

О. Л. Холодкова, Є. О. Мазніченко,
Н. В. Нескоромна, Д. М. Горчаг, О. М. Юзвак

ЕФЕКТИВНІСТЬ ТЕРАПІЇ ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ ЗБАГАЧЕНОЮ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМОЮ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 616.36-002.2:612.354-092

Е. Л. Холодкова, Е. А. Мазниченко, Н. В. Нескоромная, Д. М. Горчаг, А. Н. Юзвак
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПИИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ ОБОГАЩЕННОЙ ТРОМБОЦИТАМИ
ПЛАЗМОЙ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

В работе изложены результаты лечения цирроза печени у крыс обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП). Показано, что двукратное введение ОТП в ткань печени на фоне цирроза способствует снижению объема соединительной ткани и числа коллагеновых волокон в местах гибели гепатоцитов; происходит активная регенерация ткани печени с восстановлением ее микроструктуры. При этом ОТП является смесью аутологичных клеток, полностью физиологических для организма, и не требует иммуносупрессии и создания особых условий для лечения, как это обычно происходит при трансплантации гетерогенного материала.

Ключевые слова: цирроз печени, обогащенная тромбоцитами плазма, эксперимент.

UDC 616.36-002.2:612.354-092

О. Л. Kholodkova, Ye. O. Maznichenko, N. V. Neskoromna, D. M. Gorchag, O. M. Yuzvak
THE EFFECTIVENESS OF THE HEPATIC CIRRHOSIS THERAPY BY PLATELET-RICH PLASMA
UNDER EXPERIMENT

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Introduction. Cirrhosis is a chronic liver disease characterized by diffuse changes in its parenchyma in form of hepatocellular fibrosis, leading to the development of portal hypertension and liver failure. Platelet-rich plasma (PRP) is the platelet concentrate in a small volume of plasma where content of cytokines and regulatory proteins is significantly increased.

The aim of research. The research was devoted to evaluate the effectiveness of platelet-rich plasma in experimental therapy of liver cirrhosis in rats.

Methods. To create the model of cirrhosis the rat males got the motor and olive oil at a concentration of 50% at a dose of 0.4 ml into the stomach every 3rd day during 16 weeks, and drunk water solution of ethanol at a concentration of 10% ad libidum. To obtain PRP from the whole blood the unit SmartPrep (Harvester Corp., USA) was used. The animals got 2 injections of PRP with an interval of 2 weeks.

Results and discussion. Double administration of PRP in liver tissue in case of cirrhosis, reduces the amount of connective tissue and the number of collagen fibers at the place of necrosis due to hepatic cirrhosis; an active regeneration of liver tissue microstructure with restoration of its microstructure exists. A number of PAS-positive substances was highly increased in comparison with the group without correction. The results, probably, were obtained due to the action of cytokines such as endothelial growth factor, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor etc., which are released from platelets when administered to the organ. In the animals without treatment the active process of outgrowing of connective tissue was found.

Conclusions. The effectiveness of PRP treatment of hepatic cirrhosis in rats is high. No adverse reactions were observed. PRP is a mixture of autologous cells, it is physiological to the body, and does not require immunosuppression and special conditions for treatment as it usually happens in the transplantation of heterogeneous material.

Key words: cirrhosis, platelet-rich plasma, experiment.

Робота виконана в рамках НДР кафедри анатомії людини Одеського національного медичного університету: «Біологічні ефекти збагаченої тромбоцитами плазми за фізіологічних умов та при експериментально індукованих патологічних процесах» (№ державної реєстрації 0107U008259).

Цирроз є хронічним захворюванням печінки, що характеризується дифузними змінами структури її паренхіми у вигляді гепатоцелюлярного фіброзу, який у термінальній стадії призводить до розвитку портальної гіпертензії та пе-

чінкової недостатності [1; 2]. У багатьох випадках цирозу печінки передує фіброз [2; 3].

Розробка патогенетично обґрунтованих методів лікування цирозу печінки потребує з'ясування регуляції основних механізмів фіброгенезу. Відомо, що у цей процес залучені цитокіни, інші розчинні регуляторні фактори та їх міжклітинні сигнальні шляхи [3; 4].

Перспективним методом відтворення структурної цілісності та функціональної активності органів, що уражені, вважають збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) [5–7].



Виходячи з наведеного, **метою** нашої роботи є дослідження ефективності використання ЗТП для відтворення тканини печінки при цирозі.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 80 статевозрілих самцях щурів лінії Wistar віком 4–5 міс., масою 230–280 г. Для моделювання цирозу печінки перорально вводили розчин моторного мастила й оливкової олії концентрацією 50 % у дозі 0,4 мл кожну третю добу протягом 16 тиж., для пиття пропонували водний розчин спирту етилового концентрацією 10 % за потреби [8].

Виділяли ЗТП із цільної крові на апараті SmartPrep (Harvester Corp., США), свідоцтво про держреєстрацію № 10179/2011 згідно з Наказом Держлікинспекції МОЗ України № 69 від 08 лютого 2011 р. Вводили ЗТП трансдермально внутрішньопечінково у праву гіпохондріальну ділянку двічі (інтервал 1 тиж.) у дозі 0,1 мл.

Тварин розподілили на три групи: I група — з модельованим цирозом печінки (20 тварин); II група — з модельованим цирозом печінки та подальшим введенням ЗТП (20 тварин); III група — з модельованим цирозом печінки та подальшим введенням фізіологічного розчину в ті ж самі терміни, що й ЗТП тваринам II групи (20 тварин); окрема група тварин слугувала інтактним контролем (20 тварин).

Початком експерименту вважали перший день після останньої ін'єкції. Проводили патоморфологічне дослідження печінки із забарвленням за стандартними методиками [9].

Виводили тварин з експерименту через 2 та 6 тиж. після останнього введення ЗТП або фізіологічного розчину у відповідних групах, вважаючи цей день нульовим днем експерименту.

Підготування тварин до експерименту, всі інвазивні втручання, знеболювання та виведення з експерименту проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст. 230 від 2006 р., зі змінами, внесеними відповідно до Закону № 1759–VI (1759–17) від 15.12.2009 р.

Результати дослідження та їх обговорення

У I групі тварин через 2 тиж. від початку експерименту розміри печінки достовірно зменшуються порівняно з контролем.

Спостерігаються розширення та фіброз портальних трактів з помірно лімфогістіоцитарною інфільтрацією. Виявляється порушення часточкової структури печінки з початковим формуванням хибних часточок. Гепатоцити нерівномірно зменшені у розмірах, набряклі, з мутною цитоплазмою. З'являються осередки скупчень гепатоцитів без ядер з вакуолями у цитоплазмі.

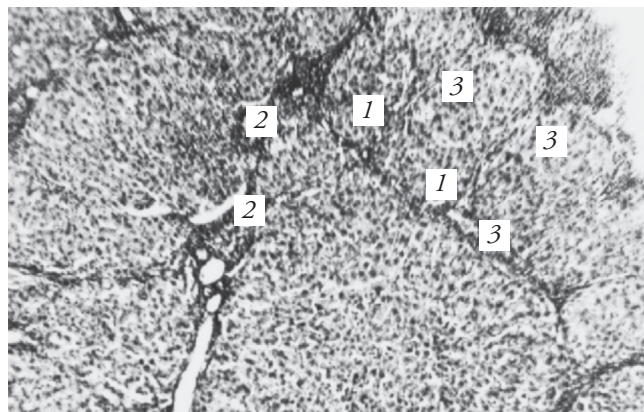


Рис. 1. Печінка тварини з модельованим цирозом: виражений ступінь фіброзування, утворення хибних часточок, повнокров'я синусоїди, венозне повнокров'я, лімфогістіоцитарна інфільтрація, осередки некрозу, потовщення стінок судин, розширення портальних трактів: 1 — сполучнотканинні тяжі; 2 — склерозування судинних стінок; 3 — хибні часточки. Забарвлення гематоксилін-еозином, зб. $\times 100$

Через 6 тиж. від початку експерименту розміри печінки зменшені, паренхіма коричневого кольору, щільна, з дрібновузликовою структурою. Спостерігаються розширення та фіброз портальних трактів з лімфогістіоцитарною інфільтрацією (рис. 1). Виявляється порушення часточкової структури за рахунок розростання тяжів волокнистої сполучної тканини з формуванням хибних часточок. З'являються фокуси централобулярних некрозів, набряк і нерівномірне забарвлення гепатоцитів, осередки дрібно- та великокрапельної жирової дистрофії гепатоцитів. Вміст ШИК-позитивних речовин знижений.

У II групі тварин через 2 тиж. від початку експерименту розміри печінки помірно зменшені порівняно з контрольною групою. Спостерігається помірне розширення портальних трактів із фокусами лімфогістіоцитарної інфільтрації, проліферацією судин, дрібних капілярів, гістіоцитів. подекуди виявляється руйнація часточкової будови з тенденцією до формування хибних часточок. Гепатоцити мають ознаки дистрофії: набряклі, цитоплазма забарвлена нерівномірно, групи гепатоцитів з дрібними «оптично спустошеними» вакуолями у цитоплазмі.

Через 6 тиж. від початку експерименту відбувається нормалізація розмірів печінки. Спостерігається помірне розширення портальних трактів з фокусами лімфогістіоцитарної інфільтрації та проліферацією капілярів мікроциркуляторного русла (рис. 2). Структура часточок збережена. Виявляються осередки двоядерних гепатоцитів, їх кількість зростає як порівняно з I групою, так і з контролем. У центрі часточок спостерігається помірний периваскулярний фіброз. Гепатоцити з нерівномірним забарвленням цитоплазми, групи клітин — з ознака-

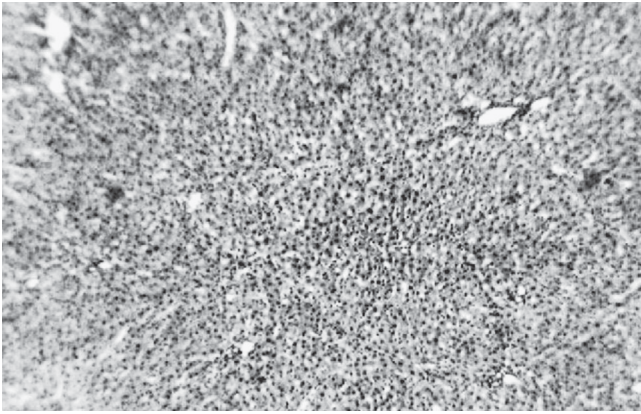


Рис. 2. Печінка тварини з модельованим цирозом через 6 тиж. після введення збагаченої тромбоцитами плазми: збереження часточкової структури, поодинокі осередки дрібнокрапельної жирової дистрофії, повнокров'я судин і виражена васкуляризація паренхіми органа. Забарвлення гематоксилін-еозином, зб. $\times 100$

ми дрібнокрапельної жирової дистрофії. Підвищується вміст ШИК-позитивних речовин порівняно з I групою у цей самий термін спостереження.

У III групі тварин через 2 тиж. від початку експерименту розміри печінки достовірно зменшені порівняно з групою контролю. Паренхіма органа зазнала вузликової трансформації. Виявляються гепатоцити з тіннями ядер. Спостерігаються зони некрозу, вакуольної дистрофії, порушення цілісності ядерної та цитоплазматичної мембран, розростання сполучної тканини з високим вмістом гістіоцитів і лімфоцитів. Вміст ШИК-позитивних речовин різко знижений.

Через 6 тиж. від початку експерименту розміри печінки залишаються майже на рівні попереднього терміну. Спостерігаються вузликова трансформація, осередки некрозу, виражені сполучнотканинні тяжі.

Порівняння результатів патоморфологічного дослідження печінки тварин на тлі експериментального цирозу без лікування та після введення ЗТП показало, що застосування ЗТП сприяє активній регенерації тканини печінки. Через 6 тиж. після останнього введення ЗТП у структурі органа спостерігаються ознаки активної регенерації печінки: нормалізуються розміри органа, відтворюється часточкова організація, виявляються скупчення двоядерних гепатоцитів і велика кількість новоутворених судин, зростає вміст ШИК-позитивних речовин. Ці результати лікування експериментального цирозу отримані, імовірно, внаслідок впливу підвищеної концентрації цитокінів, які вивільнилися із ЗТП і сприяли клітинному росту та диференціюванню, утворенню та росту судин, синтезу колагену, проліферації фібробластів, тобто процесам неоангіогенезу та регенерації тканини печінки після ураження. Той факт, що

тромбоцити індукують міграцію й адгезію стовбурових і прогеніторних клітин у ділянки ангіогенезу [10], може пояснити стимулювання проліферації та диференціації клітин у зрілі ендотеліальні попередники.

Слід зазначити, що у групі тварин без лікування відбувалося стійке прогресування ознак фіброзно-некротичних змін.

Висновки

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити висновок про те, що застосування ЗТП сприяє зниженню об'єму сполучної тканини та кількості колагенових волокон у місцях загибелі гепатоцитів унаслідок цирозу; введення ЗТП сприяє активній регенерації тканини печінки з відтворенням її мікроструктури. Важливим є також те, що ЗТП є сумішшю аутологічних клітин, цілком фізіологічних для організму, і не потребує імуносупресії та створення особливих умов для лікування, як це зазвичай відбувається при трансплантації гетерогенного матеріалу.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати необхідно доповнити вивченням функціональної активності печінки з дослідженням біохімічних показників крові, а також дослідити протікання процесу регенерації протягом тривалого терміну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Anand B. Cirrhosis / B. Anand, M. L. Melcher, A. M. Schleyer. – Elsevier BV, 2012. – 418 p.
2. Henderson N. C. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith / N. C. Henderson, S. J. Forbes // *Toxicology*. – 2008. – Vol. 30, N 254 (3). – P. 130–135.
3. Friedman S. I. Hepatic fibrosis — overview / S. I. Friedman // *Toxicology*. – 2008. – Vol. 30, N 254 (3). – P. 120–129.
4. Saile B. Inflammation, damage repair and liver fibrosis — role of cytokines and different cell types / B. Saile, G. Ramadori // *Zeitschrift für Gastroenterologie*. – 2007. – Vol. 45 (1). – P. 77–86.
5. Відтворення репродуктивної функції самців мишей під впливом збагаченої тромбоцитами плазми / В. М. Запорожан, О. Л. Холодкова, О. О. Аппельханс [та ін.] // *Вісник морфології*. – 2012. – Т. 18, № 2. – С. 271–275.
6. Andia I. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies / I. Andia, M. Sanchez, N. Maffulli // *Expert Opinions on Biology and Therapy*. – 2010. – Vol. 10, N 10. – P. 1415–1426.
7. Zhao Y. Research progress of platelet-rich plasma in promoting bone regeneration and repairing / Y. Zhao, W. Zhai // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. – 2010. – Vol. 24, N 8. – P. 1004–1008.
8. Карташова О. Н. Симуляция патологического процесса в печени / О. Н. Карташова, А. И. Блюгер. – Рига : Звайгне, 1975. – 140 с.
9. Артишевский А. А. Гистология с техникой гистологических исследований / А. А. Артишевский, А. С. Леонтьук, Б. А. Слук. – Минск : Вышейшая школа, 1999. – 236 с.
10. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells / E. Lucarelli, A. Beccheroni, D. Donati [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 3095–3100.



REFERENCES

1. Anand B., Melcher M.L., Schleyer A.M. Cirrhosis. *El-sevier BV*, 2012. 418 p.
2. Henderson N.C., Forbes S.J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology* 2008; 30, 254 (3): 130-135.
3. Friedman S.I. Hepatic fibrosis — overview. *Toxicology* 2008; 30, 254 (3): 120-129.
4. Saile B., Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis — role of cytokines and different cell types. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2007; 45 (1): 77-86.
5. Zaporozhan V.M., Kholodkova O.L., Appelhans O.O., Grigorian S.E., Silecka E.K. *Vidtvorennaya reproductivnoi funkcii samciv mishei pid vplivom zbagachenoj trombotsitami plasmii* [Reproductive function of micemales restoration under platelet-rich plasma influence] *Visnik morfologii* 2012; 18, 2: 271-275.
6. Andia I., Sanchez M., Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opinions on Biology and Therapy* 2010; 10, 10: 1415-1426.
7. Zhao Y., Zhai W. Research progress of platelet-rich plasma in promoting bone regeneration and repairing. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2010; 24, 8: 1004-1008.
8. Kartashova O.N., Blyuger A.I. *Simulyatsia patologicheskogo processa v pecheni* [Pathological process in liver simulation]. Riga, Zvaigne, 1975. 140 p.
9. Artishevsky A.A., Leontiuk A.C., Sluka B.A. *Histologia s tehnikoi histologicheskikh issledovaniy* [Histology with histological researches techniques]. Minsk, Visheishaya shkola, 1999. 236 p.
10. Lucarelli E., Beccheroni A., Donati D. et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24: 3095-3100.

Надійшла 12.11.2014

Передплачуйте
і читайте



ОДЕСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ ЖУРНАЛ

Передплата приймається у будь-якому
передплатному пункті

Передплатний індекс 48717

У випусках журналу:

- ◆ Теорія і експеримент
- ◆ Клінічна практика
- ◆ Профілактика, реабілітація, валеологія
- ◆ Новітні технології
- ◆ Огляди, рецензії, дискусії

