

## ВЛИЯНИЕ СОВМЕСТНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА НА ТЯЖЕСТЬ АЛКОГОЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ

*А.Ю. Петренко<sup>2</sup>, Б.П. Сандомирский<sup>2</sup>, Т.П. Якимова<sup>1</sup>, Г.А. Ковалёв<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Украина

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

### РЕЗЮМЕ

Изучали влияние совместного введения клеток эмбриональной печени (КЭП) и клеток эмбрионального головного мозга (КЭМ) на тяжесть алкогольного поражения печени (АПП) крыс. Показано что внутривенная инъекция КЭП и КЭМ приводит к улучшению структуры печени на клеточном и тканевом уровнях, стимуляции пролиферативной активности и регенерации гепатоцитов, нормализации печёночной гемодинамики, активации системы мононуклеарных фагоцитов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** клетки эмбриональной печени, клетки эмбрионального головного мозга, алкогольное поражение печени

Регенеративно-пластическая или клеточная терапия, основанная на применении различных видов стволовых клеток, является одним из наиболее перспективных и стремительно развивающихся направлений медицины [3, 9]. Стволовые клетки обладают уникальными свойствами, которые могут быть использованы для лечения патологий различного генеза, их высокий терапевтический потенциал продемонстрирован многочисленными исследованиями [3, 8, 10]. Принимая во внимание значительную распродифференцированность от совместного применения эмбриональных клеток печени и головного мозга на модели АПП. Ранее мы уже сообщали, что совместное внутривенное введение КЭП и КЭМ способно оказывать активное стимулирующее влияние на процессы репарации печени при её алкогольном поражении [1], тем не менее, остаётся не ясным как при этом изменяется гистологическое строение органа. Данных об этом в доступной литературе не обнаружено.

Цель исследования – изучить влияние совместного введения КЭП и КЭМ на морфологические изменения, возникающие в печени при её алкогольном поражении.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 трёхмесячных самках белых беспородных крыс. Моделирование АПП выполняли, как описано ранее [2], после чего животные продолжали получать 15% раствор этилового спирта как единственный источник жидкости. В качестве источника эмбриональных клеток использовали печень и головной мозг эмбрионов

странённости поражений печени алкогольного генеза и несовершенство существующих методов лечения этой патологии, представляется крайне актуальным поиск новых терапевтических подходов. В связи с чем, перспективным представляется изучение возможности применения в качестве лечебных агентов стволовых клеток. Одним из наиболее богатых источников таких клеток являются эмбриональные органы и ткани [3, 9], в частности печень и головной мозг. В связи с этим, представляется важным, изучение эф-человека 9-12 недель гестации. Эмбрионы были получены в результате планового прерывания беременности после письменного согласия донора. Клетки получали неферментативным методом, криоконсервировали по трёхэтапной программе замораживания. Пробы отогревали на водяной бане при 40°C непосредственно перед введением. Все животные были разделены на три группы (n=10). Первую группу составили интактные крысы. Вторая (основная) – включала животных, которым однократно внутривенно вводили взвесь содержащую КЭП и КЭМ из расчета по 5<sup>7</sup> клеток на 100 г массы тела в 0,3мл криозащитной среды (КЗС). Крысы третьей группы (контроль) получали внутривенную инъекцию КЗС в дозе 0,3 мл/100 г массы тела в качестве плацебо. Морфологическое исследование печени проводили спустя 14 суток после введения. Срезы печени готовили общепринятым методом [5], выполнялось окрашивание гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизон и Суданом III. Учитывали характер повреждения ткани печени на клеточном и тканевом уровне. Степень повреждения гепатоцитов оценивалась по трехбалльной системе [6], где выраженная и резко выраженная степень повреждения гепатоцитов была равна 2,5 и 3,0 баллам, соответственно. Наряду с процессами

альтерации печёночной ткани учитывали также и процессы регенерации, для этого подсчитывали количество митотически делящихся клеток в дольках и число двуядерных гепатоцитов. Кроме того, оценивали состояние кровеносного русла и реакцию системы мононуклеарных фагоцитов путём подсчёта количества звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов (ЗРЕЦ) на 100 гепатоцитов. Данные оценивали при помощи пакета программ «Excel 2003», «Statistica v.5.5», используя непараметрический критерий Манна-Уитни, выражали в виде  $M \pm m$ . Достоверно отличными считали результаты при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологическое исследование печени интактных животных продемонстрировало незначительное количество лизированных и лизирующихся клеток –  $1,9 \pm 0,4$  и  $3,0 \pm 0,4\%$  соответственно. Подавляющее большинство гепатоцитов ( $95,1 \pm 0,2\%$ ) не имели морфологических признаков повреждения. Численность ЗРЕЦ находилась на уровне  $19,7 \pm 2,6\%$ . Невысоким было содержание двуядерных гепатоцитов –  $3,5 \pm 0,6\%$ . Не отмечалось случаев нарушений печёночной гемодинамики. Повреждений органа на тканевом уровне так же не зафиксировано. В печени животных контрольной группы (введение коголя и его метаболитов. Это утверждение подтверждается данными о снижении количественного содержания и функции тканевых макрофагов, за счёт угнетения их миграции из крови в ткани при длительном воздействии этанола [4]. В качестве ещё одной иллюстрацией гепатотоксичности этилового спирта можно привести неизменное содержание в печени двуядерных гепатоцитов –  $2,8 \pm 0,2\%$ , при этом следует отметить, что часть их находилась в состоянии жирор-

КЗС) нередко встречались участки, где ткань печени разряжена, многие клетки имели нечёткие границы ядра и цитоплазмы, а большинство клеток лишено цитоплазмы и представлено гиперхромными ядрами без чёткой границы и структуры цитоплазмы или вовсе с её отсутствием. Численность погибших и лизированных печёночных клеток равнялась  $24,1 \pm 2,7\%$ , количество погибших, но ещё не полностью лизированных клеток, представленных в виде «теней» и безъядерных гепатоцитов составляло  $31,5 \pm 2,3\%$ . Результатом такого мощного повреждения печени на клеточном уровне явилось крайне низкое представительство морфологически не повреждённых гепатоцитов, которое в среднем по группе было равно  $44,5 \pm 2,3\%$ . Степень повреждения гепатоцитов находилась на уровне  $2,5 \pm 0,2$  балла. Количество ЗРЕЦ равнялось  $31,7 \pm 1,5\%$ . Увеличение численности тканевых макрофагов печени в 1,6 раза по сравнению с интактом, объясняется необходимостью утилизировать погибшие клетки. Тем не менее, учитывая обилие погибших и повреждённых гепатоцитов, очевидно, что реакция иммунной системы выражена явно недостаточно. Следовательно, можно говорить об угнетении местной иммунной системы органа, наступившей под действием ал-

вой дистрофии. Митозы определялись только в  $40,0\%$  случаев. Таким образом, можно заключить что, несмотря на выраженную альтерацию клеток печени значимой активации регенераторных процессов не наступало. Повреждение органа на тканевом уровне проявлялось нарушением балочной и дольковой структуры –  $60,0$  и  $20,0\%$  наблюдений соответственно. У  $80,0\%$  крыс наблюдались нарушения печёночной гемодинамики в виде расширения центральных вен, стаза крови.

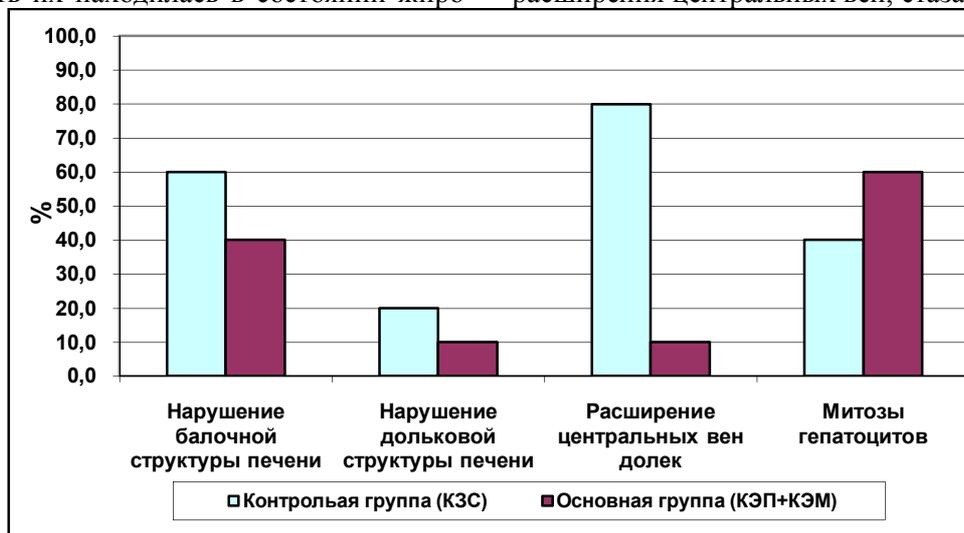


Рис. Частотный анализ патоморфологических проявлений в печени животных

В ходе патоморфологического исследования печени животных основной группы (введение КЭП и КЭМ) численность лизированных и лизирующихся гепатоцитов находилась на уровне  $15,3 \pm 1,8$  и  $24,5 \pm 3,5\%$ , что соответственно в 1,6 и 1,3 раза ниже аналогичных показателей у контрольных крыс. Количество морфологически не изменённых гепатоцитов было в 1,4 раза выше, чем в контрольной группе и составляло  $60,2 \pm 2,7\%$ . Степень повреждения гепатоцитов уменьшалась в 1,4 раза (до  $1,9 \pm 0,2$  балла). Указанные данные говорят о значительно меньшей тяжести альтерации печени на клеточном уровне у животных получивших инъекцию КЭП и КЭМ, сравнительно с контролем. На этом фоне определялась чётко выраженная регенерация печени. Сравнительно с контролем число двуядерных гепатоцитов возрастало в 2,3 раза (до  $7,6 \pm 0,8\%$ ); в 1,5 раза чаще встречались митозы ( $60,0\%$  случаев). Слабее было выражено повреждение печени на тканевом уровне – в 1,5 и 2,0 раза реже обнаруживались нарушения структуры балок и до-

вотных. Принимая во внимание важную роль дисбаланса иммунной системы в возникновении и развитии алкогольного гепатита [7, 11, 12], можно допустить, что оптимизация её функционирования способна приводить к уменьшению АПП. Каковы механизмы влияния использованных эмбриональных клеток и насколько оно органоспецифично всё ещё не известно. Эффективность применения КЭП и КЭМ может быть обусловлена как влиянием биологически активных веществ, способных включаться в метаболические процессы, а также стимулировать репарацию в повреждённых тканях, так и прямой органозаместительной функцией вводимых клеток. Что касается специфичности воздействия, то с одной стороны вполне логичным представляется тропность донорских клеток к «своему» органу, с другой – и КЭП, и КЭМ богаты полифункциональными белково-пептидными регуляторами, поэтому нельзя исключить влияние последних одновременно на печень и головной мозг. Кроме того, вполне вероятно, что улучшению морфологической картины печени может в известной степени способствовать нормализация нейротрофической регуляции. Нельзя исключить, что стимуляция системы мононуклеарных фагоцитов наступает именно вследствие улучшения состояния головного мозга. Для получения ответов на эти вопросы необходимо изучить влияние совместного внутривенного введения КЭП и КЭМ на состояние головного мозга, а также проследить судьбу

лек. Резко улучшалась печёночная гемодинамика, расширение и полнокровие центральных вен отмечалось лишь в 10% наблюдений, что в 8,0 раз меньше аналогичного показателя у животных контрольной группы. Эти результаты согласуются с данными наших предыдущих исследований, где было показано стимулирующее влияние совместного внутривенного введения КЭП и КЭМ на процессы репарации печени при её алкогольном поражении – уменьшение продолжительности гексеналового сна, повышение концентрации альбумина в плазме крови [1]. Особого внимания заслуживает рост в 1,6 раза по сравнению с контролем содержания ЗРЭЦ в синусоидных капиллярах печени (до  $50,9 \pm 7,1\%$ ). Это чётко свидетельствует о регенерации системы мононуклеарных фагоцитов, наступившей после совместного внутривенного введения КЭП и КЭМ. Следовательно, можно говорить об их стимулирующем влиянии на репаративные процессы иммунной системы, скомпрометированные длительной алкоголизацией донорских клеток в организме реципиента.

Полученные результаты указывают на

выраженную терапевтическую эффективность совместного внутривенного введения КЭП и КЭМ, которая проявляется улучшением структуры печени, повреждённой алкоголем и его метаболитами, на клеточном и тканевом уровнях, активацией регенераторного потенциала органа, нормализацией печёночной гемодинамики, стимуляцией системы мононуклеарных фагоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. Совместное внутривенное введение КЭП и КЭМ животным с алкогольным поражением печени приводит к уменьшению деструктивных процессов в ткани органа, стимуляции пролиферативной активности и регенерации гепатоцитов, нормализации кровотока, активации системы мононуклеарных фагоцитов.
2. Терапевтический потенциал КЭП и КЭМ при алкогольном поражении печени может реализоваться не только путём стимуляции регенеративных свойств гепатоцитов, а и через репаративное и стимулирующее влияние на иммунную систему, поскольку под их влиянием стимулируется увеличение количества ЗРЭЦ.
3. Результаты исследования могут служить экспериментальным обоснованием для разработки новых методов лечения АПП. Перспективным направлением дальней-

ших досліджень являється вивчення впливу сумісного внутрішньовенного введення КЭП і КЭМ на стан головного мозку, а

також вивчення долучу доноруючих кліткою в організмі реципієнта.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ковалёв Г. А. // Від фундаментальних досліджень до медичної практики: Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених і спеціалістів (16 листопада 2005 р.). -Харків. - 2005. - С. 71.
2. Ковалёв Г. А., Петренко А.Ю.// Вісник Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. Серія «Медицина».- 2004. - № 617. - Вип. 8. - С.14-18.
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. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1991. - Т. СХІ. - № 4. - С. 425-427.
5. Основы гистологии и гистологической техники. / Под. ред. В. Г. Елисеєва. - М.: Медицина. - 1967. - 286 с.
6. 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.
7. Харченко Н.В., Родонежская Е.В. // Сучасна гастроентерологія. - 2004. - Том.18. - № 4. - С. 5-12.
8. Ben-Hur T., Idelson M., Khaner H., et al. // Stem Cells. - 2004. - Vol. 22. - № 7. - P. 1246-1255.
9. Bongso A., Richards M. // Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. - 2004. - Vol.18. - № 6. - P. 827-842.
10. Jantunen E., Luosujarvi R. // Ann Med. - 2005. - Vol.37. - № 7. - P. 533-541.
11. Sougioultzis S., Dalakas E., Hayes P, et al. // Curr Med Res Opin. - 2005. - V. 21. - № 9. - P. 1337-1346.
12. Yokoyama H., Ishii H., Nagata S. et al. // Hepatology. - 1993. - V. 17. - № 1. - P. 14-19.

## ВПЛИВ СУМІСНОГО ВВЕДЕННЯ ЕМБРІОНАЛЬНИХ КЛІТИН ПЕЧІНКИ І ГОЛОВНОГО МОЗКУ НА ВАЖКІСТЬ АЛКОГОЛЬНОГО УРАЖЕННЯ ПЕЧІНКИ

*О.Ю. Петренко<sup>2</sup>, Б.П. Сандомирський<sup>2</sup>, Т.П. Якімова<sup>1</sup>, Г.О. Ковальов<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Україна

<sup>2</sup>Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків, Україна

### РЕЗЮМЕ

Вивчали вплив сумісного введення клітин ембріональної печінки (КЕП) і клітин ембріонального головного мозку (КЕМ) на важкість алкогольного ураження печінки щурів. Показано що внутрішньовенна ін'єкція КЕП і КЕМ призводить до поліпшення структури печінки на клітинному і тканинному рівнях, стимуляції проліферативної активності і регенерації гепатоцитів, нормалізації печінкової гемодинаміки, активації системи мононуклеарних фагоцитів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** клітини ембріональної печінки, клітини ембріонального головного мозку, алкогольне ураження печінки

## INFLUENCE OF SIMULTANEOUSLY INJECTION OF EMBRYONIC CELLS OF LIVER AND BRAIN ON SEVERITY OF ALCOHOL INDUCED HEPATIC INJURY

*A.Yu. Petrenko<sup>2</sup>, B.P. Sandomirskiy<sup>2</sup>, T.P. Yakimova<sup>1</sup>, G.A. Kovalyov<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Ukraine.

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

### SUMMARY

Influence of simultaneously injection of cells of embryonic liver (CEL) and cells of embryonic brain (CEB) on severity of alcohol induced hepatic injury in rats was studied. It is shown that the intravenous injection of CEL and CEB leads to the improvement the structures of liver at a cellular and tissue level, stimulation of proliferation and regeneration of hepatocytes, normalization of blood flow, activating of the system of mononuclear phagocytes.

**KEY WORDS:** cells of embryonic liver, cells of embryonic brain, alcohol induced hepatic injury