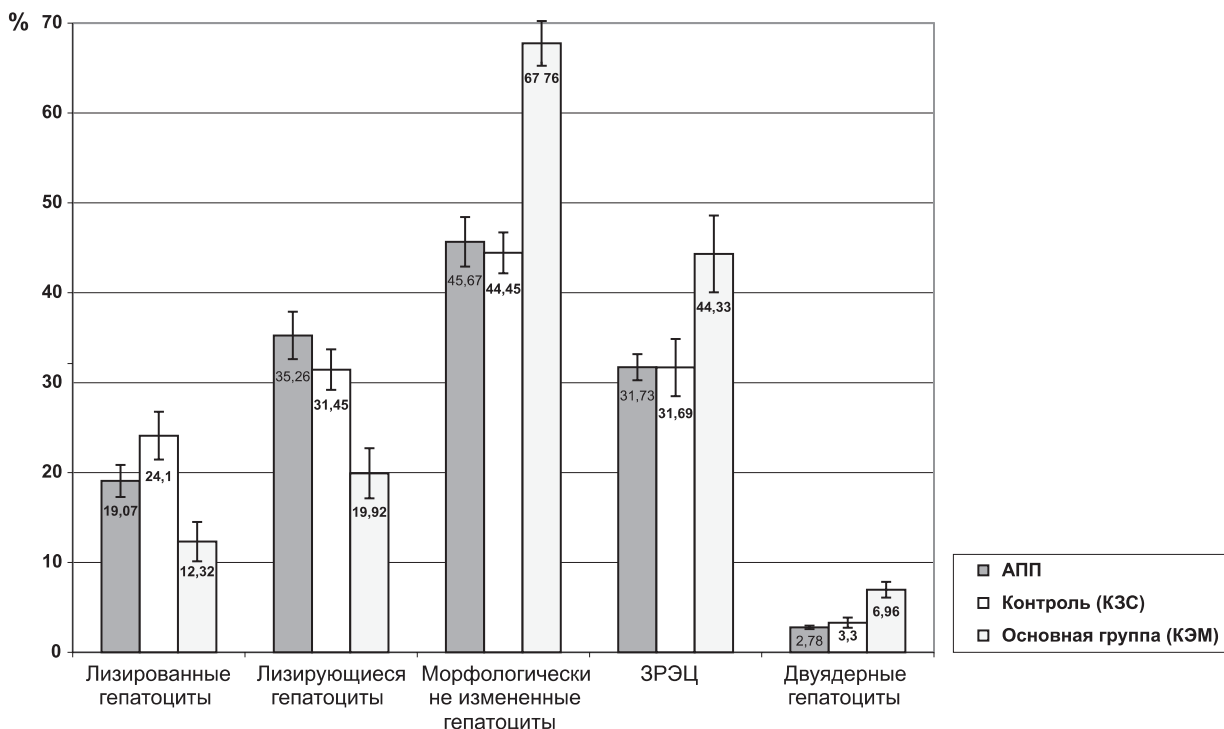


Рисунок. **Выраженность патоморфологических проявлений в печени животных**

четко прослеживалось усиление пролиферации гепатоцитов: численность двухъядерных клеток возрастала в 2,1 раза и в 1,5 раза чаще встречались митозы (таблица). О протекторном влиянии КЭМ ярко свидетельствуют снижение в 1,5 раза степени повреждения гепатоцитов по сравнению с показателями в контрольной группе и в 4,0 раза более редкая регистрация случаев нарушений печеночной гемодинамики. Количество крыс, в печени которых отмечалась лимфоидная инфильтрация, после введения КЭМ снижалось в 1,3 раза. Улучшение состояния печени на тканевом уровне в основной группе животных проявлялось в 2 раза меньшим количеством случаев нарушения балочной структуры по сравнению с контролем.

Особо мы хотим остановиться на состоянии местной иммунной системы печени. Как видно из данных таблицы, количество ЗРЭЦ у животных с ХОА находится на низком уровне, несмотря на наличие альтерации гепатоцитов в виде жирового гепатоза, лизиса и некрозов. Введение КЗС (контроль к введению КЭМ), выступающей в качестве плацебо, не измени-

ло состояние системы мононуклеарных фагоцитов печени, несмотря на ее продолжающееся повреждение этанолом. В то же время в группе животных, получивших инъекцию КЭМ, в системе мононуклеарных фагоцитов наблюдается выраженная стимуляция, и количество ЗРЭЦ увеличивается в 1,4 раза. На наш взгляд, отсутствие усиления пролиферации ЗРЭЦ в контрольной группе следует рассматривать как плохой прогностический признак, так как, учитывая обилие погибших и поврежденных печеночных клеток, реакция иммунной системы выражена явно недостаточно.

Таким образом, можно говорить о глубоком подавлении филогенетически древнего звена иммунной системы, что подтверждается данными литературы о снижении количественного содержания и функции тканевых макрофагов за счет угнетения миграции их из крови в ткани при длительном воздействии этанола [4]. Увеличение количества ЗРЭЦ в синусоидных капиллярах печени после внутривенного введения КЭМ свидетельствует о регенерации системы мононуклеарных фагоцитов. Эти данные позволяют выдви-

Таблица. **Частотный анализ патоморфологических проявлений в печени животных, %**

Группа	Нарушение балочной структуры печени	Нарушение дольковой структуры печени	Лимфоидная инфильтрация ткани печени	Расширение центральных вен долек	Митозы гепатоцитов
АПП	20,00	20,00	100,00	80,00	30,00
Контроль (КЗС)	60,00	20,00	100,00	80,00	40,00
Основная группа (КЭМ)	30,00	20,00	80,00	20,00	60,00

нать предположение, что терапевтический потенциал КЭМ может реализоваться через стимулирующее влияние их на репаративные процессы иммунной системы, скомпрометированные длительной алкоголизацией животных. Оптимизация репаративных процессов и функционирования иммунной системы печени, в свою очередь, может привести к уменьшению тяжести алкогольного поражения печени, иммунная составляющая которой хорошо известна [5, 9, 10].

Выводы

1. Внутривенное введение животным КЭМ при алкогольном поражении печени способствует нормализации кровотока, уменьшению деструктивных про-

цессов в ткани печени, стимуляции пролиферативной активности и регенерации гепатоцитов, активизации системы мононуклеарных фагоцитов.

2. Терапевтический потенциал КЭМ при алкогольном поражении печени может реализоваться не только путем стимуляции регенеративных свойств гепатоцитов, но и через репаративное и стимулирующее влияние на иммунную систему, поскольку под влиянием КЭМ стимулируется увеличение количества ЗРЭЦ.

3. Результаты исследования позволяют предположить стимуляцию системы мононуклеарных фагоцитов не только в печени, но и на уровне организма, что раскрывает некоторые механизмы действия КЭМ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабак О.Я. Панкреатические ферменты в лечении больных с алкогольным поражением печени и поджелудочной железы // Сучасна гастроентерол.— 2002.— № 1 (7).— С. 33—35.
2. Болезни печени и желчевыводящих путей: Руководство для врачей / Под ред. В.Т. Ивашкина.— М.: М-Вести, 2002.— 416 с.
3. Кухарчук А.Л., Радченко В.В., Сирман В.М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки.— Черновцы: Золоті литаври, 2004.— 505 с.
4. Литвинов Н.Н., Герасимова З.Н., Вепринцев Д.Б., Логинова Е.В. Сканирующая электронная микроскопия моноцитов крови крыс при длительном воздействии этанола // Бюл. экспер. биол. и мед.— 1991.— Т. 111, № 4.— С. 425—427.

5. Маевская М.В. Алкогольная болезнь печени // Клин. перспект. в гастроентерол., гепатол.— 2001.— № 1.— С. 4—8.
6. Основы гистологии и гистологической техники / Под ред. В.Г. Елисеева.— М.: Медицина, 1967.— 286 с.
7. Пат. України 110В, U7A61B10/00. Спосіб диференційованої оцінки ступеня ушкодження гепатоцитів при хронічному отруєнні алкоголем / Т.П. Якімова, Г.О. Ковальов; ХМАПО.— Заявл. 18.04.2005; Опубл. 15.12.2005; Бюл. № 12.
8. Петренко А.Ю., Ковалёв Г.А., Грищенко В.И. Внутривенное введение эмбриональных нервных клеток крысам с хроническим отравлением алкоголем // Пробл. криобиол.— 2005.— Т. 15, № 1.— С. 71—78.
9. Харченко Н.В., Родонежская Е.В. Современные взгляды на проблему алкогольной болезни печени // Сучасна гастроентерол.— 2004.— Т. 18, № 4.— С. 5—12.
10. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Пер. с англ. / Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина.— М.: Гэзтар-Мед, 2002.— 864 с.

ВПЛИВ КЛІТИН ЕМБРІОНАЛЬНОГО ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА МОРФОГЕНЕЗ ПЕЧІНКИ ПРИ ХРОНІЧНОМУ АЛКОГОЛЬНОМУ ОТРУЄННІ

О.Ю. Петренко, Т.П. Якімова, Г.О. Ковальов

Вивчали вплив клітин ембріонального головного мозку на морфогенез печінки щурів у разі її ушкодження алкоголем. Внутрішньовенне введення клітин ембріонального головного мозку сприяє нормалізації кровоплину, зменшенню деструктивних процесів у тканині печінки, стимулюванню проліферативної активності і регенерації гепатоцитів, активізації системи мононуклеарних фагоцитів.

INFLUENCE OF CELLS OF EMBRYONIC BRAIN ON THE MORPHOGENESIS OF LIVER AT THE CHRONIC ALCOHOLIC POISONING

A.Yu. Petrenko, T.P. Yakimova, G.A. Kovalyov

The influence of cells of embryonic brain on morphogenesis of liver in rats at their alcohol injury was investigated. The intravenous injection of cells of embryonic liver resulted in the normalization of blood flow, reduction of destructive processes in the liver tissue, stimulation of proliferation and regeneration of hepatocytes, activating of the mononuclear phagocytes system.