DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-91-98

ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ: КОРРЕКЦИЯ КСЕНОГЕННЫМИ И АЛЛОГЕННЫМИ ГЕПАТОЦИТАМИ

А.И. Конопля, Е.С. Литвинова, Н.А. Быстрова, М.С. Разумова, Т.В. Чуева

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Курск, Российская Федерация

Цель – изучение корригирующих эффектов аллогенных и ксеногенных гепатоцитов на метаболические нарушения в условиях острого токсического поражения печени. **Материал и методы.** Исследования проведены на 75 половозрелых крысах-самцах Вистар массой 120–160 г, 15 крысах и 25 мышах на 5–6-й день после рождения. Острое токсическое поражение печени (ОТПП) моделировали путем внутримышечного введения четыреххлористого углерода в дозе 3 мл/кг в виде 50% раствора в оливковом масле пятикратно с интервалом 24 ч. Выделение ксеногенных (мышиных) и аллогенных гепатоцитов от новорожденных животных производилось по методике M.N. Berry, D.S. Friend. Суспензию клеток готовили ежедневно и вводили в концентрации 2×10^6/кг реципиентам с ОТПП внутрибрюшинно, пятикратно, через 24 ч, одновременно с первой инъекцией гепатотропного яда. **Результаты.** Интоксикация четыреххлористым углеродом вызывает развитие биохимических синдромов поражения печени, активацию функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови и свободно-радикального окисления, нарушает внутриэритроцитарный метаболизм. Введение аллогенных гепатоцитов реципиентам с токсической гепатопатией более эффективно по сравнению с ксеногенными гепатоцитами, корригирует системные и локальные метаболические нарушения, возникающие вследствие воздействия гепатотропного яда. **Заключение.** Трансплантация ксеногенных гепатоцитов, в большей степени аллогенных, в условиях ОТПП является эффективным средством по восстановлению функционально-метаболической активности гепатоцитов, нейтрофилов и эритроцитов.

Ключевые слова: трансплантация ксено- и аллогенных гепатоцитов, острое токсическое поражение печени, коррекция метаболических нарушений.

IMMUNE AND METABOLIC DISTURBANCES IN EXPERIMENTAL ACUTE TOXIC HEPATITIS: CORRECTION BY XENOGENIC AND ALLOGENIC HEPATOCYTES

A.I. Konoplya, E.S. Litvinova, N.A. Bystrova, M.S. Razumova, T.V. Chuyeva

Kursk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Kursk, Russian Federation

Aim. To study the corrective effects of allogeneic and xenogeneic hepatocytes on metabolic disturbances in acute liver toxicity. **Material and methods.** Investigations were carried out on 75 adult male Wistar rats weighing 120–160 g, 15 rats and 25 mice on the 5–6th days after birth. Acute toxic hepatitis (ATH) was modeled by intramuscular injection of carbon tetrachloride at a dose of 3 ml / kg as a 50% solution in olive oil, five times at 24-hour intervals. Isolating xenogeneic (mouse) and allogeneic hepatocytes was performed by method of Berry M.N., Friend D.S. The cell suspension was prepared daily and administered at a concentration of 2×10^6/kg in recipients with ATH intraperitoneally, five times at 24-hour intervals, simultaneously with the first injection of hepatotropic poison. **Results.** Intoxication by carbon tetrachloride causes development of the biochemical syndromes of liver damage, activation of the functional metabolic activity of peripheral blood neutrophils and

Для корреспонденции: Конопля Александр Иванович. Адрес: 305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3. Тел.: раб. (4712) 58-81-76; моб. (910) 317-87-88. E-mail: konoplya51@mail.ru.

For correspondence: Konoplya Alexander Ivanovich. Address: 3, K. Marx St., Kursk, 305041, Russian Federation. Tel.: job. (4712) 58-81-76; mob. (910) 317-87-88. E-mail: konoplya51@mail.ru.

free-radical oxidation, breaks intraerythrocytic metabolism. The introduction of allogeneic hepatocytes in recipients with toxic hepatopathy is more efficiently compared with xenogeneic hepatocytes, it corrects local and systemic metabolic disturbances arising due to the impact of hepatotropic poison. **Conclusion.** Transplantation of xenogenic hepatocytes, and, to a greater extent, of allogenic hepatocytes in ATH conditions is an effective means to restore the functional metabolic activity of hepatocytes, neutrophils and erythrocytes.

Key words: transplantation of xenogeneic and allogeneic hepatocytes, acute toxic liver damage, correction of metabolic disorders.

ВВЕДЕНИЕ

Частота острых и хронических заболеваний печени в общей структуре болезней человека и смертность от этого вида патологии неуклонно растет даже в экономически развитых странах. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения острых и хронических заболеваний печени остаются одними из актуальных в медицине как ввиду сложности диагностики и выбора оптимальных эффективных методов лечения, так и вследствие тенденции к росту количества больных этими заболеваниями [1, 2].

К числу часто имеющих место патологий печени относятся ее острые токсические поражения, осложняющиеся развитием печеночной недостаточности при отравлении гепатотоксическими ядами, приеме больших доз анальгезирующих, противовоспалительных, антибактериальных, антиметаболических и других лекарственных препаратов. Неудовлетворительные результаты лечения острого токсического поражения печени (ОТПП) во многом связывают с отсутствием эффективной патогенетической терапии, в связи с чем перспективным направлением в лечении таких состояний является использование клеточных технологий [3, 4].

В настоящее время можно утверждать, что в повреждении и регенерации клеток печени различными этиологическими факторами большую роль играют оксидантные, иммунные нарушения и изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов, являющихся своего рода «клеточным дозиметром» действия патогенных факторов [5–7]. В литературе имеется большое количество работ, посвященных коррекции нарушений функции печени, в том числе с использованием клеточных технологий [8, 9], есть исследования по оксидантным, иммунным и эритроцитарным нарушениям и их коррекции при патологии печени [10, 11], но фактически отсутствуют работы в этом направлении по корригирующему влиянию трансплантации ксено- и аллогенных клеток.

Исходя из этого **целью исследования** стало изучение корригирующих эффектов аллогенных и ксеногенных гепатоцитов на метаболические нарушения в условиях острого токсического поражения печени.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на 75 крысах-самцах Вистар массой 120–160 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Кроме этого, было задействовано 40 доноров гепатоцитов через 5–6 дней после рождения, из них 15 крыс Вистар и 25 белых мышей. Все исследования проводили в одно и то же время суток, с 8 до 12 часов, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003).

ОТПП у лабораторных животных моделировали путем внутримышечного введения четыреххлористого углерода (ЧХУ) в дозе 3 мл/кг в виде 50% раствора в оливковом масле пятикратно с интервалом 24 ч [12].

Выделение ксеногенных (мышиных) и аллогенных гепатоцитов (КГ, АГ) от животных через 5–6 дней после рождения производилось по методике M.N. Berry, D.S. Friend [13], для чего после забора печени ее измельчали, гепатоциты из ткани извлекали выдавливанием с помощью стеклянного гомогенизатора в среде 199. Полученную клеточную взвесь дважды отмывали путем центрифугирования в течение 10 мин при 400 g, после чего разбавляли в среде 199, затем в камере Горяева подсчитывали количество клеток. Жизнеспособность клеток определяли в тесте с красителем – трипановым синим, при этом клеточные суспензии, содержащие менее 90% жизнеспособных клеток, не использовали. После отмывания в среде 199 и концентрации путем центрифугирования пул суспензии клеток от 3 крыс или 4–5 мышей в концентрации 2×10^6/кг сразу же вводили внутрибрюшинно, пятикратно, через 24 часа, с первой инъекцией гепатотропного яда крысам, в объеме 0,5 мл в среде 199. В течение всех манипуляций с клеточной взвесью температура использованной среды 199 составляла 36–37 °С. Гепатоциты реципиентов готовили ежедневно и вводили сразу же после приготовления в течение 5 суток донорам одновременно с ЧХУ в динамике развития ОТПП с целью оценки

гепатопротективного эффекта АГ и КГ в начальных «стрессовых» условиях для печени.

В три исследуемые группы включались по 20 животных, группа контроля включала 15 здоровых крыс того же возраста, пола и массы тела. Отравление гепатотропным ядом в используемых дозах и кратности введения, по данным литературы и в наших опытах, не приводило к гибели в течение эксперимента, животные выводились из опыта через 24 часа после последнего введения ЧХУ, АГ или КГ.

Для оценки функции печени в плазме крови определяли активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АСТ, АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутаминтранспептидазы (ГГТ), содержание билирубина (БР), фибриногена (ФГ), протромбиновый индекс (ПТИ) и тимоловую пробу (ТП). Величины всех перечисленных показателей определяли унифицированными методами с использованием стандартных наборов реактивов. Активность печеночных ферментов оценивали на автоматическом биохимическом анализаторе Vitalab Flexor E (Нидерланды) реагентами Analyticon® Biotechnologies AG (Германия). Содержание фибриногена определяли на полуавтоматическом анализаторе показателей гемостаза STart4 (Франция), реагентами Diagnostica Stago (Франция).

Подсчет общего количества эритроцитов и содержания гемоглобина проводили по общепринятым методикам. Для получения эритроцитов из гепаринизированной крови цельную кровь отстаивали дважды в 10 мМ Na-фосфатном буфере (pH = 7,4), содержащем 0,9% хлорида натрия и 3% декстрана Т-500, в течение 30 минут при температуре 37 °С. После этого кровь центрифугировали, удаляли надосадочную жидкость аспирацией. Эритроцитарную массу подвергали дополнительной очистке на хроматографической колонке через HBS-целлюлозу. В целях определения общей сорбционной способности эритроцитов (ССЭ), обусловленной наружной архитектоникой клеточной мембраны, по отношению к витальным красителям, 1 мл суспензии эритроцитов смешивали в пробирке с 3 мл 0,025% раствора метиленового синего, инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали в течение 10 мин при 800 g. При длине волны 630 нм определяли оптическую плотность при помощи спектрофотометра PD 303 S Apel (Япония) исходного раствора и надосадочной жидкости в единицах экстинкции по отношению к изотоническому раствору натрия хлорида. Количество поглощенного красителя выражали в процентах по формуле (1):

$$ССЭ = 100 – 100\ C_2 / C_1, \qquad (1)$$

где ССЭ – сорбционная способность эритроцитов в % поглощенного красителя; C_1 – оптическая плотность раствора до инкубации с эритроцитами в ед. экстинкции; C_2 – оптическая плотность раствора после инкубации с эритроцитами, ед. экстинкции.

Для определения сорбционной емкости гликокаликса (СЕГ) 1 мл суспензии эритроцитов, содержащий 4×10^7 клеток, смешивали с равным объемом изотонического раствора натрия хлорида, содержащего 0,005% альцианового синего, инкубировали 10 мин при температуре 21 °С и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. При длине волны 617 нм, используя в качестве контроля изотонический раствор натрия хлорида, измеряли концентрацию красителя в надосадочной жидкости. Количество поглощенного альцианового синего рассчитывали в граммах на 1 эритроцит.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали спектрофотометрически при помощи спектрофотометра PD 303 S Apel (Япония) по содержанию в плазме крови и эритроцитах продуктов деградации полиненасыщенных жирных кислот – производных тиобарбитуровой кислоты (малоновый диальдегид – МДА и ацилгидроперекиси – АГП). Для оценки состояния антиоксидантной системы определяли активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы методом прямого/конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа с применением готовых коммерческих наборов. Общую антиокислительную активность (ОАА), определяли методом, основанным на степени ингибирования аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до МДА. Уровень Total NO выявляли с использованием двух аналитических операций: измерение эндогенного нитрита и превращение нитрата в нитрит с использованием нитрит-редуктазы с последующим измерением общего нитрита по абсорбции азокрасителя в реакции Грисса при длине волны 540 нм с применением коммерческого набора для твердофазного ИФА фирмы «R&D» (Англия). Регистрация всех результатов иммуноферментного анализа осуществлялась при помощи автоматического ридера для ИФА Эфос 9305 (Россия).

Фагоцитарную активность полиморфно-ядерных лейкоцитов крови оценивали по общепринятой методике, определяя фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарное число (ФЧ) и индекс активности фагоцитоза (ИАФ). Активность кислород-зависимых систем нейтрофилов оценивали спектрофотометрически при помощи спектрофотометра PD 303 S Apel (Япония) по реакции восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), спонтанного и стимулированного зимозаном (НСТ-ст. н/з), (НСТ-ст. о/з), с расчетом функционального резерва. Кроме этого, определяли функциональный резерв в ответ на опсонизированный зимозаном НСТ-тест (КАо), функ-

циональный резерв в ответ на неопсонизированный зимозаном НСТ-тест (Кан) и степень дискретности ответа на опсонизированный и неопсонизированный зимозаном НСТ-тест (КО) [14].

Статистическую обработку результатов исследования проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Существенность различий оценивали по U-критерию. Статистически значимыми считали различия с p = 0,05. Степень расстройств лабораторных показателей рассчитывали по формуле [15]:

$$\left(\frac{\text{показатель опытных животных}}{\text{показатель здоровых животных}} - 1\right) \times 100\%$$

Примечание: в интервале от 1 до 33% полученная величина соответствует первой степени лабораторных расстройств, от 34 до 66% – второй, более 66% – третьей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Интоксикация ЧХУ в течение 5 дней вызывает развитие основных биохимических синдромов поражения печени: цитолиза (увеличение активности АСТ, АЛТ, снижение коэффициента де Ритиса), внутрипеченочного и внепеченочного холестаза (повышение активности ЩФ и ГГТ), внутриклеточного холестаза с желтухой и токсическим поражением гепатоцитов (увеличение содержания БР, активности АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ, значения коэффициентов де Ритиса и ГГТ/АСТ становятся меньше 1), недостаточности синтетических процессов (снижение ПТИ и ФБ) и воспалительного синдрома (повышение ТП) (табл. 1).

Одновременное с ЧХУ введение КГ, по сравнению с только интоксикацией, корригирует в сторону показателей здоровых животных активность всех исследованных ферментов, соотношение ГГТ/АСТ, ТП, концентрацию БР и ФГ, не влияя на коэффициент де Ритиса и ПТИ. Более эффективным оказалось применение АГ, так как их введение, не влияя на коэффициент АСТ/АЛТ, нормализует соотношение ГГТ/АСТ и, в еще большей степени, по сравнению с КГ, корригирует в сторону нормы остальные исследованные биохимические параметры, характеризующие функционально-метаболическую активность гепатоцитов (табл. 1).

При оценке показателей метаболизма плазмы крови экспериментальных животных с ОТПП установлена активация процессов ПОЛ (повышен уровень МДА и АГП), снижены показатели антиоксидантной защиты (ОАА, активность СОД и Кат) и содержание $СМ_{NO}$. Введение КГ реципиентам с токсическим поражением печени нормализует ОАА, корригирует, но не до показателей контрольной группы, активность Кат, содержание продуктов ПОЛ, $СМ_{NO}$, не влияя на активность СОД. Применение АГ дополнительно нормализует активность Кат, корригирует в сторону значений контроля содержание МДА, АГП и активность СОД (табл. 2).

При оценке показателей метаболизма эритроцитов установлено, что введение гепатотоксического яда экспериментальным животным снижает их общее количество, содержание гемоглобина, повышает внутриэритроцитарные процессы ПОЛ (повыше-

Таблица 1

Влияние трансплантации ксено- и аллогенных гепатоцитов на функциональную активность печени (M ± m)

The effect of xenogeneic and allogeneic hepatocytes transplantation on the liver functional activity (M ± m)

Показатели	Ед. измерения	1	2	3	4
		Контроль	Отравление ЧХУ и введение гепатоцитов:		
			–	ксеногенных	аллогенных
АСТ	Е/л	29,2 ± 2,4	55,1 ± 4,2*1	48,1 ± 3,3*1, 2	40,6 ± 2,4*1–3
АЛТ	Е/л	22,4 ± 1,9	89,5 ± 5,1*1	76,1 ± 5,7*1, 2	65,4 ± 2,8*1–3
ЩФ	Е/л	231,5 ± 17,9	461,8 ± 34,2*1	294,8 ± 20,2*1, 2	285,6 ± 16,3*1, 2
Коэффициент де Ритиса, АСТ/АЛТ		1,3 ± 0,03	0,62 ± 0,05*1	0,63 ± 0,05*1	0,62 ± 0,06*1
ГГТ	Е/л	5,9 ± 0,2	19,6 ± 2,2*1	12,3 ± 1,6*1, 2	9,5 ± 0,6*1–3
ГГТ/АСТ		0,2 ± 0,01	0,36 ± 0,02*1	0,26 ± 0,02*1, 2	0,23 ± 0,03*2, 3
БР	мкмоль/л	5,4 ± 0,3	18,5 ± 1,2*1	13,8 ± 1,5*1, 2	9,5 ± 0,8*1–3
ПТИ	%	62,3 ± 3,8	46,8 ± 3,5*1	49,5 ± 1,5*1	55,4 ± 2,2*1–3
ФГ	г/л	4,1 ± 0,1	2,3 ± 0,03*1	3,0 ± 0,04*1, 2	3,4 ± 0,02*1–3
ТП	Ед. S-H	2,5 ± 0,04	4,3 ± 0,1*1	4,0 ± 0,02*1, 2	3,7 ± 0,03*1–3

Примечание. Здесь и далее в таблицах: звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических (p < 0,05); цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.

Таблица 2

Влияние трансплантации ксено- и аллогенных гепатоцитов на метаболические показатели плазмы крови при остром токсическом поражении печени (M ± m)

The effect of xenogeneic and allogeneic hepatocytes transplantation on plasma metabolic status in acute toxic liver injury (M ± m)

Показатели	Ед. измерения	1	2	3	4
		Контроль	Отравление ЧХУ и введение гепатоцитов:		
			–	ксеногенных	аллогенных
МДА	мкмоль/л	2,2 ± 0,04	5,8 ± 0,2*1	4,7 ± 0,3*1, 2	3,6 ± 0,3*1–3
АГП	усл. ед.	0,75 ± 0,04	2,1 ± 0,4*1	1,4 ± 0,03*1, 2	1,1 ± 0,04*1–3
ОАА	%	40,3 ± 1,1	33,0 ± 2,0*1	37,9 ± 2,2*2	43,6 ± 2,5*2, 3
СОД	усл. ед./мл	11,3 ± 0,6	8,4 ± 0,5*1	8,3 ± 0,6*1	9,6 ± 0,4*1–3
Кат	мкат/л	12,4 ± 0,5	9,2 ± 0,6*1	10,8 ± 0,6*1, 2	11,7 ± 0,8*2
$СМ_{NO}$	мкмоль/л	6,9 ± 0,2	2,9 ± 0,05*1	4,5 ± 0,1*1, 2	4,6 ± 0,2*1, 2

на концентрация МДА и АГП), снижает активность СОД и сорбционные показатели (СЕЭ и СЕГ). Введение КГ реципиентам с ОТПП нормализует общее количество эритроцитов, не влияет на сниженное содержание гемоглобина и корригирует остальные исследованные лабораторные параметры метаболизма эритроцитов в сторону показателей здоровых интактных животных, но не до значений нормы. Введение АГ дополнительно нормализует концентрацию МДА, не влияет на сниженное содержание гемоглобина и корригирует в сторону показателей интактных крыс активность СОД и сорбционные показатели эритроцитов (табл. 3).

У крыс с ОТПП выявлено повышение всех показателей фагоцитарной и кислородозависимой активности нейтрофилов периферической крови. Реципиентам с ОТПП трансплантация КГ нормализует кислородозависимую активность гранулоцитов в НСТ-сп., снижает не до уровня интактных крыс ФП, ИАФ, НСТ-ст. н/з, КАн, КАо, КО, но не влияет на ФЧ и НСТ-ст. о/з. В отличие от КГ введение отравленным реципиентам АГ оказывало максимально корригирующие эффекты на функционально-метаболическую активность нейтрофилов периферической крови, поскольку нормализовало кислородозависимую активность клеток в НСТ-тестах спонтанном и стимулированных опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, КО, в большей степени корригировало ФЧ, ИАФ, коэффициенты клеточной активности КАн и КАо (табл. 4).

При количественном сопоставлении числа нарушенных лабораторных показателей метаболизма крови при различных условиях опыта с делением глубины нарушений по степеням и количества нормализованных и скорригированных показателей при трансплантации КГ и АГ установлено, что при введении ЧХУ в течение 5 дней нарушенными из 32 исследованных лабораторных показателей оказались 100%, из которых соответственно выявлено I, II и III степени: 12,4% – 43,8 и 43,8% (табл. 5).

Введение КГ в течение периода интоксикации снижает их число до 23 (71,9%), со значительным уменьшением глубины нарушений: II (28,1%) и III степени (6,3%), которые требует обязательной фармакологической коррекции [15]. При этом нормализованы оказались 9,4%, скорригированы в сто-

Таблица 3

Влияние трансплантации ксено- и аллогенных гепатоцитов на метаболический статус эритроцитов при остром токсическом поражении печени (M ± m)

The effect of xenogeneic and allogeneic hepatocytes transplantation on red cell metabolic status in acute toxic liver injury (M ± m)

Показатели	Ед. измерения	1	2	3	4
		Контроль	Отравление ЧХУ и введение гепатоцитов:		
			–	ксеногенных	аллогенных
Количество эритроцитов	10^{12} /л	4,1 ± 0,07	3,3 ± 0,03*1	4,0 ± 0,4*2	4,2 ± 0,4*2
Hb	г/л	14,7 ± 0,4	13,7 ± 0,3*1	13,6 ± 0,3*1	13,7 ± 0,4*1
МДА	мкмоль/л	0,3 ± 0,02	0,63 ± 0,02*1	0,5 ± 0,02*1, 2	0,31 ± 0,05*2, 3
АГП	усл. ед.	0,12 ± 0,02	0,5 ± 0,02*1	0,3 ± 0,02*1, 2	0,31 ± 0,02*1, 2
СОД	усл. ед./мл	24,2 ± 1,5	9,1 ± 0,1*1	9,8 ± 0,4*1, 2	11,7 ± 0,5*1–3
СЕЭ	%	50,6 ± 1,6	28,8 ± 3,8*1	38,9 ± 1,1*1, 2	43,0 ± 3,0*1–3
СЕГ	10^{12} г/эр	2,9 ± 0,04	1,8 ± 0,05*1	2,2 ± 0,1*1, 2	2,5 ± 0,03*1–3

Таблица 4

Влияние трансплантации ксено- и аллогенных гепатоцитов на функционально-метаболическую активность нейтрофилов периферической крови при остром токсическом поражении печени (M ± m)

The effect of xenogeneic and allogeneic hepatocytes transplantation on peripheral blood neutrophil functional-metabolic activity in acute toxic liver injury (M ± m)

Показатели	Ед. измерения	1	2	3	4
		Контроль	Отравление ЧХУ и введение гепатоцитов:		
			–	Ксеногенных	Аллогенных
ФП	абс.	47,6 ± 1,0	75,5 ± 2,6*1	56,4 ± 2,7*1, 2	53,1 ± 2,1*1, 2
ФЧ	абс.	2,1 ± 0,1	2,8 ± 0,05*1	2,9 ± 0,06*1	2,4 ± 0,1 *1–3
ИАФ	–	1,0 ± 0,02	2,1 ± 0,05*1	1,6 ± 0,05*1, 2	1,3 ± 0,06*1–3
НСТ-сп.	mOD	0,8 ± 0,05	1,2 ± 0,03*1	0,74 ± 0,03*2	0,8 ± 0,06*2, 3
НСТ-ст. н/з	mOD	1,0 ± 0,05	1,4 ± 0,04*1	1,2 ± 0,02*1, 2	1,1 ± 0,05*2, 3
НСТ-ст. о/з	mOD	1,2 ± 0,06	1,6 ± 0,04*1	1,5 ± 0,06*1	1,3 ± 0,05*2, 3
КАн	–	1,1 ± 0,05	2,8 ± 0,1*1	2,5 ± 0,07*1, 2	1,3 ± 0,04*1–3
КАо	–	1,4 ± 0,06	2,3 ± 0,07*1	1,9 ± 0,2*1, 2	1,6 ± 0,05*1–3
КО	–	1,2 ± 0,05	2,4 ± 0,09*1	1,8 ± 0,09*1, 2	1,3 ± 0,07*2, 3

Таблица 5

Сравнительное влияние ксено- и аллогенных гепатоцитов на показатели метаболизма крови в условиях острого токсического поражения печени

The comparative impact of xenogeneic and allogeneic hepatocytes on blood metabolic status in acute toxic liver injury

Условия опыта	Измененные лабораторные показатели		Лабораторные показатели после введения гепатоцитов						Измененные лабораторные показатели по степени расстройств					
			Нормализованы		Скорригированы		Не изменились		I		II		III	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Отравление ЧХУ	32	100	–	–	–	–	–	–	4	12,4	14	43,8	14	43,8
Отравление ЧХУ и введение ксеногенных гепатоцитов	23	71,9	3	9,4	23	71,8	6	18,8	12	37,5	9	28,1	2	6,3
Отравление ЧХУ и введение аллогенных гепатоцитов	12	37,5	9	28,1	21	65,6	2	6,3	11	34,4	1	3,1	–	–

рону нормы 71,8%, остались на уровне отравленных ЧХУ животных 18,8% показателей. Применение АГ оказалось более эффективным, так как снизило количество измененных показателей до 12 (37,5%), по степеням I и II они составили соответственно 34,4 и 3,1%. Нормализованными оказались 28,1%, скорригированы в сторону нормы 65,6%, остались на уровне животных с ОТПП 6,3% показателей (табл. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным литературы и полученным нами результатам проведенной работы, можно резюмировать, что воздействие ЧХУ активирует систему нейтрофильного респираторного взрыва, приводит к сдвигу баланса про- и антиоксидантов в сторону ослабления последних, то есть к усилению процессов ПОЛ в клеточных мембранах, дестабилизируя их не только в гепатоцитах, но и в эритроцитах, при этом изменения их структурно-функциональных свойств направлены на уменьшение прочности и эластичности мембраны, снижение ее деформируемости, метаболической активности, текучести, сорбционной способности и изменение поляризуемости [6, 7, 10, 12, 16]. Трансплантация ксено- и особенно аллогенных гепатоцитов реципиентам с ОТПП ограничивает процессы свободнорадикального окисления на системном и локальном (эритроциты) уровне, системную воспалительную реакцию на уровне врожденных механизмов иммунитета, оказывает значительные положительные эффекты по восстановлению функциональной активности гепатоцитов и внутриэритроцитарного метаболизма.

Гепатоциты стали одним из первых типов клеток, использованных для клинических целей – клеточ-

ной терапии больных с врожденными и приобретенными дефектами печени. Интерес к ним с научной и практической стороны в настоящее время усилился в еще большей степени в связи с тем, что единственным способом лечения недостаточности печени, как исхода вирусных, аутоиммунных гепатитов, наследственных заболеваний и интоксикаций, является недостаток донорских органов [17, 18].

В настоящее время механизм действия гепатоцитов, применяемых для коррекции поврежденной ткани печени, нельзя считать окончательно выясненным. Ряд авторов полагают, что лечебный эффект связан с органозамещающей функцией [2]. Однако известно, что трансплантированные изолированные гепатоциты не столько увеличивают функциональную массу печени, сколько изменяют гуморальные и молекулярные механизмы, отвечающие за активацию функции оставшихся гепатоцитов реципиента и регенерацию, путем выработки пептидов, среди которых ведущая роль принадлежит факторам роста [8, 11, 19].

Имеющимися проблемами в этой области, требующими дальнейшего решения, являются характеристика состояния вводимых клеток, способы их введения, определение количества вводимых клеток [17, 18, 20]. Наряду с этим требуют своего дальнейшего исследования механизмы метаболической коррекции имплантированных гепатоцитов, чему и посвящена представленная работа. Кроме этого, перспективным является выделение из культуральной жидкости гепатоцитов «действующего» начала. Одним из оснований для этого являются полученные ранее в нашей лаборатории данные, согласно которым не только введение гепатоцитов интактных крыс, но и их культуральной жидкости, аллогенным реципиентам с экспериментальной гипоксией печени предотвращает развитие в печени иммуновоспалительного синдрома, нормализует синтетическую функцию гепатоцитов, процессы перекисного окисления липидов, функционально-метаболическую активность нейтрофилов периферической крови [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При ОТПП, вызванном интоксикацией четыреххлористого углерода, установлено развитие основных биохимических синдромов поражения гепатоцитов, активация функционально-метаболической активности нейтрофилов периферической крови, развитие окислительного стресса, нарушение метаболической активности эритроцитов. Трансплантация гепатоцитов крыс аллогенным реципиентам с острой токсической гепатопатией более эффективно по сравнению с ксеногенными гепатоцитами мышей корригирует системные и локальные метаболические нарушения, возникающие вследствие воздействия гепатотропного яда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Люндуп АВ, Онищенко НА, Шагидулин МЮ, Крашенинников МЕ.* Стволовые прогениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2010; XII (2): 100–107. *Ljundup AV, Onischenko NA, Shagidulin MJu, Krasheninnikov ME.* Stem progenitorny cells of a liver and marrow as regulyatolra of recovery neogenesis of the injured liver. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2010; XII (2): 100–107 (in Russian).
2. *Liu KX, Kato Y, Matsumoto K.* Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. *Pharm Res.* 2009; 26 (4): 1002–1021.
3. *Антоненко ОМ.* Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. *Медицинский совет.* 2013; 6: 45–51. *Antonenko OM.* Toxic damages of a liver: ways of pharmacological correction. *Medical advice.* 2013; 6: 45–51.
4. *Онищенко НА, Люндуп АВ, Газизов ИМ, Деев РВ, Шагидулин МЮ, Крашенинников МЕ, Аврамов ПВ.* Двухфазная динамика воздействия мезенхимальных мультпатентных стромальных клеток (ММСК) костного мозга на печень при моделировании фиброзирующего гепатита. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2011; XIII (3): 51–59. *Onischenko NA, Ljundup AV, Gazizov IM, Deev RV, Shagidulin MJu, Krasheninnikov ME, Avramov PV.* Two-phase dynamics of impact of the mesenchymal multpatentnykh stromalnykh of cells (MMSC) of marrow on a liver when modeling fibroziruyushchy hepatitis. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2011; XIII (3): 51–59 (in Russian).
5. *Генинг ТП, Белозерова ЛА.* Система «ПОЛ-антиоксидант эритроцитов и ткани печени» в условиях хронического токсического гепатита и его коррекции аскорбиновой кислотой. *Вестник новых медицинских технологий.* 2005; XII (2): 72–74. *Gening TP, Belozerova LA.* Sistema “Oxidant and antioxidant system of erythrocytes and tissue of a liver” system in the conditions of chronic toxic hepatitis and its correction by acidum ascorbinicum. *Vestnik novyh medicinskih tehnologij.* 2005; XII (2): 72–74 (in Russian).
6. *Конопля АИ, Прокопенко ЛГ, Долгарева СА, Локтионов АЛ, Конопля АА, Гаврилюк ВП.* Структурно-функциональные свойства эритроцитов в норме и при патологии. Курск: Изд-во КГМУ, 2011: 199. *Konoplja AI, Prokopenko LG, Dolgareva SA, Loktionov AL, Konoplja AA, Gavriljuk VP.* Structurally functional properties of erythrocytes in norm and at pathology. Kursk: Izd-vo KGMU, 2011: 199 (in Russian).
7. *Забродский ПФ, Громов МС, Масляков ВВ.* Коррекция токоферола ацетатом и унитолом нарушений иммунного гомеостаза крыс при острой интоксикации тетрахлорметаном. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2015; 78 (1): 30–33. *Zabrodskij PF, Gromov MS, Masljakov VV.* Tocopherol correction by an acetate and unitolite of disturbances of an immune homeostasis of rats at acute intoxication a

tetrachlormethane. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija.* 2015; 78 (1): 30–33 (in Russian).

8. *Шендер ЭМ, Колосов АЕ.* Закономерности регенерации гепатоцитов после трансплантации фетальных тканей печени при циррозе печени у крыс. *Вестник новых медицинских технологий.* 2009; XVI (3): 25–26. *Shender JeM, Kolosov AE.* Patterns of neogenesis of hepatocytes after transplantation the burned of tissues of a liver at cirrhosis at rats. *Vestnik novyh medicinskih tehnologij.* 2009; XVI (3): 25–26 (in Russian).
9. *Медведева СЮ, Мухлынина ЕА, Булавинцева ТС, Данилова ИГ.* Участие фактора стволовой клетки в репаративной регенерации печени при ее токсическом повреждении. *Медицинская иммунология.* 2015; 17: 32. *Medvedeva SJu, Muhlynina EA, Bulavinceva TS, Danilova IG.* Participation of a factor of a stem cell in reparativny neogenesis of a liver at its toxic damage. *Medicinskaja immunologija.* 2015; 17: 32 (in Russian).
10. *Гаврилюк ВП, Белоконова ОП, Конопля АИ, Быстрова НА.* Эффективность различных лекарственных форм «Фосфоглива» в коррекции структурно-функциональных нарушений мембраны эритроцитов при остром токсическом поражении печени. *Системный анализ и управление в биомедицинских системах.* 2011; 10 (2): 269–273. *Gavriljuk VP, Belokonova OP, Konoplja AI, Bystrova NA.* Efficiency of various dosage forms "Fosfogliv" in correction of structurally functional disturbances of a membrane of erythrocytes at an acute toxic lesion of a liver. *Sistemnyj analiz i upravlenie v biomedicinskih sistemah.* 2011; 10 (2): 269–273 (in Russian).
11. *Литвинова ЕС, Терехова СВ, Быстрова НА, Гаврилюк ВП.* Иммунометаболический статус у интактных животных при введении культуральной жидкости аллогенных гепатоцитов, гептрала и мексикора. *Врач-аспирант.* 2012; 3.2 (52): 315–319. *Litvinova ES, Terehova SV, Bystrova NA, Gavriljuk VP.* The immunometabolic status at intact animals at introduction of cultural liquid of allogenic hepatocytes, a geptral and a meksikor. *Vrach-aspirant.* 2012; 3.2 (52): 315–319 (in Russian).
12. *Смахтин МЮ, Конопля АИ, Северьянова ЛА, Швейнов ИА.* Фармакологическая коррекция пептидом GLY-HIS-LYS иммунологических нарушений в условиях поражения печени тетрахлометаном. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2003; 2: 19–23. *Smahtin MJu., Konoplja AI, Sever'janova LA, Shvejnov IA.* Pharmacological correction by a peptide of GLY-HIS-LYS of immunologic disturbances in the conditions of a liver lesion the tetrakhlometany. *Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija.* 2003; 2: 19–23 (in Russian).
13. *Berry MN, Friend DS.* High-Yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *The Journal of Cell Biology.* 1969; 43: 19–69.
14. *Зинкин ВЮ, Годков ВГ.* Способ оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека. Клиническая и лабораторная диагностика. 2004; 2: 27–31. *Zinkin VJu, Godkov VG.* Way of an assessment of a kislorodzavisimy metabolism of neutrocytes of the person. *Klinicheskaja i laboratornaja diagnostika.* 2004; 2: 27–31 (in Russian).
15. *Земсков АМ, Земсков ВМ, Золоедов ВИ, Земскова ВА, Кузнецов АН.* Неортодоксальная иммунология. М.: Триада-Х, 2013: 222. *Zemskov AM, Zemskov VM, Zoloedov VI, Zemskova VA, Kuznetsov AN.* Neortodoksal'naya immunologiya. M.: Triada-X, 2013: 222.
16. *Лазарев АИ, Бровкина ИЛ, Гаврилюк ВП, Конопля АИ, Лосенок СА, Прокопенко ЛГ и др.* Эритроцитзависимые эффекты лекарственных и физиотерапевтических средств. Под ред. Л.Г. Прокопенко. Курск: Изд-во ГОУ ВПО КГМУ Росздрава, 2008: 336. *Lazarev AI, Brovkina IL, Gavriljuk VP, Konoplja AI, Losenok SA, Prokopenko LG i dr.* Erythrocyte dependent effects of medicinal and physiotherapeutic agents. Pod red. L.G. Prokopenko. Kursk: Izd-vo GOU VPO KGMU Roszdrava, 2008: 336 (in Russian).
17. *Евсеева МН, Шептулина АФ, Рубцов ЮП.* Перспективы создания аутологичных гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности. *РЖГГК.* 2015; 6: 49–57. www.gastro-j.ru. *Evseeva MN, Sheptulina AF, Rubtsov YuP.* Prospects for creation autologous hepatocytes for the treatment of liver failure. *RZHGGK.* 2015; 6: 49–57. www.gastro-j.ru.
18. *Долгих МС.* Клинический опыт трансплантации гепатоцитов для лечения печеночной недостаточности. *Клиническая медицина.* 2012; 4: 18–22. *Dolgikh MS.* Clinical experiment hepatocyte transplantation for the treatment of liver failure. *Klinicheskaya meditsina.* 2012; 4: 18–22.
19. *Лепехова СА, Апарцин КА, Искра АИ.* Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени. *Фундаментальные исследования.* 2014; 2: 187–192. *Lepehova SA, Aparcin KA, Iskra AI.* Role of a factor of body height of hepatocytes in neogenesis of a liver. *Fundamental'nye issledovanija.* 2014; 2: 187–192 (in Russian).
20. *Шагидулин МЮ, Онищенко НА, Крашенинников МЕ.* Трансплантация гепатоцитов как метод лечения печеночной недостаточности: экспериментальный и клинический опыт. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2010, XII; 4: 53–60. *Shagidullin MYu, Onishchenko NA, Krasheninnikov ME.* Hepatocyte transplantation as a treatment for liver failure: experimental and clinical experimemt. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov.* 2010, XII; 4: 53–60.
21. *Быстрова НА, Литвинова ЕС, Терехова СВ, Гаврилюк ВП.* Фармакологическая коррекция иммунометаболических нарушений гептралом и мексикором у животных на фоне ишемического поражения печени. *Научные ведомости БелГУ. Сер. «Медицина. Фармация».* 2012; 22 (141); 20/1: 179–182. *Bystrova NA, Litvinova ES, Terehova SV, Gavriljuk VP.* Pharmacological correction of immunometabolic disorders by geptral and mexicor animals with ischemic liver injury. *Nauchnye vedomosti BelGu. Ser. «Meditsina. Farmatsiya».* 2012; 22 (141); 20/1: 179–182.

Статья поступила в редакцию 12.11.2015 г.
The article was submitted to the journal on 12.11.2015