

Возможности стимуляции регенерации фетальными и биологическими материалами при циррозе печени (экспериментальное исследование)

НАРТАЙЛАКОВ М.А., МУСЛИМОВ С.А., ЯНГИРОВ И.В.

РЕФЕРАТ. На основе научных данных экспериментально обоснована возможность потенцирования стимулирующего воздействия на регенерацию печени сочетанного применения аллогенного диспергированного биоматериала и трансплантации фетальной ткани. Результаты экспериментальных исследований позволили начать клиническое применение трансплантации фетальной ткани печени человека в Республиканской клинической больнице им. Г.Г. Куватова.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цирроз печени, регенерация печени, биоматериал Аллоплант

ВВЕДЕНИЕ

Одной из самых тяжелых патологий гепатопанкреатодуоденальной зоны являются диффузные заболевания печени: хронические гепатиты и циррозы печени (Сафин И. А., 1986).

Заболеваемость населения нашей страны острыми гепатитами только за последние три года увеличилась в 2-2,5 раза. Фактические же цифры значительно выше, т.к. официально регистрируются только желтушные формы, составляющие 25 % от числа всех случаев. Хронизация процесса происходит у 30-40 % больных и примерно у половины из них в последующие 10 лет развивается цирроз печени (Голосова Т.В. и соавт., 1993; Ивашкин В.Т., 2002). В экономически развитых странах цирроз печени входит в число шести основных причин смерти у лиц в возрасте 36-64 года (Подымова С.Д., 1998). Несмотря на определенные успехи в понимании патогенеза и терапии этих заболеваний, прогноз при хронических гепатитах и циррозах печени остается неудовлетворительным, а смертность имеет стойкую тенденцию к росту. Положительный эффект при лечении хронических гепа-

титов и ранних стадий циррозов печени отмечен лишь у 30-50 % всех больных этим заболеванием (Апросина З.Г., 1996). У больных в стадии компенсации пятилетняя выживаемость составляет 62 %, а десятилетняя — 51 %; в стадии декомпенсации эти показатели составляют соответственно 19 и 9,9 % (Мочалова Ю.С. и соавт., 1985).

В настоящее время радикальным хирургическим методом лечения хронических гепатитов и циррозов печени является ортотопическая трансплантация печени (Вишневский В.А., Кубышкин В.А., Чжао С.В. и соавт., 2003; Готье С.В. и соавт., 2005), однако ее техническая сложность, дефицит донорских органов, высокая себестоимость лечения толкают на форсированное развитие экономически доступных методов лечения. Главной альтернативой пересадке органа рассматривают стимуляцию регенерации печени.

Существующие методы, направленные на усиление репаративной регенерации печени, в большинстве случаев дают определенный положительный эффект, но кардинально не решают проблему регенерации печени (Цирятьева С.Б., 2002; Нартайлаков М.А. и соавт., 2004).

Одним из способов коррекции патологического процесса при хронических гепатитах и циррозах печени посредством воздействия на регенерацию печеночных клеток является применение диспергированного биоматериала. В эксперименте и клинике показано, что при его внутривенном введении активизируется процесс резорбции собственного избыточного коллагена печени (Мингазов Р.С., 1999; Мусина Л.А., 1999; Павлов В.Н. и соавт., 2000; Муслимов С.А., 2000).

В последние годы перспективным считается пересадка фетальных тканей человека (Батанов А.Н., 2001). Выделяют специфический и неспецифический механизм действия фетальных тканей. Специфический механизм действия — это заместительная клеточная терапия. Неспецифический механизм действия — стимуляция регенераторных процессов за счет стадио-специфических белков, пептидов (ростовые факторы, цитокины, тканевые гормоны). Кроме того, фетальные ткани не вызывают реакции отторжения, поскольку в 1 и 2 триместрах гестации еще не экспрессированы белки гистосовместимости 1 и 2 класса, способны использовать эволюционно более древний энергетический путь — гликолиз, поэтому обладают большей устойчивостью к гипоксии (Пышкин С.А. и соавт., 2000).

В связи с разными механизмами стимулирующего воздействия на регенерацию печени аллогенного диспергированного биоматериала и фетальных тканей человека, возникла гипотеза о потенцировании их эффекта при совместном применении.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исходя из изложенного, целью работы явилось исследование регенераторных процессов в печени при экспериментальном циррозе при воздействии фетальных и биологических материалов.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. При экспериментальном циррозе изучить особенности восстановления анатомических структур печени при применении аллогенного диспергированного биоматериала.
2. Изучить в эксперименте эффективность применения фетальной ткани печени при ее циррозе.
3. Провести оценку воздействия на цирротический процесс в печени аллогенного диспергированного

биоматериала и фетальной ткани печени при сочетании их применении.

4. Разработать практические рекомендации к внедрению в клинику методики сочетанного применения фетальных и биологических материалов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Общая характеристика экспериментального материала и методов исследования

В соответствии с целью и задачами исследования проведены эксперименты на 150 белых крысах линии Вистар (самцы, $m=250-300$ гр.). Животных содержали в стационарных условиях вивария при температуре $18-20^{\circ}\text{C}$, на смешанном рационе питания со свободным доступом к воде. Перед проведением эксперимента крыс выдерживали в карантине 20 дней. Все болезненные манипуляции проводили под эфирным наркозом, животных выводили из опыта методом цервикальной дислокации.

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.

В начале эксперимента для определения нормальных (исходных) величин изучаемых показателей исследовали 6 здоровых крыс, составивших 1-ю опытную группу.

Модель цирроза была получена путем длительного введения внутривенно гепатотропного яда — тетрахлорметана в течение 3 месяцев (2-я опытная 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 $45\pm 9,7$ гр.

Для изучения активности репаративных процессов крыс с циррозом печени разделили на группы: 3-я опытная группа — без каких-либо терапевтических воздействий; 4-я опытная группа — лапаротомия с резекцией части печени; 5-я опытная 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).

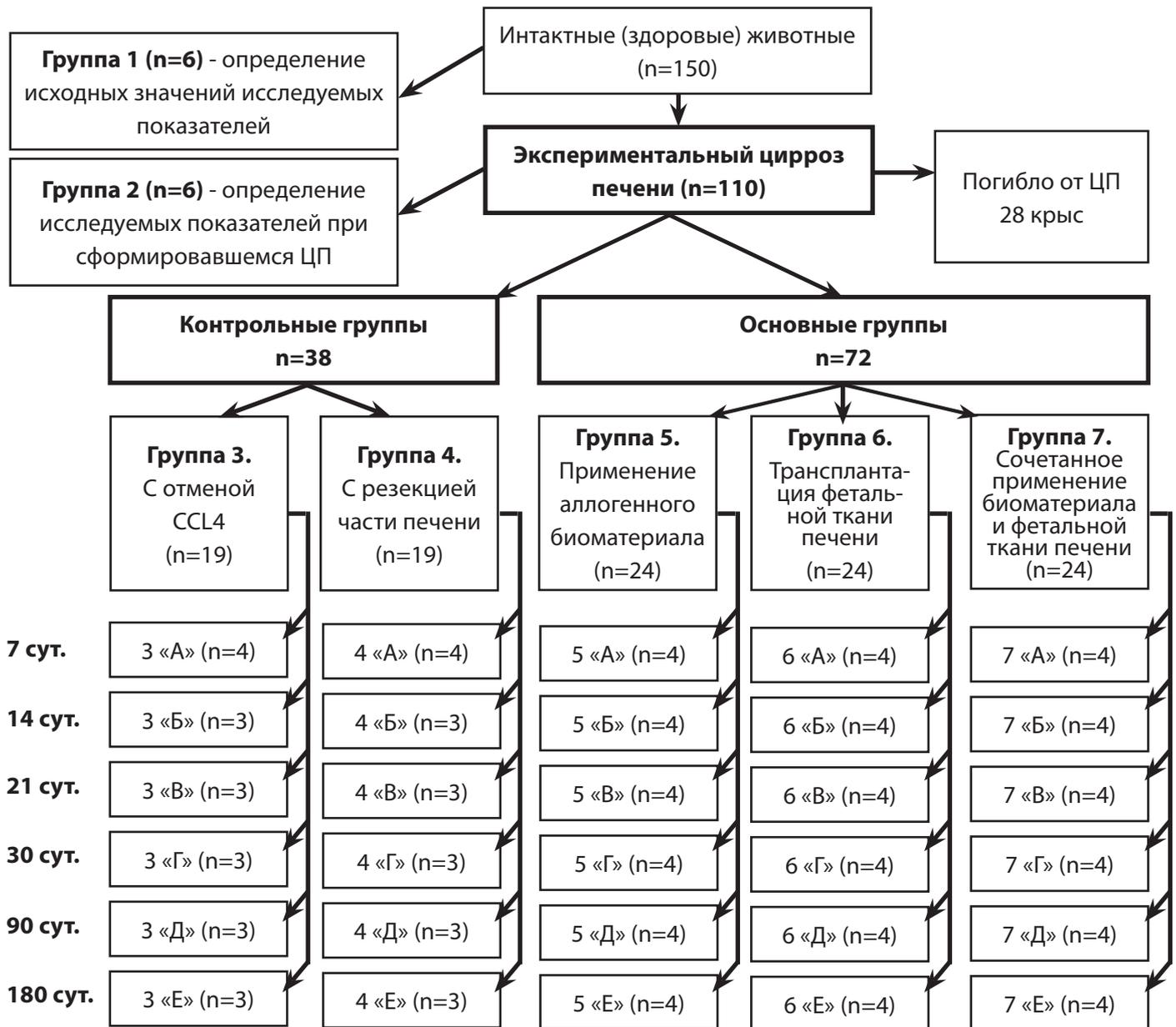


Рис. 1. Распределение экспериментального материала. Примечание: животные разделены на серии «А», «Б», «В», «Г», «Д», «Е» в соответствии со сроками вывода из эксперимента.

Стимуляцию регенерации аллогенным биоматериалом проводили по следующей методике: из лапаротомного доступа в каждую долю печени вводили по 0,1-0,2 мл суспензии биоматериала крыс, который заготавливался в тканевом банке Всероссийского центра глазной и пластической хирургии по технологии Аллоплант® в соответствии с требованиями ТУ 42-2-537-2002.

Для стимуляции репаративных процессов трансплантацией фетальной тканью использовали печень 19-ти дневных эмбрионов крыс. Материал готовили сотрудники Челябинского Биомедицинского центра на основании лицензии ЛАКО Челябинской области № 435. Трансплантацию проводили предбрюшинно инъекцией 1 мл. суспензии (3-5 × 10⁵ ядросодержащих клеток).

Для оценки процессов холестаза и цитолиза в паренхиме печени определяли уровень билирубина и активность аминотрансфераз (АлАТ и АсАТ) сыворотки крови. Уровень билирубина сыворотки крови определяли по унифицированному методу Ендрашика. Измерение оптической плотности осуществлялось на фотоэлектрокалориметре КФК-2МП.

Активность аминотрансфераз сыворотки крови определяли по унифицированному методу Райтмана-Френкеля. Оптическая плотность измерялась на фотоэлектрокалориметре КФК-3.

Животные выводились из опыта на 7, 14, 21, 30, 90, 180 сутки после операции. Забор материала осуществляли следующим образом: после вскрытия брюшной полости методом макромикро-

скопического препарирования выделяли печень, производили взвешивание органа, определяли развитие соединительнотканной стромы и паренхимы. При этом производили прицельный забор ткани для гистологического исследования под микроскопом МБС-2. Объем органа определяли путем его погружения в градуированную емкость с водой. Для гистологического исследования кусочки печени фиксировали в 10%-ном нейтральном формалине, обезвоживали их в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления соединительной ткани окрашивали по Ван-Гизону и по Маллори. Результаты оценивали по бальной оценке гистологических признаков (0-4 баллов) (Пирогова И.Ю., 2003):

1. Воспалительно-клеточная инфильтрация паренхимы и стромы.
2. Ступенчатый некроз печеночных клеток.
3. Фиброз.
4. Гипертрофия ядер гепатоцитов.
5. Гиперплазия ядер гепатоцитов.
6. Пролиферация желчных протоков.
7. Дистрофия гепатоцитов.

Балльную оценку морфологических изменений проводили в 10 полях зрения препарата печени от каждого животного, с учетом степени выраженности изучаемого признака на всей площади среза, причем из каждого кусочка печени изготавливали не менее 5 срезов одной окраски. Подсчет двуядерных гепатоцитов проводили на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Процентное соотношение двуядерных гепатоцитов считали на 2000 просчитанных клеток.

Для электронно-микроскопического изучения кусочки печени фиксировали в растворе 2%-го глутарового альдегида на какодилатном буфере (рН 7,2-7,4), постфиксировали в 1%-ом растворе тетраоксида осмия на том же буфере. Обезвоживание и заливку в эпон-812 проводили по общепринятой методике (Б. Уикли, 1975). Предварительно изготавливали полутонкие срезы толщиной 1 мкм и окрашивали их толуидиновым синим на 2,5%-ом растворе безводной соды. На полутонких срезах выбирали участки для электронно-микроскопического исследования. Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB-III 8800 (Швеция), контрастировали 2%-ым водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (Б. Уикли, 1975) и изучали в электронном микроскопе «JEM-7A» (Япония) при увеличениях от 2000 до 30000.

Всего изучено 340 парафиновых блоков, 1500 гистологических препаратов, 50 полутонких срезов, 35 блока для ультратонких срезов.

Статистический анализ проводился с помощью комплекта компьютерных программ «Stadia-6». Для оценки статистической значимости различий между сопоставляемыми средними величинами использовали критерий Стьюдента «t». Для выявления отличных от средних тенденций различий между выборками применяли критерий Смирнова-Колмогорова (λ); его использовали также в тех случаях, когда доля наблюдений в одной из выборок равнялась нулю. Применялись также критерий Уайта и критерий Пирсона (χ^2). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты морфологических исследований

В первой группе мы исследовали интактных крыс. Структура печени соответствовала норме. Печень крыс покрыта тонкой соединительнотканной Глиссоновой капсулой, отдающей вглубь органа очень тонкие прослойки, которые разделяют его на дольки. Эти прослойки выражены очень слабо и не выявляются. Границы печеночных долек определяются только по расположению междольковых сосудов и желчных протоков, которые составляют «триады», характерные для печени млекопитающих.

Во второй группе (6 крыс) цирроз печени был подтвержден к концу 3-го месяца интоксикации визуальным осмотром брюшной полости и гистологическим исследованием печени. Отмечалась желтушность кожных покровов, гиподинамия, выпадение волос, потеря веса. Выраженная патология отмечена у крыс при лапаротомии — плотная поверхность печени красноватой окраски, зернистость, закругленность краев. Изменения относительной массы печени (весовой коэффициент), объема печени в процессе эксперимента представлены на рисунке 2.

Морфологически наблюдалась белковая и жировая дистрофия печеночных клеток, потеря балочной структуры паренхимы печени, интенсивное разрастание соединительной ткани вокруг портальных трактов, узловая трансформация паренхимы печени с формированием ложных долек, разделенных между собой фиброзными тяжами. В соединительнотканых прослойках отмечалось об-

разование шунтирующих сосудов. Наряду с дистрофией, некрозом, фибробластическими процессами и перестройкой печеночных долек, почти во всех случаях в разной степени наблюдались признаки слабовыраженной регенераторной активности. Она выражалась в гипертрофии гепатоцитов и наличии небольшого количества двуядерных клеток при диффузном прорастании паренхимы соединительной тканью, и единичных регенераторных гепатом — при образовании ложных долек. Гепатомы состояли из гипертрофированных одно- и двуядерных гепатоцитов со светлой цитоплазмой и гиперхромными ядрами. В паренхиме печени выявлялась также компенсаторно-приспособительная пролиферация междольковых желчных протоков. Часто вокруг этих протоков определялись воспалительные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов и плазматических клеток. Изменения у подопытных животных таких показателей как воспалительно-клеточная инфильтрация клеток и паренхимы, ступенчатый некроз печеночных клеток, гипертрофия и гиперплазия гепатоцитов, пролиферация желчных протоков, дистрофия гепатоцитов, фиброз представлены в графическом изображении (рис. 3-9).

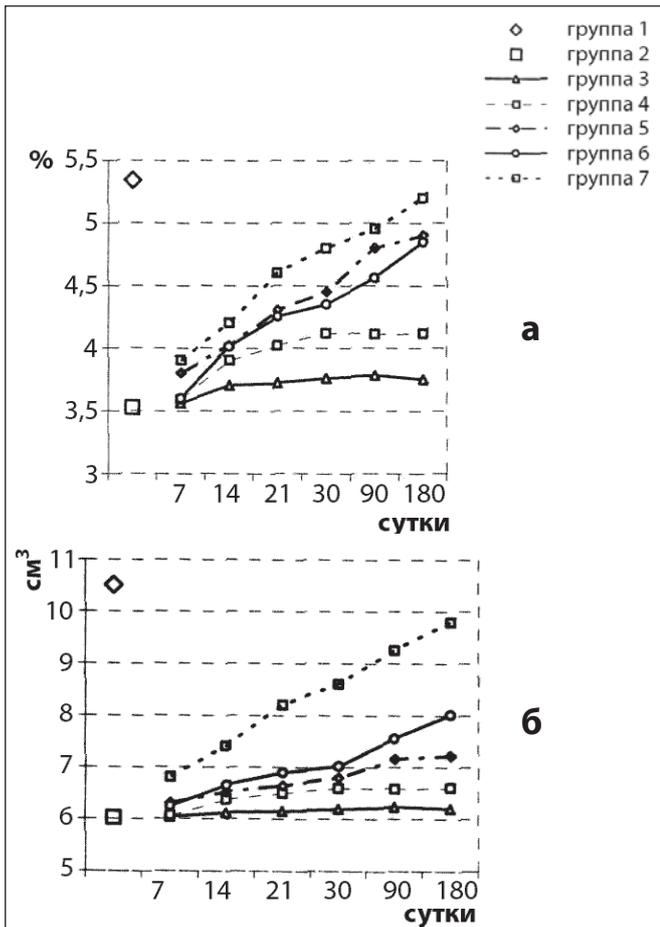


Рис. 2. Динамика изменения относительной массы печени крыс (а) и объема (б) печени крыс в различные сроки эксперимента

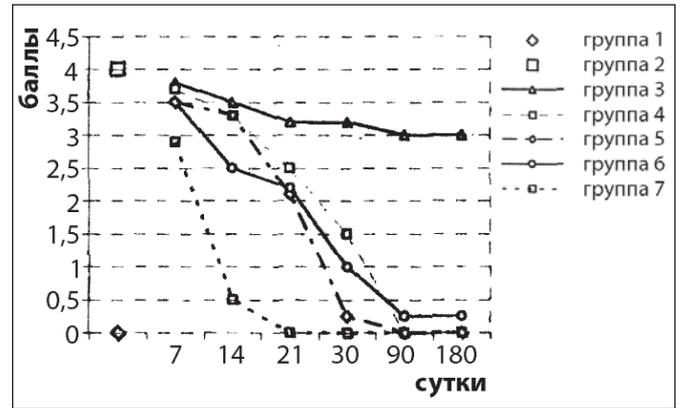


Рис. 3. Изменение воспалительно-клеточной инфильтрации клеток и паренхимы

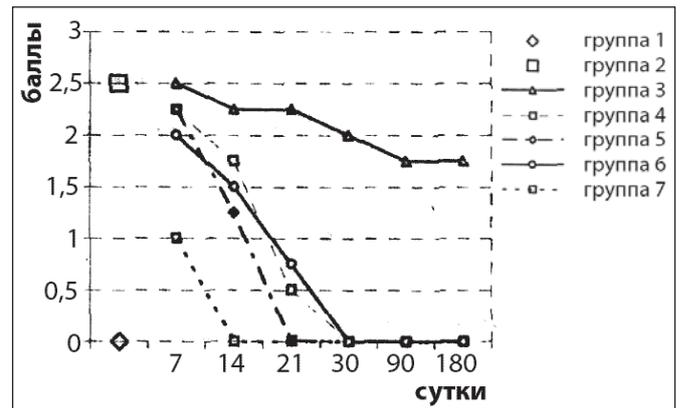


Рис. 4. Изменение показателя некроза печеночных клеток

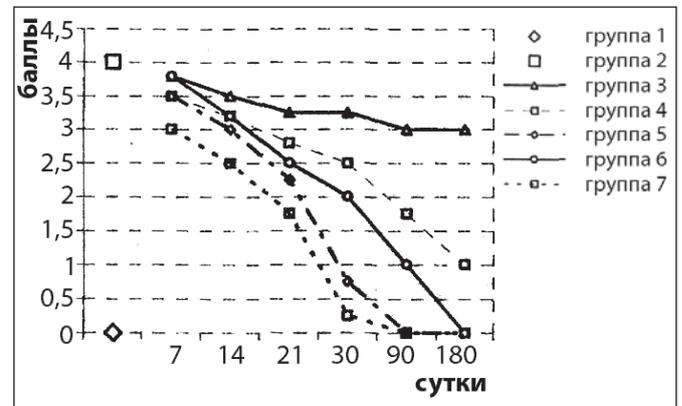


Рис. 5. Изменение показателя фиброза ткани печени

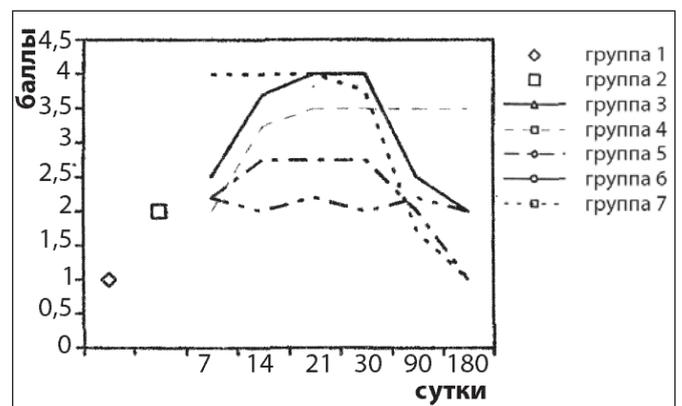


Рис. 6. Изменение показателя гипертрофии ядер гепатоцитов

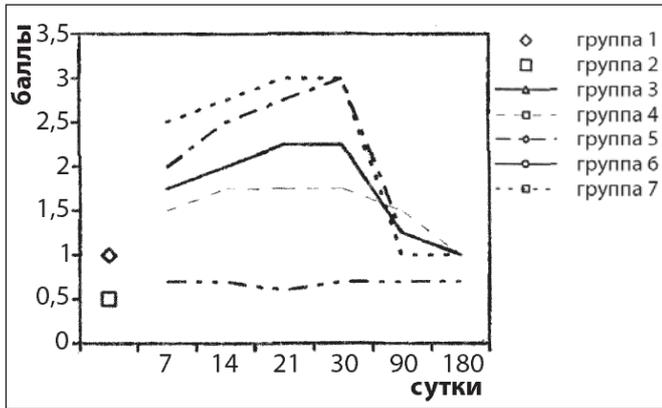


Рис. 7. Изменение показателя гиперплазии ядер гепатоцитов

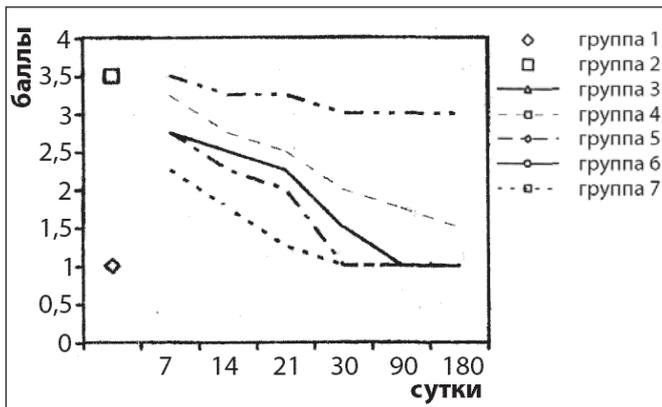


Рис. 8. Изменение показателя пролиферации желчных протоков

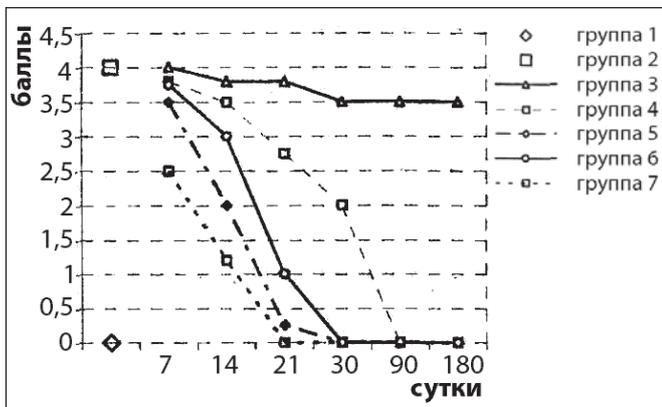


Рис. 9. Изменение показателя дистрофии гепатоцитов

При электронно-микроскопических исследованиях цирротически измененной печени крыс в гепатоцитах были выявлены признаки жировой дистрофии в виде крупных липидных капель в цитоплазме или белковой дистрофии с частичной или полной деструкцией органелл. Встречались клетки с признаками зернистой дистрофии со снижением электронной плотности цитоплазмы, содержащей хлопьевидные глыбки денатурированного белка и клетки с гидропической (вакуольной) или баллонной дистрофией. При гидропической дистрофии выявлялось набухание митохондрий с деструкцией

крист, резкое расширение каналов гранулярного эндоплазматического ретикулума с потерей рибосом и образование вакуолей, заполненных хлопьевидным содержимым. Гликоген в клетках не определялся. Выявлялись также клетки с признаками некроза, проявляющиеся в деструкции органелл, кариопикнозе. В межклеточных пространствах выявлялись фибробласты и пучки коллагеновых волокон.

У крыс контрольной третьей группы, выведенных из эксперимента в разные сроки после прекращения действия тетрахлорметана, 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 соединительнотканых прослойках между ложными дольками. У большинства животных, выведенных из опыта через 30, 90 и 180 суток, макроскопически на печени были обнаружены регенераторные узелки различной величины, округлой формы, интенсивно-красного цвета. Гистологические исследования кусочков печени выявили в паренхиме прослойки зрелой соединительной ткани, интенсивно окрашивающейся по Маллори и по Ван-Гизону, малоинфильтрированной клеточными элементами, характеризующиеся как пассивные септы постнекротического цирроза печени. Размеры клеток варьировали. Гепатоциты располагались беспорядочно без типичной трабекулярности. Встречались двуядерные и даже трехъядерные гепатоциты.

При гистологическом исследовании экспериментального материала в четвертой группе после резекции печени выявлены следующие морфологические изменения. В течение первых дней после операции (7 суток) выявлялись реактивные изменения паренхимы печени, типичные для травмы: сильно выраженный отек, очаговые кровоизлияния и изменения цвета печени, резкое расширение синусоидов, отдельных портальных сосудов и центральных вен, выраженный стаз в них элементов крови. Гистологически уже в первые дни по всей толще оставшейся части органа отмечались признаки репаративных процессов. Они выражались в увеличении количества Купферовских клеток, гипертрофии большинства гепатоцитов и их ядер, появлении в ядрах нескольких ядрышек, пролиферации гепатоцитов и увеличении количества двуядерных клеток, расширению желчных протоков и перестройке сосудистой системы.

К 14 суткам явления отека исчезали. Наблюдались процессы пролиферации желчных протоков. Выявлялось большое количество гипертрофированных гепатоцитов с большими ядрами. Увеличивалось количество двуядерных гепатоцитов. В последующие сроки (21-30 дней) в паренхиме печени продолжало увеличиваться количество двуядерных гепатоцитов. Восстанавливалось состояние цитоплазмы печеночных клеток, при окраске гематоксилином и эозином они окрашивались в розовый цвет. В дальние сроки экспериментов (90 и 180 суток) структура печени частично восстанавливалась. Большинство тяжей соединительной ткани подвергалось процессу инволюции, они исчезали, но не полностью.

Таким образом, после частичной резекции печени крыс в паренхиме возникали репаративно-восстановительные процессы, выражающиеся в активации макрофагов и последующей гипертрофии и гиперплазии гепатоцитов. Значительным и основным фактором в восстановлении паренхимы являлась полиплоидия печеночных клеток, выражающаяся в увеличении размеров ядер гепатоцитов и гипертрофия самих клеток. Соединительнотканые тяжи между печеночными дольками исчезали не полностью.

В пятой группе опытов через 7 суток после введения в цирротически измененную печень крыс диспергированного биоматериала, он определялся в виде гомогенных частиц различной величины, инфильтрированных небольшим количеством мононуклеарных клеток. Биоматериал подвергался интенсивной деколлагенизации и лизису — по Маллори частицы окрашивались в фиолетово-красные тона, а по Ван-Гизону — в оранжево-желтые. Частицы биоматериала активно резорбировали макрофаги. По периферии зоны введения биоматериала выявлялись очень тонкие новообразованные волокна. В окружающей паренхиме воспалительная реакция была слабо выраженной: незначительный отек и инфильтрация единичными лейкоцитами, сосудистый стаз. Обращало на себя внимание появление в окружающих сосудах и расширенных синусоидах значительного количества моноцитов со светлой цитоплазмой и темным овальным или бобовидным ядром. Выраженной особенностью являлось их диффузное распределение в паренхиме. В синусоидах определялось большое количество активно резорбирующих макрофагов.

Наряду с признаками дистрофии гепатоцитов и фибропластических процессов в паренхиме пече-

ни наблюдали выраженные признаки регенераторной активности в виде гипертрофии гепатоцитов и заметного увеличения количества двуядерных клеток. Гипертрофированные гепатоциты имели крупные ядра, в которых четко просматривались одно или два ядрышка, богатые гранулярным веществом. На ультраструктурном уровне в двуядерных гепатоцитах выявлялось большое количество митохондрий и гиперплазия каналов гранулярного эндоплазматического ретикулаума.

Спустя 14 суток в паренхиме печени частиц биоматериала уже не обнаруживалось, вместо них выявлялись небольшие участки рыхлой новообразованной соединительной ткани, окрашивающейся по Ван-Гизону в нежно-розовый цвет, между которыми небольшими островками располагались группы мелких гепатоцитов с равномерно окрашивающейся цитоплазмой и небольшими, одинаковых размеров, ядрами. Здесь же выявляли скопления фибробластов и мононуклеарных клеток со светлой цитоплазмой, большими, овальной формы ядрами. В этих группах клеток определялись фагоцитирующие макрофаги. Ультраструктурные исследования показали, что в дальнейшем новообразованные коллагеновые волокна подвергались разрушению и резорбции макрофагами. Выявляющиеся среди коллагеновых волокон фибробласты были вакуолизированы, с разрушенной плазмолеммой.

На 21-30 сутки после введения частиц биоматериала в паренхиму печени крыс визуально отмечалось увеличение размеров печени и ее массы. Края органа закруглялись, он приобретал красноватый оттенок. На гистологических препаратах частицы биоматериала в паренхиме не обнаруживались. Междольковые сосуды становились спокойнее, явления стаза крови в них и холестаза в желчных протоках исчезали. Желчные протоки были интактной структуры. Признаки обратного развития цирроза проявлялись в истончении фиброзных прослоек между дольками и вокруг порталных трактов. Количество фибробластов и коллагеновых фибрилл в синусоидах заметно уменьшалось, а синусоидных клеток — возрастало. На ультраструктурном уровне выявлялся выраженный лизис коллагеновых волокон и резорбция их макрофагами. Коллагеновые фибриллы, выявляющиеся в пространстве Диссе, были с признаками лизиса. В синусоидах определялись разрушающиеся вакуолизированные фибробласты с разрушенными плазматическими мембранами. В эндотелиоцитах, как свидетельство улучшения трансэндотелиального обмена, отме-

чалось увеличение количества пиноцитозных пучков.

Прослеживалась тенденция восстановления паренхимы печени с образованием балок, хотя полиморфизм клеток в некоторых участках еще сохранялся, а общая структура паренхимы имела признаки атипичности: дольки были неодинаковых размеров с одной или двумя центральными венами, в большинстве случаев расположенных эксцентрично.

Электронно-микроскопически выявлялись признаки усиления функциональной активности гепатоцитов в виде гипертрофии ядрышек в ядре, гиперплазии митохондрий и канальцев гранулярного эндоплазматического ретикулаума. В цитоплазме определялось большое количество свободных рибосом и полирибосом. В некоторых гепатоцитах появлялись гранулы и розетки гликогена.

В последующие 90 суток после введения биоматериала в печень крыс на гистологических препаратах печени выявлялись вышеупомянутые признаки восстановления структуры паренхимы. В отдаленные сроки после введения частиц биоматериала в паренхиму цирротически измененной печени (180 суток) местами сохранялись морфологические признаки некоторой атипичности паренхимы, проявляющиеся в эксцентричном расположении центральных вен или их присутствия в дольке в количестве двух. Однако, цирротические ложные дольки полностью исчезали, равно как и соединительнотканые прослойки.

Таким образом, после введения аллогенного биоматериала в цирротически измененную печень крыс в паренхиме возникают репаративно-восстановительные процессы, выражающиеся образом в увеличении количества, стимуляции активности печеночных макрофагов и в интенсивной пролиферации гепатоцитов. Все эти слагаемые приводят к инволюции цирротической соединительной ткани и к восстановлению структуры печени.

Результаты морфологического исследования печени крыс в шестой группе после предбрюшинного введения им фетальной ткани в начальные сроки (7 дней) показали, что степень некроза печеночных клеток и воспалительно-клеточной инфильтрации паренхимы, фиброза, дистрофии гепатоцитов, степень пролиферации эпителия желчных протоков были выражены почти в той же степени, что и при цирротических изменениях печени крыс. Толстые соединительнотканые тяжи пронизывали па-

ренхиму печени. Довольно большие участки в паренхиме занимали воспалительные инфильтраты, состоящие из лимфоцитов, макрофагов и фибробластов. Выявлялись отек, очаговые кровоизлияния и изменения цвета печени, резкое расширение синусоидов, портальных сосудов и центральных вен, выраженный стаз в них элементов крови. Но на фоне признаков дистрофических изменений цитоплазмы гепатоцитов выявлялась выраженная гипертрофия их ядер. Многочисленные крупные гиперхромные ядра резко выделялись в отечной паренхиме печени. К 14 суткам явления отека паренхимы значительно уменьшались, в некоторых участках до полного исчезновения. Наблюдались процессы пролиферации эпителия желчных протоков. Гепатоциты в паренхиме печени располагались беспорядочно. Формирование печеночных балок отмечалось в основном в непосредственной близости от расширенных сосудов портального тракта и центральных вен. Выявлялось большое количество гипертрофированных гепатоцитов с большими ядрами. Электронно-микроскопически в таких клетках выявлялось большое ядро и цитоплазма с большим количеством митохондрий и гиперплазией гранулярного эндоплазматического ретикулаума, свидетельствующих об интенсификации энергетических и синтетических процессов. Количество двуядерных гепатоцитов несколько увеличивалось. Определялись признаки активации Купферовских клеток, особенно вблизи соединительнотканых прослоек.

В последующие сроки (21-30 дней) в отдельных участках паренхимы печени отмечалось частичное восстановление балочной структуры. Через 3 месяца продолжались процессы восстановления балочной структуры. Большинство гепатоцитов были гипертрофированы с ядрами различных размеров. Состояние сосудов портальных трактов и центральных вен улучшалось, количество соединительной ткани вокруг них уменьшалось. В дальнейшие сроки эксперимента (180 суток) структура печени частично восстанавливалась. Некоторые участки паренхимы соответствовали норме, но в отдельных зонах балочная структура не определялась, гепатоциты были разных размеров.

Таким образом, 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 клеток. Соединительнотканые тяжи между печеночными дольками к концу эксперимента исчезали не полностью, что свидетельствовало о частичном восстановлении структуры печени.

На 7 сутки после предбрюшинной имплантации фетальной ткани и введения в цирротически измененную печень крыс диспергированного биоматериала (седьмая группа опытов), последний определялся в печени в виде частиц различной величины. Они были инфильтрированы относительно небольшим количеством моноклеарных клеток. Лимфоциты встречались среди них очень редко, плазматические клетки не определялись. Биоматериал подвергался интенсивной деколлагенизации и лизису. Частицы биоматериала активно резорбировались макрофагами. В окружающей паренхиме, воспалительная реакция была слабо выраженной: незначительный отек и инфильтрация единичными лейкоцитами, сосудистый стаз. Обращало на себя внимание появление в окружающих сосудах и расширенных синусоидах значительного количества моноцитов со светлой цитоплазмой и темным овальным или бобовидным ядром. Особенностью являлось их диффузное распределение в паренхиме. В синусоидах определялось множество активно фагоцитирующих клеток Купфера.

В этот же срок эксперимента заметно увеличивалось количество двуядерных клеток в паренхиме печени, а также наблюдали выраженные признаки регенераторной активности в виде гипертрофии

гепатоцитов. Гипертрофированные гепатоциты имели крупные ядра, в которых четко просматривались одно или два ядрышка, богатые гранулярным веществом. Паренхима печени состояла из чередующихся участков, состоящих из полиморфных гепатоцитов с выраженными признаками дистрофических изменений цитоплазмы, и участков с регенерирующими мелкими гепатоцитами с розовой ровно окрашивающейся цитоплазмой. Электронно-микроскопически в гипертрофированных клетках выявлялись гранулярный эндоплазматический ретикулум и митохондрии, хотя указанная сеть была мелковакуолярно расширена, заполнена содержимым средней электронной плотности и умеренно дегранулирована. Она плотными слоями располагалась вокруг ядра. На ультраструктурном уровне во многих участках паренхимы печени в синусоидах и в перисинусоидальном пространстве выявлялся лизис отдельных коллагеновых волокон.

Спустя 14 суток в паренхиме печени частицы биоматериала уже не обнаруживались, вместо них выявлялись небольшие участки рыхлой новообразованной соединительной ткани, окрашивающейся по Ван-Гизону в нежно-розовый цвет, между которыми небольшими островками располагались группы мелких гепатоцитов с равномерно окрашивающейся цитоплазмой и небольшими, одинаковых размеров, ядрами. В этих группах клеток определялись фагоцитирующие макрофаги. По всей паренхиме продолжали обнаруживаться участки с пролиферирующими гепатоцитами. Количество двуядерных гепатоцитов увеличивалось (рис. 10). На 21-30 сутки после опыта на макроскопическом уровне отмечалось увеличение размеров печени

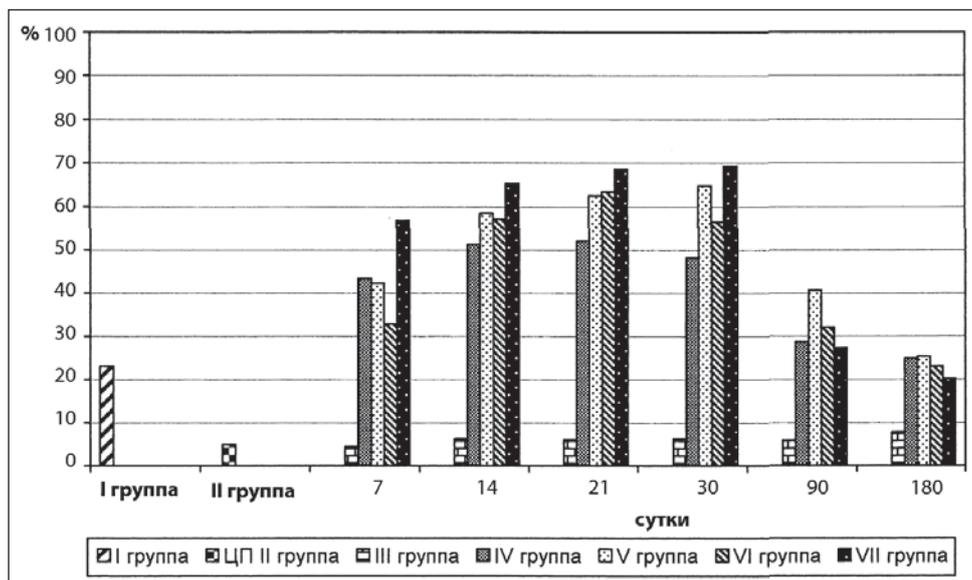


Рис. 10. Относительное количество двуядерных гепатоцитов, %

и ее массы. На гистологических препаратах частицы биоматериала в паренхиме печени не обнаруживались. Выявлялись признаки пролиферации эпителия желчных протоков. Признаки обратного развития цирроза проявлялись в истончении фиброзных прослоек между дольками и вокруг портальных трактов макрофагами. В паренхиме гепатоциты выстраивались в балочные структуры (рис. 11), хотя полиморфизм клеток в некоторых участках еще сохранялся, а общая структура паренхимы имела признаки атипичности: дольки были неодинаковых размеров с одной или двумя центральными венами, в большинстве случаев расположенных эксцентрично.

В течение последующих 90 суток после введения биоматериала в печень крыс и стимуляции фетальными тканями на гистологических препаратах печени выявлялись все вышеупомянутые признаки восстановления структуры паренхимы. Соединительнотканые прослойки между дольками почти полностью исчезали, а те, которые еще сохранились, были сильно истончены, что едва определялись. К 90 суткам восстанавливалась структура желчных протоков, кровеносных сосудов портальных трактов. Большинство шунтирующих сосудов спадались и редуцировались.

Через 180 суток после введения частиц биоматериала в паренхиму цирротически измененной печени и предбрюшинного введения фетальной ткани в печени местами сохранялись морфологические признаки некоторой атипичности паренхимы, проявляющиеся в эксцентричном расположении центральных вен или их присутствия в дольке в количестве двух. Однако, цирротические ложные дольки полностью исчезали, также как и фиброзные тяжи между печеночными дольками. Вокруг портальных трактов и центральных вен обнаруживались полностью сформированные печеночные балки с типичной структурой составляющих их гепатоцитов (рис. 12).

Таким образом, 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 гепатоцитов. Гипертрофия и полиплоидизация ядер гепатоцитов преобладала в начальные сроки эксперимента (7-14 суток). В дальнейшие сроки превалировали процессы пролиферации печеночных

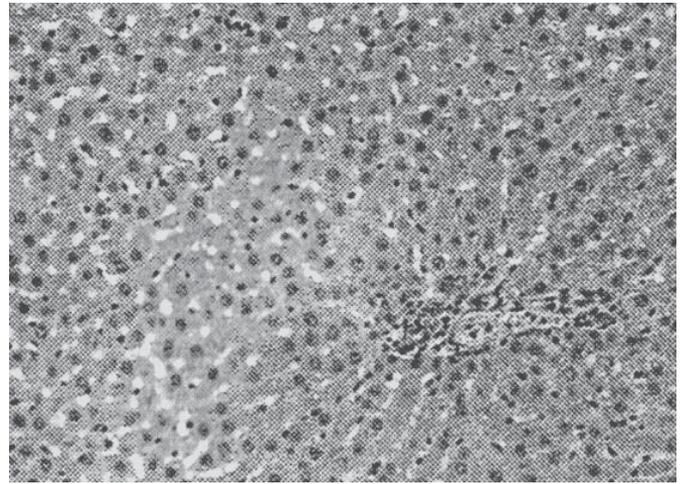


Рис. 11. Балочная архитектура паренхимы печени крысы в восстановленных — участках на 30 сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальными тканями. Окраска по Ван-Гизону. Увел. X125

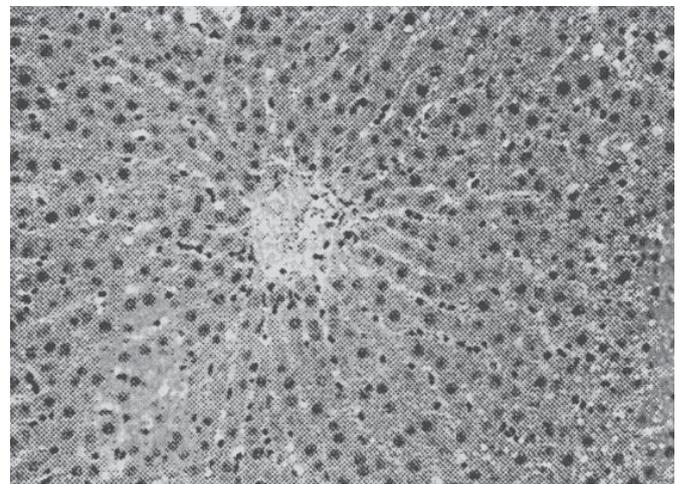


Рис. 12. Сформированные балочные структуры гепатоцитов вокруг центральной вены в печени крысы на 180 сутки после стимуляции аллогенным биоматериалом и фетальными тканями. Окраска по Ван-Гизону. Увел. X125

клеток. Стимуляция аллогенным 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 полгода структура печени крыс восстанавливается.

Результаты исследования функционального состояния печени в эксперименте

По окончании введения тетрахлорметана у крыс выявлено повышение уровня общего билирубина и активности аминотрансфераз сыворотки крови. Через 30 дней после прекращения введения тетрахлорметана и стимуляции регенерации печени у всех животных в наблюдаемых группах произошла частичная нормализация показателей билирубина и трансаминаз, нарушенных в результате

цирроза, но активность этого процесса была различной (рис. 13-15).

Через 180 дней после прекращения введения тетрахлорметана и стимуляции регенерации в 5, 6 и 7 группах биохимические показатели сыворотки крови у подопытных животных практически нормализовались. В 3 и 4 группах происходило снижение билирубина и гиперферментемии в периферической крови, однако полной нормализации показателей и устранения гиперферментемии не происходило.

Таким образом, проведенное экспериментальное исследование позволяет аргументировано утверждать, что совместное применение аллогенного биоматериала и фетальной ткани оказывает стимулирующее влияние на репаративные процессы при цирротическом поражении печени.

Стимуляция регенерации печени этим методом в морфофункциональном отношении эффективнее, чем при отдельном введении биоматериала и фетальной ткани.

Проведенные экспериментальные исследования позволили начать клиническое применение данной методики. Сочетанное введение аллогенного диспергированного биоматериала и фетальной ткани печени человека применили у одного больного с субкомпенсированным циррозом печени неуточненной этиологии, осложненным портальной гипертензией I ст., варикозным расширением вен пищевода I ст. Анализ результата лечения (обследован через 6, 12 и 18 месяцев) указывает на достижение стабильной ремиссии заболевания. Проследивается значительная положительная динамика в степени выраженности как астеновегетативного синдрома (повысился эмоциональный тонус, работоспособность, уменьшились симптомы общей интоксикации), так и клинических проявлений печеночной недостаточности (нормализация по биохимическим, иммунологическим и инструментальным данным). К сожалению, единичное клиническое наблюдение не позволяет нам обобщить эти данные в отдельный раздел данной статьи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После введения аллогенного биоматериала в цирротически измененную печень крыс происходит активация макрофагов печени и увеличение их количества, что приводит к резорбции избыточной соединительной ткани, восстановлению микро-

- ◇ группа 1
- группа 2
- группа 3
- - группа 4
- ◇— группа 5
- группа 6
- -□- группа 7

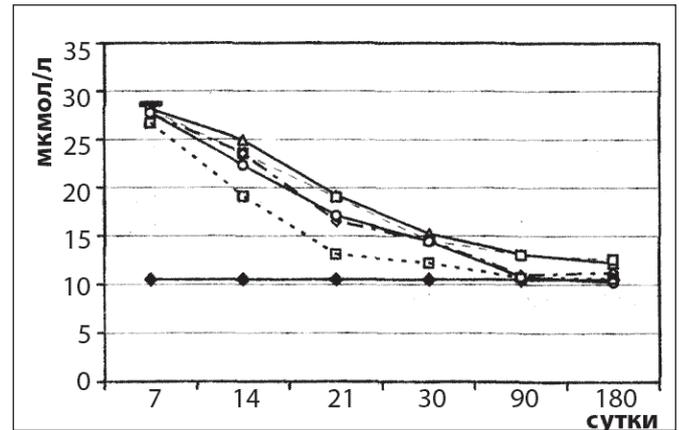


Рис. 13. Изменение показателя билирубина в процессе эксперимента

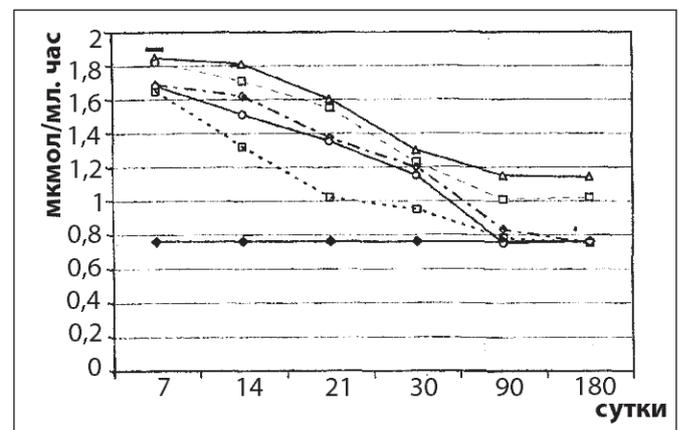


Рис. 14. Изменение показателя активности АсАТ

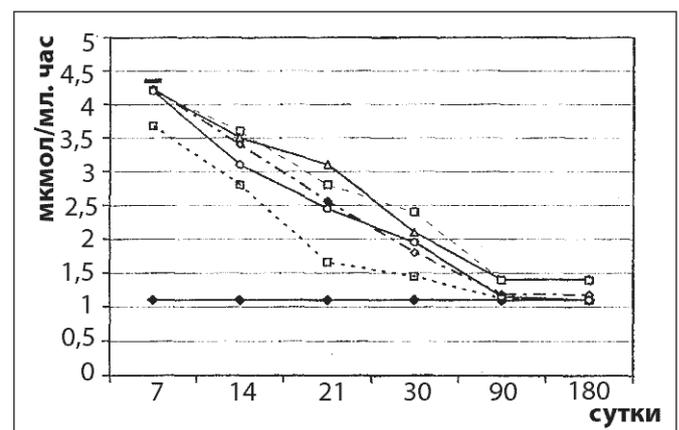


Рис. 15. Изменение показателя активности АлАТ

пографических взаимоотношений в ацинусе и созданию условий для пролиферации гепатоцитов.

При предбрюшинном введении фетальной ткани при экспериментальном циррозе печени основным фактором регенерации является полиплоидия печеночных клеток и их гипертрофия, что приводит к раннему восстановлению функциональных показателей печени.

При сочетании применения диспергированного биоматериала и фетальной ткани происходит потенцирование влияния обоих материалов, выражающееся в резорбции избыточной соединительной ткани, пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов, восстановлении структуры и массы органа, а также в раннем восстановлении функциональных показателей печени.

Положительные результаты экспериментов позволяют рекомендовать клиническое применение фетальной ткани печени в сочетании с аллогенным диспергированным биоматериалом в комплексном хирургическом лечении больных с хроническими активными гепатитами и циррозами печени.

В комплекс хирургического лечения хронических гепатитов и циррозов печени целесообразно включить предбрюшинную имплантацию фетальной ткани печени и посегментарное введение в паренхиму печени аллогенного биоматериала.

Фетальную ткань печени необходимо вводить в предбрюшинную клетчатку круглой связки печени путем ее пункции на середине расстояния между мечевидным отростком и пупком в дозе 8x10⁷ живых клеток в 5 мл физиологического раствора.

Аллогенный диспергированный биоматериал необходимо вводить в доступные сегменты печени безигольным инъектором в дозе 10 гр. материала в 30 мл 0,25 % новокаина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Влияние фетальных тканей печени и биоматериала Аллоплант на регенеративные процессы при экспериментальном циррозе печени / М.А. Нартайлаков, Р.С. Мингазов, И.В. Янгиров, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, А.Н.Батанов // Морфологические ведомости. — 2006. — № 1-2. — Прил. № 1. — С. 207-211.
2. Возможности хирургического лечения эхинококкоза печени / В.С. Пантелеев, Д.Р. Мушарапов, В.Г. Хисамов, Э.Р. Даукаева, И.В. Янгиров // Вопросы теоретической и практической медицины: тез. докл. 66-й Респ. науч. конф. студентов и молодых ученых БГМУ. — Уфа, 2001. — Т. 1 — С. 122-123.
3. Клинико-экспериментальное обоснование стимуляции регенерации печени при хронических активных гепатитах и циррозах // М.А. Нартайлаков, Э.Р. Мулдашев, Р.С. Мингазов, И.А. Сафин, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, Г.Р. Ахиярова, И.В. Янгиров // Здравоохранение Башкортостана. — 2004. — № 3: Новые технологии в хирургии. — С. 211-212.
4. 4. Стимуляция регенерации печени при ее диффузных заболеваниях / М.А. Нартайлаков, И.В. Янгиров, Р.С. Мингазов, А.Н. Батанов // V съезд научного общества гастроэнтерологов России и XXXII сессия Центрального научно-исследовательского института гастроэнтерологии Департамента здравоохранения г. Москвы. Тезисы. — М., 2005. — С. 158.
5. Стимуляция регенерации печени при хронических гепатитах и циррозах / И.В. Янгиров, М.А. Нартайлаков, Р.С. Мингазов, А.Н. Батанов // Неотложная и специализированная хирургическая помощь: тез. докл. 1-го конгресса московских хирургов. — М.: ГЕОС, 2005. — С. 315.
6. Фетальная ткань и стимулятор регенерации — Аллоплант в лечении хронических гепатитов и циррозов печени в эксперименте / М.А. Нартайлаков, И.В. Янгиров, Р.С. Мингазов, С.А. Муслимов, Л.А. Мусина, А.Н.Батанов // Здравоохранение Башкортостана. — 2006. — №1: Труды ассоциации хирургов Республики Башкортостан за 2005 год. — С. 19-26.