

## Влияние криоконсервированных клеток эмбриональной печени на восстановительные процессы при экспериментальном циррозе печени

О.В. ОЧЕНАШКО, Н.А. ВОЛКОВА, А.Ю. ПЕТРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков*

## Effect of Cryopreserved Embryonic Liver Cells on Recovering Processes at Experimental Liver Cirrhosis

OCHENASHKO O.V., VOLKOVA N.A., PETRENKO A.YU.

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov*

В последнее время среди патологий печени человека лидируют диффузные хронические поражения этого органа, причиной возникновения которых являются токсические вещества или вирусные инфекции [2], причем современная терапия таких заболеваний нуждается в совершенствовании. Один из нестандартных подходов в лечении хронических диффузных заболеваний печени – регенерационная терапия, в основе которой лежит стимуляция восстановительной способности печени [1]. В этом отношении представлялось перспективным использование суспензии эмбриональной печени, содержащей, кроме клеточных элементов, эмбриоспецифические белки, ростовые факторы и цитокины [6, 10], способные усиливать регенерацию гомологичного органа, вовлеченного в патологический процесс.

Моделирование патологии, по многим показателям сходной с клиническими формами хронических гепатитов и циррозов печени у людей, возможно путем длительного введения малых доз четыреххлористого углерода [8]. Цель работы – изучить влияние криоконсервированных клеток эмбриональной печени (ККЭП) на восстановительные процессы у крыс с экспериментальным циррозом печени.

Работа выполнена на 56 белых крысах-самцах массой 180-200 г, у которых формировали цирроз печени введением  $CCl_4$  [5]. Суспензию ККЭП человека [4] перед началом эксперимента отогревали при  $37^\circ C$  на водяной бане и вводили в пулпу селезенки животных ( $10^7$  клеток/0,3 мл) через 10 сут после завершения курса инъекций  $CCl_4$ . Крысам контрольной группы в пулпу селезенки вводили равный объем среды криоконсервирования.

Об активности восстановительных процессов судили по структурному состоянию печени и биохимическим показателям крови через 14 сут после введения ККЭП. Гистологическое исследование ткани печени проводили на парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. В сыворотке крови уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по содержанию ТБК-активных продуктов [4], функции печени – по содержанию билирубина и альбумина, используя стандартные наборы “Вектор-бест” и “Sigma” соответственно.

Морфологическую оценку сформированной экспериментальной модели патологически измененной печени проводили через 10 сут после окончания введения  $CCl_4$ , так как на этом сроке созревает соединительная ткань и стихают острые воспалительные процессы в пораженном органе [7]. На гистологических срезах фиксирован-

Recently among human liver pathologies the most widespread ones are diffuse chronic damages of this organ, caused by toxic substances and viral infections [2], and current therapy for such diseases needs an improvement. One of non-traditional approaches when treating chronic diffuse liver diseases is regeneration therapy, based on the stimulation of recovering liver capability [1]. In this respect it seemed to be perspective to use the embryonic liver suspension, containing besides cellular elements embryo-specific proteins, growth factors and cytokines [6, 10], capable of intensifying the regeneration of homologous organ, involved into a pathological process.

Modeling the pathology, which is generally similar to clinical forms of chronic hepatitis and liver cirrhosis in human-beings, is possible by means of usage of long-term injection of low  $CCl_4$  doses. [8]. The aim of this work was studying the effect of cryopreserved embryonic liver cells (CELCs) on recovering processes in rats with experimental liver cirrhosis.

The work was accomplished in 56 white rat males of 180-200g, in those by injecting  $CCl_4$  an induced liver cirrhosis was formed [5]. Suspension of human CELC [4] was thawed under the temperature of  $37^\circ C$  in water bath before starting the experiment and injected into a spleen pulp of animals ( $10^7$  cells/0.3ml) in 10 days after finishing the course of  $CCl_4$  injections. The rats of control group into a spleen pulp were injected with an equal volume of cryopreservation medium.

The activity of recovering processes was estimated on a structural liver state and biochemical blood indices in 14 days after the CELCs injection. Histological investigations of liver tissue were accomplished in paraffin sections, stained by hematoxylin and eosin. In blood serum the level of lipid peroxidation (LPO) was estimated on the content of TBC-active products [4], liver functions – on bilirubin and albumin content, using standard “Vector-best” and “Sigma” sets, correspondingly.

Morphological estimation of formed experimental model for pathologically changed liver was performed in 10 days after  $CCl_4$  injection, because at this term connective tissue was getting mature and acute inflammatory processes diminished in a damaged organ [7]. In histological sections of the fixed liver there were observed manifested changes of organ architecture, manifested in a failure of the trabecular structure of liver lobuli, fibrosis and a nodular parenchyma rearrangement. Hepatocytes, forming the lobuli, demonstrated manifested destructive-dystrophic

ной печени наблюдались выраженные изменения архитектуры органа, проявившиеся в виде нарушения трабекулярного строения печеночных долек, фиброза и узловой перестройки паренхимы. Гепатоциты, формирующие дольки, демонстрировали выраженные деструктивно-дистрофические изменения. Таким образом, морфологическая картина изменений, развившихся в результате длительного введения  $CCl_4$ , позволила охарактеризовать полученную модель патологически измененной печени как экспериментальный цирроз.

Исследование гистологических срезов печени животных, которым вводили среду криоконсервирования, не обнаружило выраженных изменений в картине имевшегося  $CCl_4$ -индуцированного цирроза.

Анализ состояния печени крыс, которым вводили ККЭП, показал, что наряду с сохраняющимися деструктивно-дистрофическими изменениями, характеризующими цирротически измененную печень, обнаруживались морфологические проявления, указывающие на активацию репаративного процесса в органе: количество двуядерных клеток было увеличено по сравнению с контролем, встречались участки паренхимы, сформированные из молодых гепатоцитов со светлой цитоплазмой и увеличенными ядрами, содержащими хроматин и ядрышки.

Известно, что деструктивно-дистрофические изменения в печени, вызываемые длительным введением  $CCl_4$ , сопровождаются значительным изменением биохимических показателей крови [9]. Как видно из таблицы, в плазме крови контрольной группы животных было отмечено: увеличение содержания ТБК-активных продуктов ПОЛ на - 50% , билирубина на - 62%, а содержание альбумина было снижено на 40% ( $p < 0.05$ ). Приведенные данные свидетельствуют о значительном нарушении гомеостаза животных контрольной группы. Введение ККЭП способствовало нормализации уровня ПОЛ и билирубина в плазме крови, однако достоверного восстановления уровня альбумина до нормальных значений не происходило, что, вероятно, связано с малым сроком наблюдения. Можно полагать, что нормализация отдельных биохимических показателей крови взаимосвязана с активацией регенераторно-гиперпластических процессов в патологически измененной печени.

Таким образом, введение ККЭП животным с экспериментальным циррозом вызывает активацию репаративного процесса в патологически измененном органе и способствует нормализации биохимических параметров крови. Обнаруженное положительное действие суспензии ККЭП на организм животных с циррозом печени, вероятно, обусловлено привнесением извне комплекса цитокинов, ростовых факторов и стадийспецифических белков, способных активировать восстановительные процессы.

Биохимические показатели плазмы крови крыс с экспериментальным циррозом печени после введения ККЭП (M=m, n=5-8)  
Biochemical indices of blood plasm in rats with experimental liver cirrhosis after CELC introduction (M=m, n=5-8)

Показатель Index	Норма Norm	Цирроз печени Liver cirrhosis	
		Контроль Control	+ ККЭП + CELC
Билирубин, мкмоль/л Bilirubin, $\mu M/l$	7.9 $\pm$ 0.3	12.83 $\pm$ 0.7 <sup>1</sup>	9.5 $\pm$ 0.7 <sup>2</sup>
Альбумин, г/л Albumin, g/l	39.0 $\pm$ 2.1	23.8 $\pm$ 2.9 <sup>1</sup>	27.0 $\pm$ 2.7 <sup>1</sup>
ТБК-активные продукты, нмоль/мл TBA-active products, $\mu M/l$	4.5 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 0.2 <sup>1</sup>	5.1 $\pm$ 0.3 <sup>2</sup>

**Примечания:**

- <sup>1</sup> - по сравнению с показателем нормы ( $p < 0.05$ );
- <sup>2</sup> - по сравнению с показателем контроля ( $p < 0.05$ ).

**Notes:**

- <sup>1</sup> - comparing to norm index ( $p < 0.05$ );
- <sup>2</sup> - comparing to the control index ( $p < 0.05$ ).

changes. Thus, morphological changes, developed as a result of long-term  $CCl_4$  injection, allowed to characterise the obtained model of pathologically changed liver as experimental cirrhosis.

Studying of histological sections of animals' liver, which were injected with the cryopreservation medium, revealed no manifested changes in the course of  $CCl_4$  induced cirrhosis.

Analysis of rat liver state, being injected with CELC, has demonstrated that together with remaining destructive dystrophic changes, characterising cirrhotically changed liver, there were found morphological manifestations, testifying to the reparative process' activation in an organ: the amount of binuclear cells was increased comparing to the control, there were observed parenchyma sites, being formed of young hepatocytes with a light cytoplasm and increased nuclei, containing chromatin and nucleoli.

It is known that destructive dystrophic changes in a liver, caused by long-term  $CCl_4$  injection, are accompanied with a significant change in the biochemical blood indices [9]. As the table shows, in blood plasm of the control animals' group there was noted the 50% augmentation of the content of TBC-active LPO products, bilirubin increased by 62%, and the albumin amount was reduced by 40%.

These data testify to a considerable impairment in the animals' homeostasis of the control group. CELC injection promoted to the normalisation of the level of LPO and bilirubin in blood plasm, however no statistically significant recovery of the albumin level up to normal values occurred, that, obviously, is related to a short term of observation. It can be supposed that normalisation of some biochemical blood indices is in a tight relationship with the activation of regenerative hyperplastic processes in pathologically changed liver.

Thus, CELC injection to animals with experimental cirrhosis causes an activation of reparative process in a pathologically changed organ and promotes to the normalisation of biochemical blood parameters. The revealed positive effect of CELC suspension on an animals' organism with liver cirrhosis, is probably, stipulated by the introducing of the complex of cytokines, growth factors and stage-specific proteins, capable of the recovery processes' activation.

## Литература

1. Караюлян С.Р., Сванидзе Н.Л. Усиление регенерации при обширных поражениях печени // Хирургия. – 1985. – №2. – С. 139-143.
2. Логинов А.С., Блок Ю.Е. Хронические гепатиты и циррозы печени. – М.: Медицина, 1987. – 273 с.
3. Низкие температуры при лечении хронических диффузных заболеваний печени / Б.П. Сандомирский, Н.С. Сигал, Н.В. Дубровский. – Киев: Наук. думка, 1992. – 136 с.
4. Петренко А.Ю., Оченашко О.В. Влияние препаратов эмбриональных тканей человека на интенсивность перекисного окисления липидов при остром токсическом гепатите у крыс // Пробл. криобиологии. – 2001. – №2. – С. 66-71.
5. Рубецкой А.С., Короткина Р.Н. Методика создания экспериментального цирроза у кроликов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1960. – Т.6, №2. – С. 122-124.
6. Рябчиков О.П., Кузнецова Л.В., Назимова С.В. и др. Гормональный и клеточный состав препаратов фетальных тканей человека // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1998. – Т.126, прил.1. – С. 156-157.
7. Сигал Н.С. Деструктивно-восстановительные процессы после криовоздействий на патологически измененную печень: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Харьков, 1989. – 16 с.
8. Солопаева И.М., Косых А.А., Жданова Т.Ф. и др. Сравнение хронической патологии печени в эксперименте и клинике / Биологическая характеристика лабораторных животных и экстраполяция на человека экспериментальных данных. – М., 1980. – С. 276-277.
9. Cremones R.V., Pereira-Filho A.A., Magalhaes R. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation // Arg. Gastroenterol. – 2001. – Vol.38, №1. – P. 40-47.
10. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // Eur. Cytokine Netw. – 2001. – Vol.12, №2. – P. 274-279.

Поступило 15.10.2002

УДК 615.832.9:617:616-001/19:612.135:611.36+616.36-004

UDC 615.832.9:617:616-001/19:612.135:611.36+616.36-004

## Реакции микрогемодикуляции печени на низкотемпературное воздействие

И.В. СЛЕТА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Responses of Liver Microhaemocirculation on Low-Temperature Effect

СЛЕТА I.V.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Применение в гепатологии криохирургических методов потребовало серьезных экспериментальных исследований низкотемпературного повреждения печени [1,4,5]. Одной из первичных и основных “мишеней” для реализации низкотемпературного воздействия на ткань является микрогемодикуляторное русло [3]. Цель работы - определение закономерностей формирования ответных реакций микрогемодикуляции печени при локальном криовоздействии.

Исследования проведены на 75 крысах-самцах линии Вистар. Основным методом изучения микрогемодикуляции была витальная микроскопия с помощью контактного микроскопа Люмам К-1 [2]. Транспорт

## References

1. Karagyulyan S.P., Swanidze N.P. Regeneration potentiation at extensive injuries of liver // Khirurgiya. – 1985. – N2. – P. 139-143.
2. Loginov A.S., Blok Yu. Ye. Chronic liver hepatitis and cirrhoses. – M.: Meditsina, 1987. – 273 p.
3. Low temperatures in treating of chronic diffuse diseases of liver / Sandomirsky B.P., Sigal N.S., Dubrovskiy N.V. – Kiev: Naukova dumka, 1992. – 136 p.
4. Petrenko A. Yu., Ochenashko O.V. Influence of human embryonic tissue preparations on lipids peroxidation intensity in rats acute toxic hepatitis // Probl. of Cryobiology. – 2001. – N2. – P. 66-71.
5. Rubetskoj A.S., Korotkina R.N. Method of obtaining of experimental cirrhosis in rabbits // Byul. Eksperim. Biol. i Med. – 1960. – V.6, N2. – P. 122-124.
6. Ryabchikov O.P., Kuznetsova L.V. et al. Hormonal and cellular composition of human fetal tissues preparations // Byul. Eksperim. Biol. i Med. – 1998. – V.126, Suppl.1. – P. 156-157.
7. Sigal N.S. Destruction and reparation processes after cryoeffect on pathologically changed liver: Author's thesis for obtaining the candiditates degree (biology). – Kharkov, 1989. – 16 p.
8. Solopayeva I.M. Kosykh A.A., Zhdanova T.F. et al. Comparing of liver chronic pathologies in experiment and in clinics / Biological characteristic of laboratory animals and extrapolation of experimental data for human. – Moscow, 1980. – P. 276-277.
9. Cremones R.V., Pereira-Filho A.A., Magalhaes R. et al. Experimental cirrhosis induced by carbon tetrachloride inhalation: adaptation of the technique and evaluation of lipid peroxidation // Arg. Gastroenterol. – 2001. – Vol.38, №1. – P. 40-47.
10. Sennikov S.V., Krysov S.V., Injelevskaya T.V. Production of cytokines by immature erythroid cells derived from human embryonic liver // Eur. Cytokine Netw. – 2001. – Vol.12, №2. – P. 274-279.

Accepted in 15.10.2002