

- заповедника «Ростовский», 26-28 апреля 2006. Ростов н/Д.: Изд-во Рост. ун-та, 2006. С.61-63.
4. Минаева Т.М. К истории алан Верхнего Прикубанья по археологическим данным. Ставрополь, 1971. 248 с.
5. Очерки истории Карачаево-Черкесии. Т.1. Ставроп. кн. изд-во, 1967. 600 с.

УДК 57.054

Козлова М.А., Арешидзе Д.А., Снисаренко Т.А.
Московский государственный областной университет

**РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПЕЧЕНИ КРЫС
В ВОЗРАСТЕ ТРЁХ МЕСЯЦЕВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО
ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗАТА ХЛОРИФИТУМА
ХОХЛАТОГО НА РЕГЕНЕРАТОРНЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ ПЕЧЕНИ КРЫС ТРЕХМЕСЯЧНОГО ВОЗРАСТА***

M. Kozlova, D. Areshidze, T. Snisarenko
Moscow State Regional University

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

Аннотация: Проведенное исследование показало, что ферментативный гидролизат Хлорофитума хохлатого обладает стимулирующим действием в отношении репаративной регенерации гепатоцитов. Объектом исследования было 200 крыс, что обеспечило репрезентативность результатов.

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

Abstract: The carried out analysis showed that Chlorophytum comosum enzymatic hydrolyzate has an incentive effect on hepatocyte reparative regeneration. 200 rats were under investigation that proved represented results.

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

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 распространены являются токсические повреждения печени, вызываемые алкоголем [7,11].

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

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-резиденты (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 как за счет пополнения количества клеток (путем их митотического деления), так и за счет гипертрофии, последние клеточные преоб-

разования 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 Хлофитум 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 же 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 воздуха 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 (CCl₄) – 2 группа
4. экспериментальная группа 1 (CCl₄ + гидролизат).

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 (CCl₄), воздушно-капельным методом, путем помещения их в закрытый эксикатор в течение 6-ти дней, животные 4 группы также подвергались воздействию CCl₄, при этом они получали с питьем исследуемый гидролизат, крысы 5 группы получали гидролизат в течение 6 дней, а в последующем также подвергались воздействию CCl₄.

Все исследованные органы бралась 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 балъзам.

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:

$$МИ = N_m / N,$$

где: N_m – число митозов;

N – общее количество клеток в исследуемой совокупности.

Некротический индекс считали по формуле:

$$НИ = N_n / N,$$

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).

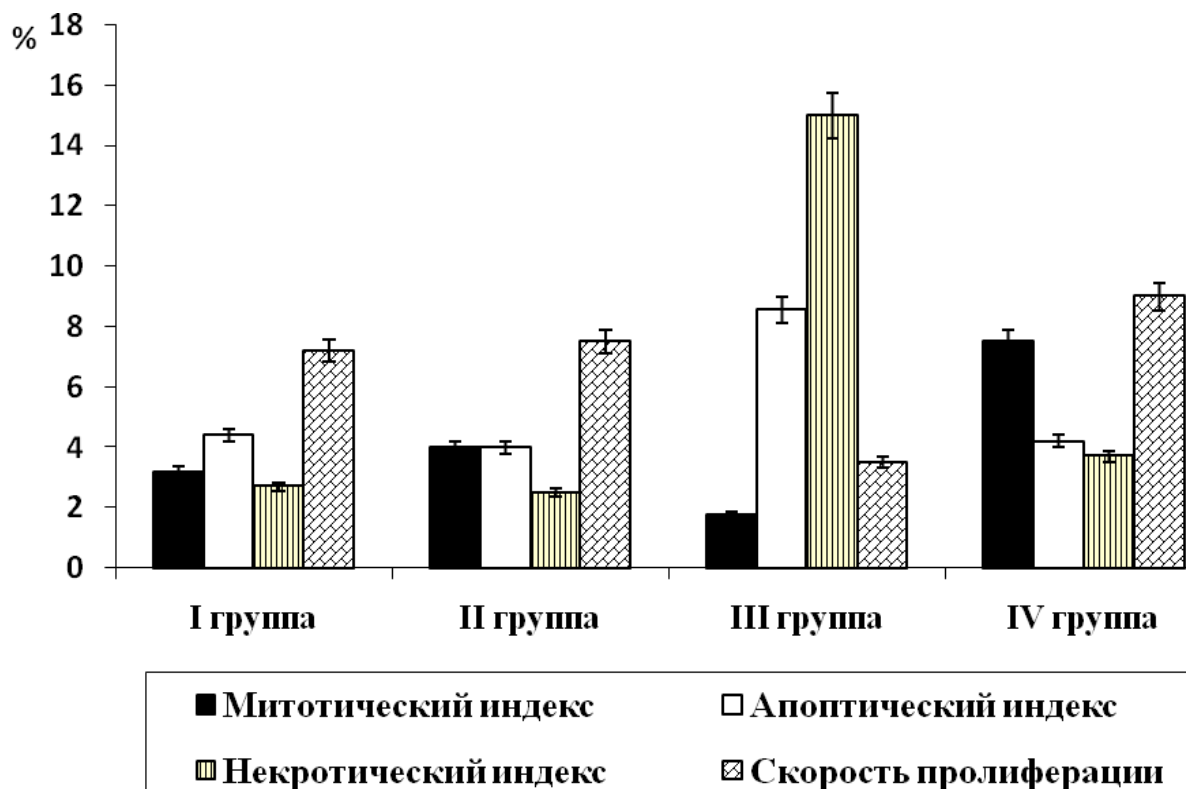


Рис.1. Митотический, апоптотический, некротический индексы и скорость пролиферации в печени крыс

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.

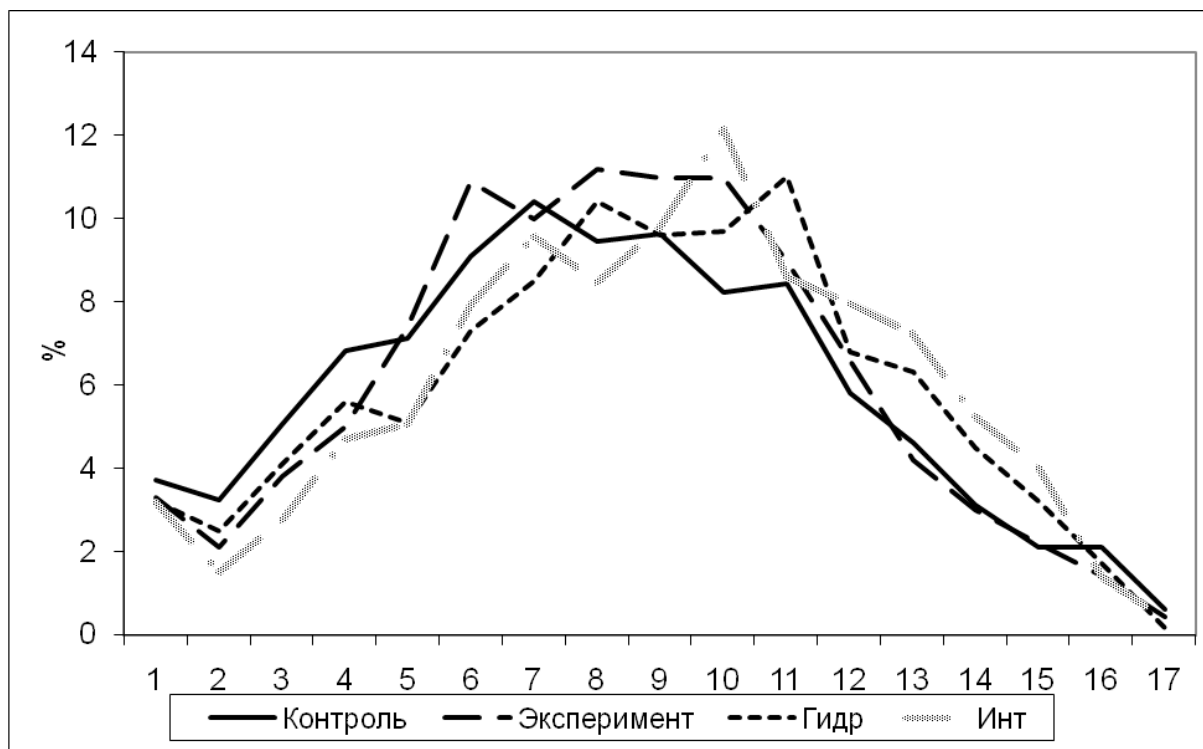


Рис.2. Кариограмма печени крыс исследованных групп.

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 также вызывает повышение митотического и апоптотического 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 $10,1 \pm 0,6$.

Анализ кариограмм печени крыс исследованных групп показал, что применение гидролизата при токсическом воздействии приводит к сдвигу кариограммы влево, что говорит о омоложении клеточной популяции печени, а применение гидролизата без токсического воздействия несколько сдвига-

ет кариограмму вправо, что свидетельствует об увеличении количества полиплоидных клеток.

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.

ЛИТЕРАТУРА:

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, Снисаренко Т.А., 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 холестазах / В.Г. Давыдов, С.В. Бойчук, Р.Ш. Шаймарданов // Российский журнал гастроэнтерологии, и 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. Калининская, 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. Калининская Ставрополь, 2009. 22 с.
10. Лушников, Е.Ф. Гибель клетки / Е.Ф. Лушников, А.Ю. Абросимов. М.: Медицина, 2001. 160 с.
11. Подымова, С.Д. Болезни печени. Руководство для врачей / Д.С. 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.