

## ПРИМЕНЕНИЕ КСЕНОЭКСТРАКТОВ ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ В СРАВНЕНИИ С КРИОДЕСТРУКЦИЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЦИРРОЗОВ ПЕЧЕНИ

*А.А. Олефиренко, И.В. Слета, С.Е. Гальченко*

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### РЕЗЮМЕ

В опытах на крысах изучались процессы регенерации ткани цирротически измененной печени после криодеструкции, а также после внутрибрюшинного введения экстрактов печени и селезенки новорожденных поросят. Установлено, что каждый из примененных нами методов действует на разные проявления процесса репарации ткани печени и позволяет процесс цирроза остановить и сделать обратимым.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** цирроз печени, ксеноэкстракт, криодеструкция

Цирроз печени – понятие собирательное, объединяющее различные по происхождению и патологоанатомическому выражению изменения печени, общим для которых является процесс диффузного разрастания в ней межлочечковой соединительной ткани с перестройкой нормальной архитектоники и сосудистой системы печени. Цирроз печени бывает исходом дистрофических изменений паренхимы печени, а также воспалительных процессов в ее строении. Различные другие нарушения нормального состояния печени, такие как расстройство кровообращения, заболевание желчных путей, нарушение обмена веществ, разного характера отложения, внедрения паразитов и т.д. также могут иметь следствием развитие цирроза печени. Поиск и совершенствование методов лечения циррозов печени по-прежнему остается актуальной медицинской проблемой.

Экспериментальными и клиническими исследованиями была показана эффективность метода локальной криодеструкции, направленной на улучшение результатов лечения больных с диффузными воспалительными изменениями печени. Методом научной работы «Изучение влияния и механизма действия криоконсервированных тканевых препаратов из ксеногенных органов на протекание ряда патологических процессов в организме», № государственной регистрации 0102U002035.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен на 28-ми беспородных крысах-самцах (массой 200-250 г) с циррозом печени. Экспериментальный цирроз печени моделировали введением тетрахлометана в течение 2-х месяцев [3], после чего все животные были разделены на 3 группы:

- первой группе животных в течение 3-х

заболеваниями печени [2, 7]. Недостатком такого подхода является его травматичность [4, 6]. Также в настоящее время активно изучается возможность применения экстрактов ксенотканей для стимуляции процессов репарации и регенерации органов при различных патологиях [1].

К настоящему моменту не было проведено изучение эффективности введения экстрактов ксеноорганов в сравнении с криодеструкцией печени при экспериментальном циррозе.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение степени и скорости репаративных процессов в цирротически измененной печени при стимуляции ее регенерации различными способами – введением ксеноэкстрактов печени и селезенки (КэПС) и локальным криовоздействием.

Работа выполнена в рамках научной программы Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины «Использование гипотермии, криотерапии и криоконсервированных биологических объектов в лечении различных заболеваний». Является фраг-

ментом научной работы «Исследование влияния и механизма действия криоконсервированных тканевых препаратов из ксеногенных органов на протекание ряда патологических процессов в организме», № государственной регистрации 0102U002035.

суток внутрибрюшинно вводили по 1 мл смеси экстрактов криоконсервированных фрагментов печени и селезенки (КэПС) новорожденных поросят [5]. Экстракт содержал 100 мкг/мл полипептидов;

- животным второй группы проводили операцию по криодеструкции 8-10% печени (локальное криовоздействие на печень осуществляли автономным азотным криоинструментом с диаметром аппликатора 2 мм);

- третья группа животных, которым не проводили лечение цирроза печени, служила контролем.

Вся работа с животными велась в соответствии с положениями IV

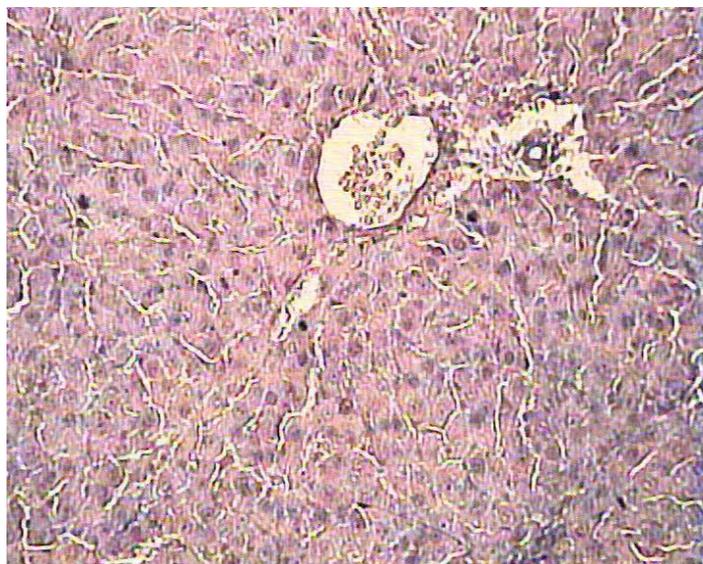
Европейской Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (ETS 123), (1986).

Морфологическое изучение состояния печени вышеперечисленных групп животных на 7-е, 14-е и 30-е сутки после окончания экспериментальных воздействий проводилось с помощью гистологических методов. Взятые на исследование участки печени фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине с последующей заливкой в парафин. Полученные из парафиновых блоков срезы толщиной 6-8 микрон окрашивали гематоксилином и эозином для получения обзорных гистопрепаратов и

гематоксилин-пикрофуксином по Ван Гизон для выявления коллагеновых волокон.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При микроскопическом исследовании препаратов печени крыс на 7-е сутки – в острой фазе токсического цирроза печени – в 1-ой группе животных, получавших ксенозэкстракты печени и селезенки, выявляется дистрофически измененная паренхима печени. Участки печеночной ткани расслоены разросшейся соединительной тканью, образованные ею островки не соответствуют обычным долькам (рис. 1.).

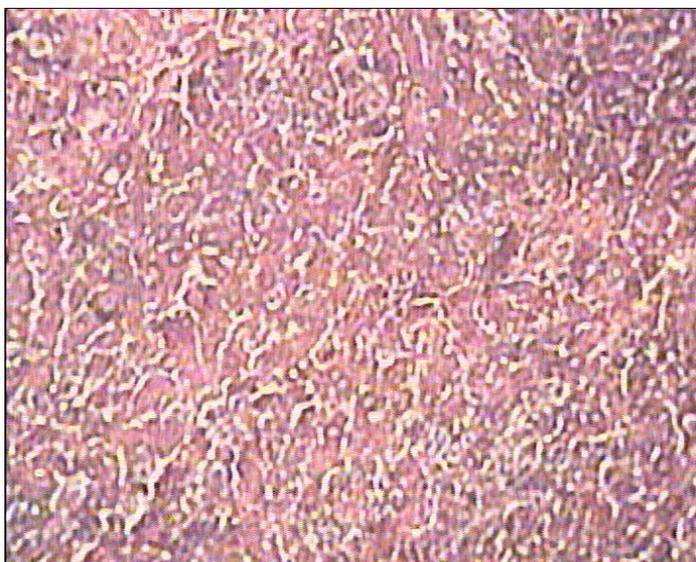


**Рис. 1.** Печень крысы с экспериментальным циррозом на 7-е сутки после введения КэПС. Дилатация вен. Гепатоциты располагаются беспорядочно и плотно (участки некроза). Правильная организация синусоидов отсутствует. Сохранившиеся гепатоциты регенерируют. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.

Печеночная ткань построена неправильно – дольчатость нерегулярная или дольки вовсе не заметны. Ход трабекул беспорядочный, обнаруживаются некротически измененные гепатоциты неодинаковых размеров с преобладанием баллонной дистрофии. Жировая дистрофия обнаруживается в зонах с менее выраженным некрозом. Правильная организация синусоидов отсутствует, что свидетельствует об отсутствии необходимых связей с воротным кровообращением. По периферии печень представляет собой пеструю картину, напоминающую мускатный орех, где светлые участки соответствуют участкам некротически измененной паренхимы. В соединительной ткани, разрастающейся перипортально, обнаруживаются лимфоидные инфильтраты. Центральные вены сильно дилатированы и заполнены эритроцитами, что

свидетельствует о застойных явлениях. Наряду с этим со стороны печеночной паренхимы одновременно наблюдаются и регенеративные проявления. Печеночная ткань в ложных дольках представляет сочетание дегенеративных и регенеративных изменений; видны атрофические, мелкие печеночные клетки, группы клеток с ожирением цитоплазмы, некоторые клетки в состоянии некроза без ядер, а наряду с этим наблюдаются крупные клетки с хорошо окрашивающейся цитоплазмой, с крупными ядрами, иногда с двумя и большим числом ядер.

Микроскопическое исследование препаратов печени животных 2-ой группы с криодеструкцией части печени к этому сроку выявляет печеночную ткань с нарушенной архитектоникой, отсутствием истинных долек печени со слабо выраженными соединительнотканными тяжами (рис. 2.).



**Рис. 2.** Печень крысы с экспериментальным циррозом на 7-е сутки после криовоздействия. Печеночная ткань с нарушенной архитектурой. Гепатоциты в состоянии некроза без ядер. Трабекулярный рисунок отсутствует, синусоиды расширены, их организация не определяется. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.

Паренхима печени представляет собой сочетание гепатоцитов с дегенеративными и регенеративными изменениями: определяются атрофические, мелкие печеночные клетки, клетки в состоянии некроза без ядер или с резко пикнотичными ядрами, а наряду с этим периваскулярно обнаруживаются группы крупных клеток с хорошо окрашивающейся цитоплазмой, с крупными ядрами, с двумя и большим числом ядер. Эти гепатоциты находятся на разных стадиях митотического деления. Центральные вены незначительно дилатированы и большей частью со свободным просветом. Трабекулярный рисунок отсутствует, организация синусоидов не определяется.

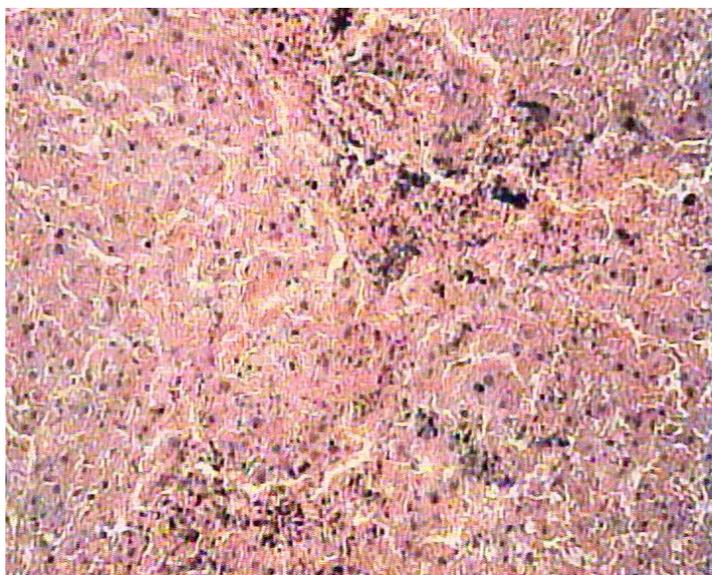
При гистологическом изучении препаратов печени животных 3-ей контрольной группы с экспериментальным циррозом к этому сроку наблюдается резкая перестройка печеночной ткани, соответствующая атрофическому циррозу и выражающаяся в дегенеративных изменениях гепатоцитов, т.е. повреждении паренхимы печени в виде атрофии, перерождения и некроза гепатоцитов в центральной части печеночных долек (рис. 3.). Изредка наблюдается регенерация превращения купферовых клеток, относящихся к системе мононуклеарных фагоцитов, в гистиоцитарные и фибробластические элементы. В некоторых участках имеет место неравномерное окрашивание – «мускатность» печеночной ткани, где светлые области соответствуют некротизированным центральным частям ложных долек печени, а темные – периферии

гепатоцитов в тех участках, где еще сохранены здоровые клетки.

Трабекулярное строение печеночной ткани нарушено. Отсутствует правильная организация синусоидов. Просветов центральных вен в ложных дольках или нет вовсе, или они располагаются эксцентрично у края ложной дольки. Иногда их несколько и они беспорядочно разбросаны в печеночной ткани. Почти везде встречаются желчные протоки и капилляры, заполненные желчью с образованием желчных цилиндров.

Ближе к периферии в разросшейся межлочечковой соединительной ткани и паренхиме печени часто встречаются отложения гемосидерина, как результат выхода в ткань эритроцитов. Наряду с этим обнаруживается избыточное количество межлочечковой соединительной ткани, которая, диффузно разрастаясь, образует ложные дольки. Соединительная ткань нежно-фибрилярна, богата ядрами и инфильтратом. Внутри ложных долек наблюдается образование соединительнотканых тяжей, которое идет путем коллагенизации аргирофильной сети за счет

долек с сохранившимися печеночными клетками. В сохранившихся на периферии долек гепатоцитах обнаруживается выраженная балонная и жировая дистрофия. Расширенные синусоиды содержат в просвете единичные лимфоциты. Эндотелиоциты определяются в большом количестве.



**Рис. 3.** Печень крысы с экспериментальным циррозом на 7-е сутки. Контроль. Резкая перестройка печеночной ткани. Отложения гемосидерина в разросшейся соединительной ткани и паренхиме печени. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.

На 14-е сутки у экспериментальных животных оценивались признаки репарации печеночной ткани, качество регенерации, степень развития соединительной ткани, реакция сосудистого русла.

Микроскопическое исследование препаратов печени животных 1-ой группы показало, что к этому сроку формируется мелкоузловой цирроз печени. Регенерирующие узлы паренхимы печени не имеют нормальной дольковой структуры и окружены соединительной (фиброзной) тканью. По-видимому, они образовались как за счет сохранившихся, так и за счет регенерировавших гепатоцитов, а также за счет разделения истинных долек фиброзной тканью. При этом изменяется и сосудистое строение ложных долек. В отдельных узлах-регенератах синусоиды умеренно расширены, тогда как в других – их размеры близки к нормальным, однако везде в синусоидах в большом количестве обнаруживаются эндотелиоциты. Артерии в портальных трактах печени расширены, вокруг центральных вен определяется застой крови с признаками гемосидероза. В отдельных случаях обнаруживается переполнение желчных протоков и капилляров желчью и образование желчных цилиндров. В гепатоцитах преобладает гидропическая и жировая дистрофия, трабекулярное строение отмечается лишь у 1/3 долек в поле зрения.

На 14-е сутки эксперимента у животных 2-ой группы микроскопически определяемые узлы-регенераты значительно различаются по своим размерам, при этом дистрофия гепатоцитов носит, в основном, гидропический и баллонный характер и

только кое-где обнаруживается жировая дистрофия. Фиброзная ткань, окружающая ложные дольки, достаточно развита, в ней наряду с единичными фибробластами определяются, в основном, фиброциты, что может свидетельствовать об окончании фиброобразования. Синусоиды умеренно расширены. Клетки Купфера обнаруживаются в большом количестве. Признаки портальной гипертензии проявляются умеренной дилатацией центральных вен и артерий портальных трактов. Трабекулярное строение в сохранившихся дольках печени начинает восстанавливаться.

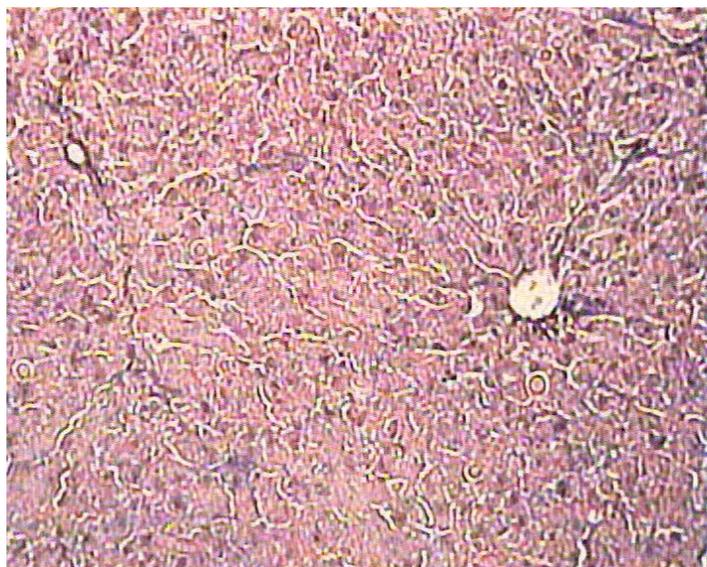
На 14-е сутки эксперимента в печени животных 3-ей контрольной группы при микроскопическом изучении определяются узлы регенерировавшей паренхимы печени, значительно различающиеся по своим размерам. В них обнаруживается, в основном, жировая и баллонная дистрофия. Балочное строение долек не определяется. Фиброзная ткань, окружающая узлы-регенераты и образующая ложные дольки, сильно развита, в ней определяются фиброциты и фибробласты, что свидетельствует о продолжении процесса фиброобразования. Признаки портальной гипертензии проявляются венозным застоем, дилатацией центральных вен, гемосидерозом, расширением артерий портальных трактов.

К 30-м суткам эксперимента оценивались степень склерозирования цирротической печени, динамика преобразования соединительной ткани и узлов регенерировавшей паренхимы печени, а также выяснялась возможность

восстановления нормальной архитектоники и сосудистого русла печени.

К этому сроку в препаратах печени животных 1-ой группы определяется некоторое уменьшение фиброзной ткани вокруг ложных долек (рис. 4). В узлах регенерировавших гепатоцитов последние кое-где выстраиваются радиарно у центральных вен, формируя трабекулы. Наряду с этим еще обнаруживаются

гепатоциты с гидропической и жировой дистрофией. Отмечается фиброз портальных трактов в пределах пограничной пластинки. Диаметр артерий и вен портальных трактов, в основном, соответствует нормальному. Синусоиды к этому сроку восстанавливаются, восстанавливается также правильная их организация. Однако, правильная организация синусоидов, за редким исключением, отсутствует.

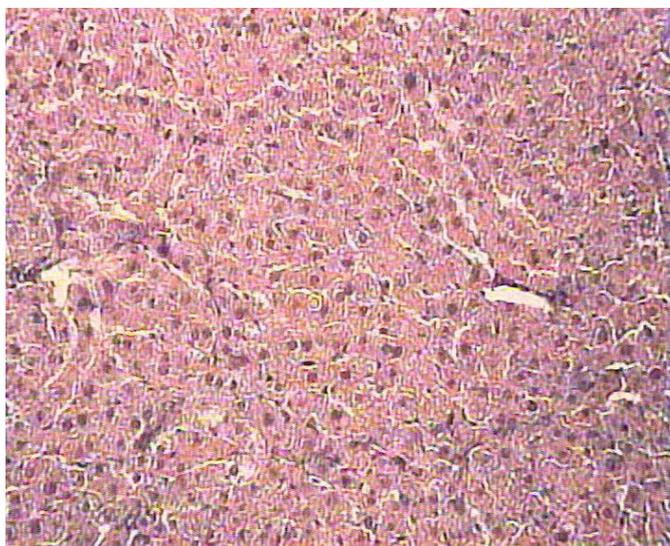


**Рис. 4.** Экспериментальный цирроз печени крыс на 30 сутки после введения КэПС. Уменьшение фиброзной ткани вокруг ложных долек. Диаметр артерий и вен портальных трактов соответствует нормальному. Гепатоциты выстраиваются радиарно у центральных вен, формируя трабекулы. Синусоиды восстанавливают свои размеры. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.

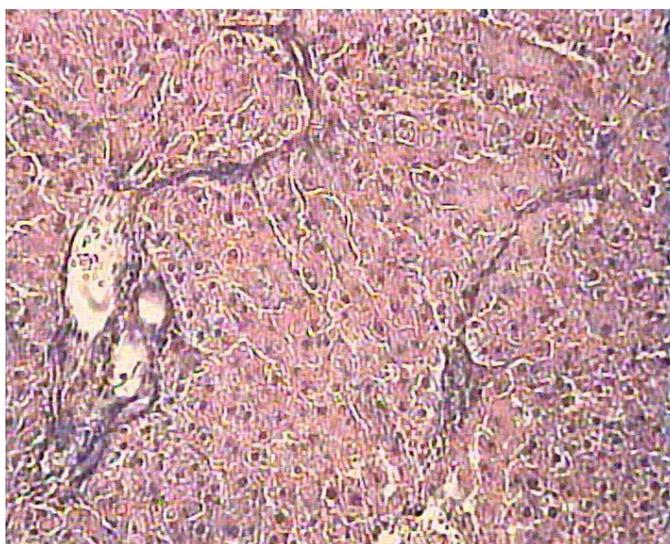
На 30-е сутки эксперимента в препаратах печени животных 2-ой группы обнаруживается истончение фиброзной ткани вокруг островков регенерировавшей паренхимы и в портальных трактах (рис. 5).

В узлах-регенератах с центральной веной видно, как гепатоциты выстраиваются радиарно, образуя балочный рисунок. Однако кое-где в гепатоцитах обнаруживается баллонная и гидропическая дистрофия, в отдельных зонах сохраняется жировая дистрофия. Диаметр артерий портальных трактов нормализуется. Синусоиды к этому сроку, как и у животных 1-ой группы, восстанавливают свои размеры, однако, правильная организация синусоидов, за редким исключением, отсутствует. Липоциты в перисинусоидальных пространствах не обнаруживаются.

К 30-м суткам эксперимента в препаратах печени животных контрольной группы обнаруживаются морфологические изменения, характерные для цирроза печени, вызванного тетрахлорметаном (рис. 6.). Цирротический процесс стабилизируется, что подтверждается преобладанием фиброцитов в соединительной ткани, образующей ложные дольки. Синусоиды по-прежнему сужены. Артерии и вены остаются дилатированными. При этом отсутствует правильная организация синусоидов. В пределах пограничной пластинки обнаруживается склероз портальных трактов печени. Признаки портальной гипертензии проявляются в виде венозного застоя и отложений в соединительной ткани гемосидерина как результата выхода в ткань эритроцитов.



**Рис. 5.** Экспериментальный цирроз печени крыс на 30 сутки после криовоздействия. Истончение фиброзной ткани вокруг островков регенировавшей паренхимы. В узлах-регенератах с центральной венной гепатоциты кое-где выстраиваются радиарно, образуя балочный рисунок. Синусоиды восстанавливаются. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.



**Рис. 6.** Контрольная печень крысы с экспериментальным циррозом на 30 сутки. Разрастание соединительной ткани в виде тяжей. Архитектоника паренхимы печени нарушена. Трабекулярное строение отсутствует. Артерии и вены дилатированы. Правильная организация синусоидов не определяется. Гематоксилин и эозин. Ув. 12×20.

## ВЫВОДЫ

Анализируя полученные в эксперименте данные и используя в качестве критериев для оценки эффективности методов лечения циррозов печени сроки стабилизации склерозирования печени, степень развития фиброзной ткани, степень восстановления архитектоники и сосудистого русла печени, можно сделать следующие выводы:

1. Применение КэПС позволяет стабилизировать процесс склерозирования цирротически измененной печени и стимулировать восстановление ее архитектоники в более ранние сроки.
2. Применение криовоздействия позволяет уменьшить объем соединительной ткани, снизив степень ее развития, а также в более ранние сроки нормализовать

сосудистое русло печени.

3. Каждый из примененных нами методов действует на разные проявления процесса репарации ткани печени и позволяет процесс цирроза остановить и сделать обратимым.

Перспективы дальнейших исследований. Необходимо изучить совместное влияние криовоздействия и экстрактов ксенотканей на процессы регенерации паренхимы печени при лечении циррозов в эксперименте.

Настоящая работа является начальным этапом цикла исследований, направленных на определение оптимального воздействия при лечении циррозов печени, а также на выявление вклада каждого из изученных воздействий в процесс регенерации цирротически измененной печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гальченко С.Є., Тининика Л.М., Слета І.В., ін. // Проблеми медичної науки та освіти. - 2005.- №1. - С.58-61.
2. Сандомирский Б.П., Сигал Н.С., Дубровский К.В. и др. Низкие температуры при лечении хронических диффузных заболеваний печени. -К.:Наукова думка. - 1992. -134 с.
3. Рубецкой А.С.,Короткина Р.Н. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1960. - Т. 6. - № 7. - С. 122-124.
4. Шафранов В.В., Цыганов Д.И., Виссарионов В.А. и др. // Медиц. криология: Сб.науч.тр. Вып.1. - Н.Новгород. - 2001. - С.183-192.
5. Пат. 64381 А Україна, МПК<sup>7</sup> А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів; С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко; ІПКіК НАН України.-№ 2003054649; Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004; Бюл. Промисл. власність № 2.
6. Sikma M.A., Coenen J.L., Kloosterziel C., et. al. // Surg. Endosc. - 2002. - Vol. 16 (5). - P. 870.
7. Clavien P.A., Kang K.J., Selzner N., et. al. // J.Gastrointest Surg. - 2002. - Vol. 6 (1). - P. 95-101.

## ЗАСТОСУВАННЯ КСЕНОЕКСТРАКТІВ ПЕЧІНКИ ТА СЕЛЕЗІНКИ У ПОРІВНЯННІ З КРІОДЕСТРУКЦІЄЮ ПРИ ЛІКУВАННІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЦИРОЗІВ ПЕЧІНКИ

*О.О. Олефіренко, І.В. Слета, С.Є. Гальченко*

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків*

---

### РЕЗЮМЕ

У досліджах на щурах вивчалися процеси регенерації тканини печінки, що циротично змінена, після кріодеструкції, а також після внутрішньочеревного введення екстрактів печінки та селезінки новонароджених поросят. Встановлено, що кожний з використаних нами методів діє на різні прояви процесу репарації тканини печінки й дозволяє процес цирозу зупинити та зробити його оберненим.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** цироз печінки, ксеноекстракт, кріодеструкція

## LIVER AND SPLEEN XENOEXTRACTS APPLICATION IN COMPARISON WITH CRYODESTRUCTION IN EXPERIMENTAL CIRRHOSIS TREATMENT

*O.O. Olefirenko, I.V. Sleta, S.E. Galchenko*

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine, Kharkov*

---

### SUMMARY

Processes of regeneration of the cirrhotic liver after cryodestruction and intraperitoneal injection of the extracts of liver and spleen from new-born piglets to rats have been studied. It has been shown that either applied methods acts on the reparation process in liver tissue. The studied methods can stop and reverse the cirrhotic process.

**KEY WORDS:** cirrhosis, xenoextract, cryodestruction