

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ КРЫС В ВОЗРАСТЕ ТРЁХ МЕСЯЦЕВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ХЛОРОФИТУМА ХОХЛАТОГО*

Аннотация. Проведенное исследование показало, что ферментативный гидролизат Хлорофитума хохлатого обладает стимулирующим действием в отношении репаративной регенерации гепатоцитов

Ключевые слова: печень, апоптоз, некроз, пролиферация, гепатоцит, регенерация.

В настоящее время важной и интенсивно развивающейся отраслью современной биологии является получение различного рода БАДов (биологических активных добавок) из природных материалов. Этот факт объясняется тем, что применение БАДов позволяет проводить как профилактику заболеваний, так и замедлять общие темпы старения организма.

Значительный объем всех БАДов составляют препараты, мишенью действия которых является печень, поскольку этот важнейший орган, выполняющий в организме человека более 500 функций, наиболее подвержен воздействию токсических веществ различного происхождения (химические вещества, получаемые человеком с пищей; продукты промышленного происхождения, попадающие в атмосферу, алкоголь, вирусы и пр.) Все эти факторы приводят к преждевременному развитию патологий этого органа. Особенно актуальными являются токсические повреждения печени, вызываемые алкоголем [7;11].

Печень – своеобразная «лаборатория», где осуществляется сложнейший синтез ряда жизненно важных веществ. Несмотря на слабую физиологическую регенерацию, печень обладает очень высокой потенцией к репаративной регенерации.

Функционирование печени в норме и при патологии определяется сложным взаимодействием гетерогенных субпопуляций клеток, формирующих печень. Они включают в себя клетки печени (гепатоциты), эндотелиальные клетки сосудов, макрофаги-резидентные (клетки Купфера), клетки желчных каналов и тучные клетки (клетки Ито). Печень представляет собой центральный орган химического гомеостаза организма, где создается единый обменный и энергетический пул для метаболизма белков, жиров и углеводов. Кроме того, она является не только «фабрикой», но и «складом», депо, где накапливаются многие вещества, необходимые для поддержания жизненных функций организма. Печень, участвуя в большинстве физиологических и патологических процессов в организме, пропускает через себя огромное количество крови. В эмбриональном периоде является органом кроветворения. Столь многочисленные и важные функции печени определяют ее значение для организма как жизненно необходимого органа. Поэтому особую важность имеет морфофункциональная полноценность и высокая регенерационная способность печени, испытывающей в современных условиях на протяжении постнатального онтогенеза значительные перегрузки [9;11;12].

Сведения, полученные о нарушении гепатобилиарной системы у крыс, важны, поскольку данное животное является очень удобной биологической моделью для изучения многочисленных показателей, в том числе и при изучении морфофункциональных показателей печени [1;5;3].

На клеточном уровне восстановление клеток печени при повреждении происходит

* © Козлова М.А., Арешидзе Д.А., Снисаренко Т.А.

как за счет пополнения количества клеток (путем их митотического деления), так и за счет гипертрофии, последние клеточные преобразования сопровождаются сложнейшими биохимическими изменениями, направленными как на подготовку клеток к делению, так и на восстановление функции печени.

При повреждении печени гистологические изменения, прежде всего, обнаруживаются в клетках паренхимы. В течение нескольких часов клетки теряют запасы гликогена и накапливают липидные капли. Затем в клетках выявляются характерные признаки активации к развитию – увеличиваются размеры ядер и ядрышек, в цитоплазме появляются рибосомы и полирибосомы.

Один из наиболее ярко выраженных признаков клеток регенерирующей печени – это высокая степень их полиплоидии. Даже в нормальном развитии полиплоидия этих клеток является скорее правилом, чем исключением. Регенерация стимулирует процесс полиплоидизации, что выражается в появлении в печени возрастающего числа клеток с более высоким значением плоидности

В настоящее время также получены доказательства того, что апоптоз – очень частое проявление патологически измененной печени. Считается, что апоптоз, являясь одним из важнейших механизмов развития, в норме имеет значение в процессе физиологического обновления гепатоцитов. Одним из критериев интенсивности гибели клеток в органе являются некроз. Считается, что некроз часто сопровождает апоптоз на завершающих его стадиях. Интересно, что зоны некроза могут быть окружены зонами апоптоза, и это позволяет считать, что речь идет об ассоциированном феномене [2;4;7;8;10;12].

Таким образом, регенерация печени – это комплекс жестко регулируемых физиологических процессов правильной пролиферации гепатоцитов, непаренхиматозных клеток и восстановления нарушенной функции органа после его повреждения.

В качестве исходного материала для изготовления гепатопротекторов нами было использовано декоративное растение Хлорофитум хохлатый, свойства которого поглощать токсические вещества из атмосферы давно известны и хорошо изучены.

К настоящему времени проведены исследования гепатопротективных свойств спиртовой и водной вытяжек, а так ферментативного гидролизата из листьев Хлорофитума хохлатого. При этом было обнаружено, что при экспериментальном токсическом повреждении печени наибольший и ярко выраженный гепатопротективный эффект отмечается при применении ферментативного гидролизата с питьем. Таким образом, для дальнейшего изучения и разработки был выбран именно ферментативный гидролизат.

В настоящее время проведен полный комплекс испытаний препарата на безвредность. В результате тестов не обнаружено патологических воздействий препарата на органы и системы организма.

Эффективность препарата определяется относительной простотой и дешевизной способа его получения и, что особенно важно, тем, что ферментативный гидролизат Хлорофитума хохлатого обладает не монофакторным действием на печень, а является препаратом полифакторным, влияющим на все 3 группы поражений печени, а именно на:

- репарацию гепатоцитов;
- регенерацию гепатоцитов;
- антиоксидантную систему печени.

Препарат применяется с питьем в малых дозах, что также является его достоинством. Препарат эффективен как при заболеваниях печени (токсический гепатит, цирроз и пр.), так и для их профилактики.

Объектом исследования были 200 крыс линии Вистар в возрасте трёх месяцев, с исходной массой тела 180-230 г. Все животные содержались в виварии в стандартных условиях. Температура воздуха в помещении составляла плюс 20...22°C, влажность воз-

духа – 40-45%.

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с правилами защиты позвоночных животных, используемых в научных целях (Руководства и рекомендации для Европейских независимых комитетов по вопросам этики, Брюссель, 1995, 1997; Рекомендации Комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований, Женева, 2000).

Животные были разделены на 5 групп:

1. Интактные животные
2. Контрольные животные (гидролизат) – 1 группа
3. Контрольные животные (CCl_4) – 2 группа
4. Экспериментальная группа 1 (CCl_4 + гидролизат)
5. Экспериментальная группа 2 (гидролизат, потом CCl_4).

Животные первой группы не получали никакого воздействия извне, животные второй группы получали с питьем гидролизат; на животных 3 группы воздействовали по 2 минуты четыреххлористом углеродом (CCl_4), воздушно-капельным методом, путем помещения их в закрытый эксикатор в течение 6-ти дней, животные 4 группы также подвергались воздействию CCl_4 , при этом они получали с питьем исследуемый гидролизат. Крысы 5 группы получали гидролизат в течение 6 дней, а в последующем также подвергались воздействию CCl_4 .

Все исследованные органы брались после усыпления животных под эфирным наркозом. После фиксации материала 10%-нейтральным забуференным формалином для части органов проводилась проводка по общепринятой методике с последующей заливкой в парафин. При проведении исследований органов, залитых в парафин, приготавливались серийные срезы толщиной 5-6 мкм.

Резку осуществляли на обычном и замораживающем микротоме. Срезы наклеивали на стекла и окрашивали гематоксилин-эозином без депарафинирования. Окрашенные срезы заключали в бальзам.

Для выявления апоптических клеток полутонкие срезы окрашивались метиленовым синим-азуром II с докраской фуксином

Апоптический индекс считали по формуле:

$$AI = N_m / N,$$

где N_m – количество апоптических клеток;

N – общее количество клеток в исследуемой совокупности [2].

Скорость пролиферации гепатоцитов у экспериментальных животных вычисляли по методике, предложенной А. Carnie, в модификации Калинской Н.С. [9] с использованием колхицина. Метод позволяет учитывать интенсивность митозов с единой точки отчета – метафазы.

Готовили 0,02% раствор колхицина. Затем испытуемому животному внутривенно вводили колхицин в утренние часы (6 ч. утра) из расчета 0,7 мл колхицина на 100 г живого веса, что является рекомендуемой и эффективной концентрацией для млекопитающих этого возраста. Колхицин быстро проникает в ткани. После 5 ч. (11 ч. утра) производилась декапитация крыс с дальнейшим препарированием и выделением органа. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, производили подсчет митозов.

Митотический индекс определяли по формуле:

$$MI = N_m / N,$$

где N_m – число митозов;

N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Некротический индекс считали по формуле:

$$\text{НИ} = N_n / N,$$

где N_n – количество некротических клеток;

N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Скорость пролиферации [2,13] изучаемой ткани вычисляли по формуле:

$$V = I_m / M_t * 100,$$

где I_m – митотический индекс;

M_t – время митоза или продолжительность регенерационного времени (5 часов, время действия колхицина).

Статистическую обработку результатов исследования и установления коррелятивной зависимости между изучаемыми показателями проводили на компьютере с использованием программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

Проведенное исследование показало, что под действием четыреххлористого углерода в печени животных по сравнению с печенью интактных животных значительно повышается некротический индекс – $15,0 \pm 1,2\%$ против $2,7 \pm 0,5\%$ в контроле, при этом вдвое снижена скорость пролиферации гепатоцитов – $7,2 \pm 0,4$ у интактных животных и $3,5 \pm 0,3$ у крыс третьей группы, также снижен митотический индекс до $1,8 \pm 0,3\%$, но возрастает апоптотический индекс, достигая $8,57 \pm 0,8\%$ против $4,4 \pm 0,4\%$ (рис. 1). Таким образом, можно утверждать, что под влиянием четыреххлористого углерода в печени животных происходит массивная гибель гепатоцитов путём некроза и апоптоза при явном преобладании первого типа клеточной гибели, что нехарактерно для печени в нормальных условиях. На фоне гибели клеток существенно снижается регенеративная способность печени, что подтверждается низкими значениями митотического индекса и скорости пролиферации гепатоцитов.

Применение ферментативного гидролизата приводит у интактных животных к увеличению митотического, апоптотического индексов, скорости пролиферации и некоторому снижению некротического индекса.

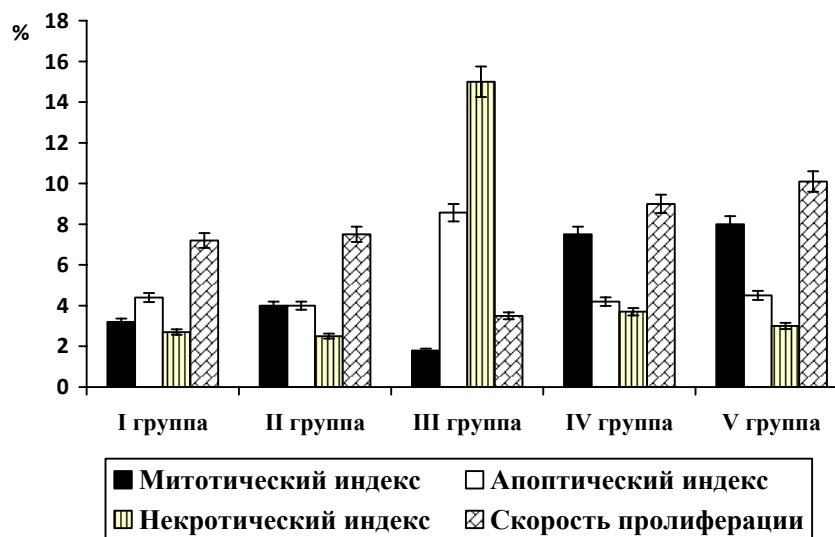


Рис. 1. Митотический, апоптотический, некротический индексы и скорость пролиферации в печени крыс

Применение гидролизата после поражения печени CCl_4 вызывает повышение митотического и апоптотического индексов до $7,5 \pm 0,4\%$ и $4,2 \pm 0,3\%$ соответственно, некротический индекс составляет $3,7 \pm 0,6\%$, а скорость пролиферации достигает $9,0 \pm 0,6$.

Использование ферментативного гидролизата до токсического влияния на печень так же вызывает повышение митотического и апоптического индексов до $8,0 \pm 0,4\%$ и $4,5 \pm 0,25\%$ соответственно, некротический индекс снижается до $3,7 \pm 0,6\%$, а скорость пролиферации достигает $10,1 \pm 0,6$.

Таким образом, применение гидролизата усиливает обновление клеточной популяции гепатоцитов и снижает некротическую активность в органе.

Эти факты свидетельствуют о том, что применение ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого оказывает существенное стимулирующее влияние как на физиологическую, так и на репаративную регенерацию в печени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Арешидзе Д.А. Влияние ферментативного гидролизата Хлорофитума хохлатого на морфофункциональную целостность печени при токсическом поражении у крыс в возрасте трёх месяцев / Д.А. Арешидзе, М.А.Козлова, Т.А. Снисаренко, Ю.Р. Мутыгуллина // Вестник МГОУ. – М., 2009. – № 4. – С. 80-84.
2. Астауров Б.Л. Методы биологии развития / Б.Л. Астауров. – М.: Медицина, 1974. – 590 с.
3. Балаж А. Эндогенные ингибиторы клеточной пролиферации / А. Балаж, И. Блажек. – М.: Мир, 1982. – 320 с.
4. Бродский В.Я. Клеточная полиплоидия, пролиферация и дифференцировка / В.Я. Бродский, И.В. Урываева. – М.: Наука, 1989. – 259 с.
5. Головнев В.А. Особенности заживления экспериментальной раны печени у крыс в условиях применения ангиогения / В.А. Головнев, А.А. Бейсембаев, Э.Х. Акрамов // Морфология. – 2005. – Т. 128. – № 4. – С. 98-100.
6. Давыдов В.Г. Молекулярные механизмы апоптоза и некроза гепатоцитов. Особенности гибели гепатоцитов при обструктивном холестазе / В.Г. Давыдов, С.В. Бойчук, Р.Ш. Шаймарданов // Российский журнал гастроэнтерологии гепатологии колопроктологии. – 2006. – № 5. – С. 11-18.
7. Данилов Р.К. Гистогенез и регенерация тканей / Р.К. Данилов, Б.А. Григорян // Морфология. – 1996. – № 1. – С. 110-111.
8. Жижина Г.П. Роль апоптоза в нормальном онтогенезе, патогенезе и старении / Г.П. Жижина // Клиническая геронтология. – 2002. – Т. 8. – № 4. – С. 4-10.
9. Калинин Н.С. Особенности физиологической и репаративной регенерации печени крыс в репродуктивном периоде онтогенеза под влиянием биопрепаратов на основе Каллизии душистой. Автореф.... дисс. канд. биол. наук / Н.С. Калинин - Ставрополь, 2009. – 22с.
10. Лушников Е.Ф. Гибель клетки / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абрисимов. – М.: Медицина, 2001. – 160 с.
11. Подымова С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей / С.Д. Подымова. – М.: Медицина, 1993. – 544 с.
12. Полежаев Л.В. Утрата и восстановление регенерационной способности у животных / Л.В. Полежаева. – М.: Наука, 1986. – 248 с.
13. Logsdon M.D. Apoptosis and the Bcl-2 gene family: patterns of expression and prognostic value in stage I and II follicular center lymphoma? / M.D. Logsdon, R.E. Jr. Meyn, P.C. Besa // Int J Radiat Oncol Biol Phys. – 1999, 44. – P. 19-29.

M. Kozlova, D. Areshidze, T. Snisarenko

CHARACTERISTICS OF RET'S HEPAR REGENERATION AT THE AGE OF THREE MONTHS UNDER THE INFLUENCE OF CHLOROPHYTUM COMOSUM ENZYMATIC HYDROLYZATE

Abstract. Was exposed an incentive effect of Chlorophytum comosum enzymatic hydrolyzate on a hepatocyte reparative regeneration.

Key words: hepar, apoptosis, necrosis, proliferation, regeneration, hepatocyte.