

МОЖЛИВОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ЕРИТРОПОЕТИНУ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ЙОГО ФОРМУВАННЯ

В.М.Запорожан, О.Л.Холодкова, А.Л.Щербатюк, Д.М.Пихтєєв, М.М.Перепелюк

НДІ молекулярно-генетичної та клітинної медицини Одеського державного медичного університету

Резюме. Наведені результати морфологічних та морфометричних досліджень впливу еритропоетину в різних дозах на стан печінки мишей на різних стадіях фіброзного процесу. Виділені три стадії фіброзного процесу: 1) синусоїдальний фіброз; 2) портальний фіброз; 3) мостоподібний фіброз. Ефективною є корекція еритропоетином у дозі 220 МО/кг.

Ключові слова: фіброз печінки, еритропоетин, експеримент.

В останні роки з'явилося багато публікацій про можливі механізми відновлення та ревазуляризації печінкової тканини при цирозі [1, 2], при цьому приділяється увага застосуванню стовбурових клітин та їх активаторів – цитокинів [3, 4]. Наші експерименти із застосуванням різних доз гранулоцитарного колонієстимулювального фактора (Г-КСФ) та еритропоетину (ЕПО) виявили позитивний вплив на дистрофічно змінену паренхіму і судини печінки та морфофункціональний стан інших внутрішніх органів [4-6]. Позитивний вплив цитокинів пояснюється безпосереднім підвищенням регенераторної активності та мобілізації виходу з депо стовбурових клітин, які спричиняють регенерацію тканини у місцях пошкодження [7]. Відомо, що ЕПО знижує активність АЛТ, рівень TNF- α , IL-2 в крові та малонового альдегіду в тканині ішемічної печінки [8], а цитокини сприяють відновленню клітинних мембран, активують фосфоліпазу A2 [9].

Мета дослідження. Вивчити вплив різних доз ЕПО на печінкову тканину за умов експериментальної індукованої фіброзу.

Матеріал і методи. Експеримент про-

водили на 130 самцях мишей лінії ICR. Фіброз печінки моделювали за допомогою 50 % олійного розчину чотирьохлористого вуглецю (CCl₄), який вводили перорально в дозі 0,1 мл через добу протягом 4 тижнів – I група, 6 тижнів – II група, 8 тижнів – III група. Тварин кожної групи поділили на 4 підгрупи, перша з яких не підлягала корекції ЕПО, другій підгрупі підшкірно вводили ЕПО (епокрин) у дозі 220 МО/кг, третій – 5000 МО/кг, четвертій – 10000 МО/кг. Вибір дози ЕПО базувався на результатах наших попередніх досліджень, в яких спостерігали регенеративно-протективний ефект ЕПО при застосуванні дози 5000 МО/кг у мишей лінії ICR з експериментально індукованою адрибластиновою кардіоміопатією [10] та CCl₄-індукованим цирозом печінки [11]. Нижчу (220 МО/кг) та вищу (10000 МО/кг) дози досліджували на предмет можливого підсилення протективного ефекту ЕПО щодо фіброзогенного впливу CCl₄ на печінкову тканину. ЕПО вводили дворазово по половині дози на 3-й та на 5-й дні від останнього введення пошкоджувального агента. Контрольну групу становили 10 інтактних тварин. Розподіл тварин по гру-

Таблиця 1

Групи тварин залежно від тривалості уведення чотирхлористого вуглецю та дози еритропоєтину

	Без корекції	ЕПО (220 МО)	ЕПО (5000 МО)	ЕПО (10000 МО)
ССІ ₄ (4 тиж.)	1А група	2А група	3А група	4А група
ССІ ₄ (6 тиж.)	1Б група	2Б група	3Б група	4Б група
ССІ ₄ (8 тиж.)	1В група	2В група	3В група	4В група

пах наведений в таблиці 1. Виводили тварин з експерименту через тиждень від останнього уведення цитокінів. Вилучену печінку фіксували в 10 % розчині формаліну. Парафінові зрізи завтовшки 3 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та за методом ван Гізон. Зрізи виготовляли на заморожувальному мікроскопі і фарбували суданом III. Препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "Leica DMLS", морфометричні дослідження проводили з використанням програми "Видеотест мастер – морфологія".

Результати дослідження та їх обговорення. Макроскопічно печінка тварин 1А групи бліда. Мікроскопічно виявляли набряк стінок судин, набухання клітин ендотелію, зернистість цитоплазми гепатоцитів (ГЦ), у периферійних ділянках – ознаки вакуольної дистрофії. У деяких тварин виявили збільшення кількості сполучної тканини навколо центральних вен та печінкових балок. У печінці 1Б групи спостерігали різні за розміром вкраплення, подекуди крововиливи; печінка бліда, місцями насиченого темно-бурого кольору. Мікроскопічно більш виражені запально-дистрофічні зміни, вогнищевий некроз ГЦ в деяких ділянках, збільшення кількості сполучної тканини навколо порталних трактів. Фарбування суданом III виявило рівномірні дрібнокрапельні жирові включення в цитоплазмі ГЦ, переважно навколо центральних вен. Печінка тварин 1В групи неоднорідної структури та кольору. Мікроскопічно виявлені мостоподібний фіброз, розповсюджені вогнищеві некрози ГЦ, великі вогнища жирового переродження тканини в стадії жовтої атрофії, що локалізовані біля центральних вен. Спостеріга-

ються великі скупчення дрібних ГЦ (але вузлами-регенератами їх назвати не можна), судинні зміни у вигляді флебосклерозу і гіалінозу стінок артеріол. При цьому гіалін накопичувався в субендотеліальному шарі, ендотелій розпрямлений, переривчастий, м'язовий шар стоншений.

У тварин, що підлягали корекції ЕПО, виявили різноманітні морфологічні зміни залежно від дози препарату. У тварин 2А, 2Б та 2В груп спостерігали наявність позитивних змін. Макроскопічно печінка практично не відрізнялася від контролю, тільки у тварин 2В групи печінка була з дрібними вкрапленнями. Мікроскопічно у тварин 2А групи спостерігали підвищену зернистість цитоплазми ГЦ, розширення судин та синусоїдів. У 2Б групі тварин прояви зернистої дистрофії, розростання сполучної тканини та розповсюдженість некрозу ГЦ значно зменшилися, стінки артеріол помірно потовщені. У тварин групи 2В спостерігали різноманітні зміни в тканині печінки після корекції ЕПО. У деяких тварин виявляли жирові включення в ГЦ периферійних ділянок печінки, в окремих тварин ознаки жирової дистрофії відсутні. У цитоплазмі ГЦ всіх тварин некрозу ГЦ практично не виявлено; поодинокі інфільтрати, фібротичні зміни виражені слабо, стінки судин потовщені, іноді периваскулярні набряки. Позитивні структурні зміни в печінці тварин 3А, 3Б і 3В груп були менш виражені в порівнянні з 2А, 2Б та 2В групами, що підтверджено результатами морфометричного дослідження (табл. 2). У тварин 3В групи вогнища жирової дистрофії трохи зменшилися; на відміну від групи 1В ці вогнища локалізувалися перипортально, внутрішньочастково, а навколо центра-

Таблиця 2

Результати морфометричних досліджень тканини печінки

Морфометричні показники	Контроль	Група 1А	Група 2А	Група 3А	Група 4А	Група 1Б	Група 2Б	Група 3Б	Група 4Б	Група 1В	Група 2В	Група 3В	Група 4В
ПЩ СЕ	10,0±2,0	12,8±3,1*	9,8±3,2*	9,6±3,1*	13,9±2,0*	18,8±2,0	11,2±2,2	17,4±3,2	18,9±2,2	31,3±5,0	14,7±2,2	20,2±3,2	-
ПЩ АГЦ	0,7±0,05	1,25±0,5	1,0±0,5	2,02±0,75	3,3±0,75	1,85±0,5	1,15±0,7	1,74±0,7	6,6±1,25	3,1±1,0	0,9±0,5	2,9±0,7	-
ПЩ ГЦ КПРЛ	0,12±0,04	2,3±0,7	0,1±0,05	1,3±0,9	5,9±1,9	2,8±1,0	2,0±0,8	2,2±0,9	5,9±1,9	6,8±1,9	3,1±0,9	5,9±1,5	-
ПЩ ДЯ ГЦ	22±3,3	15,8±2,3	25±3,3	20,2±2,6	15,0±2,0	13,2±2,0	20,8±2,6	19,8±2,6	11,2±1,7	11,1±1,5	17,3±1,7	18,3±1,2	-
РЯ ОГЦ	20,23±3,0	17,7±2,3	21,2±2,3	17,6±2,3	17,7±2,3	19,66±2,1	21,5±2,3	22,6±2,2	21,6±2,1	9,24±2,0	15,3±2,0	17,2±1,7	-

n=10, P<0,05; * – P>0,05

льних вен виявляється практично нормальна тканина. Групи тварин 4А, 4Б і 4В відреагували на мегадози ЕПО значним погіршенням морфологічного стану. У тварин 4А, і 4Б груп в печінці виявили крововиливи, розширення порталних трактів, переповнення еритроцитами синусоїдів. Спостерігається сладж-феномен, периваскулярні та перицелюлярні набряки, великі вогнища некрозу ГЦ, запальних інфільтратів, в окремих випадках – тотальний некроз цілої ділянки печінки, фіброзні зміни. Смертність тварин у даних групах становила 30 %. Тварини 4В групи загинули всі.

При морфометричному дослідженні ділянок печінки без жирової дистрофії виявили, що питома щільність стромальних елементів у тканині печінки (ПЩ СЕ) в групі 1А підвищилася на 28 %, в групі 1Б – на 88 %, а в групі 1В більше ніж втричі порівняно з контролем. У групах 2А і 3А значення були близькими до контрольних, а в групі 4А практично не змінилися порівняно з групою 1А. У групі 2Б ПЩ СЕ знизилася порівняно з групою 1Б, але у групах 3Б і 4Б практично не змінилися. У групі 2В цей показник знизився більш ніж в 2 рази, а в групі 3В – в 1,5 рази порівняно з групою 1В. Питома щільність апоптотичних ГЦ (ПЩ АГЦ) зростала в групах 1А, 1Б майже в 1,5 рази, в групі 1В – більше ніж втричі. У групі 2А ПЩ АГЦ зменшилася на 20 %, а в групах 3А і 4А збільшилася в 1,6 та 2,6 рази порівняно з групою 1А. У групі 2Б ПЩ АГЦ знизилася, в групі 3Б практично не змінилася, а в групі 4Б зросла більше ніж втричі порівняно з групою 1Б. У групі 2В ПЩ АГЦ практично дорівнювала контролю, а в групі 3В майже не відрізнялася від показника в групі 1В. Питома щільність ГЦ з каріопікнозом, каріорексисом, каріолізісом (ПЩ ГЦ КПРЛ) в групах 1А, 4А, 1Б, і 1В в багато разів зросла порівняно з контролем. При цьому в групах 2А та 3А значення дорівнювали контрольним. ПЩ ГЦ КПРЛ знизилася в групах 2Б, 3Б, а в групі 4Б підвищилася вдвічі порівня-

но з групою 1Б. У групі 2В ПЩ ГЦ КПРЛ зменшилася більше ніж вдвічі, а в групі 3В – в 1,15 раза порівняно з групою 1 В. Питома щільність двоядерних ГЦ (ПЩ ДЯ ГЦ) в групі 1А зменшилася на 28 %, в 1 Б – на 40 %, в 1 В – на 49,5 %. У групах 2А, 3А, 2Б, 3Б значення приблизно дорівнювали контролю. В групі 4А цей показник практично не змінився порівняно з групою 1А, а в групі 4Б знизився порівняно з групою 1Б. В групах 2В і 3В визначили підвищення ПЩ ДЯ ГЦ та наближення до контролю. Розміри ядер одноядерних гепатоцитів (РЯ ОГЦ) в групах 1А і 2Б практично не змінилися, як і в групах 2А, 3А, 4А, 2Б, 3Б та 4Б. В 1В групі РЯ ОГЦ в середньому знизилися більш ніж в 2 рази, але в групах 2В і 3В підвищилися на 65 та 86 % порівняно з групою 1В.

Ми спостерігали фіброзування печінки, що виражалось збільшенням питомої щільності сполучної тканини, аж до формування стійких фібротичних змін. Можна припустити, що в пізніші терміни виявили картину класичного цирозу печінки. В печінці тварин, яким вводили CCl_4 протягом 4 тижнів, виявили розповсюджений перисинусоїдальний фіброз. У тварин, яким вводили CCl_4 протягом 6 тижнів, цей процес захопив порталні ділянки. У тварин, що отримували CCl_4 протягом 8 тижнів, виявили мостоподібний фіброз, вогнища дрібних клітин, що свідчить про дуже велику швидкість поділу ГЦ, які не встигають набути нормальних розмірів. З'ясовано, що на всіх стадіях фіброзу еритропоетин здатний викликати зворотний розвиток патологічного процесу. Залежно від дози ЕПО може виявляти як позитивний, так і негативний вплив на тканину фіброзно зміненої печінки. Отже, ЕПО виявив найкращий позитивний вплив у дозі 220 МО/кг. У тварин зі стадією перисинусоїдального фіброзу зменшилися або практично зникли прояви запально-дистрофічних змін, кількість апоптотичних клітин, клітин з деструкцією ядер, що особливо помітно у тварин, які отримували CCl_4

протягом 8 тижнів. Результати каріометрії одноядерних ГЦ та показники ПЩ ДЯ ГЦ демонструють, що під впливом даної дози ЕПО підсилюється мітотична активність ГЦ. У тварин, що отримували ЕПО в дозі 5000 МО/кг, покращився морфологічний стан печінки, але в порівнянні з тваринами, що отримали дозу 220 МО/кг, вони менш значимі. Велика кількість тварин, яким вводили ЕПО в дозі 10000 МО/кг, не витримала такого навантаження на печінку, загинули в процесі експерименту. В печінці тварин, що вижили, спостерігали істотніші патологічні зміни, ніж у тварин без корекції, що також підтверджено даними морфометрії. Отже, ЕПО в дозі 220 МО/кг виявляє терапевтичний ефект навіть при тяжкому фібротичному ураженні печінки. Проте надмірні дози цитокіну, які в 100 разів перевищують середньотерапевтичну, навпаки, викликають печінкову недостатність тяжкого ступеня, що, скоріш за все, стало причиною загибелі тварин 4А, 4Б і 4В груп.

Висновки. 1. Залежно від тривалості уведення CCl_4 спостерігаються 3 стадії розвитку фіброзу печінки: 1) внутрішньочасточковий фіброз; 2) порталний фіброз; 3) мостоподібний фіброз. 2. Різні дози еритропоетину (ЕПО) виявляють різнобічні ефекти на фіброзно змінену тканину печінки – від регресу фіброзного перетворення до розвитку печінкової недостатності. Оптимальна доза ЕПО для корекції всіх стадій фіброзу становить – 220 МО/кг. 3. Позитивний вплив ЕПО полягав у зменшенні запально-дистрофічних та фіброзних змін, вогнищ некрозу гепатоцитів, у підсиленні регенерації тканини печінки. Дози ЕПО, що набагато перевищують середньотерапевтичні, негативно впливають на фіброзну печінку і на пізніх стадіях призводять до загибелі тварин. 4. У дозі 220 МО/кг ЕПО можна використовувати для корекції фіброзних уражень печінки незалежно від стадії формування патологічного процесу.

Перспективи наукового пошуку. Важ-

ливо вивчити механізми різнобічних системних ефектів ЕПО залежно від дози та вплив ЕПО на тканину печінки в різних стадіях фіброзу за іншими схемами його введення.

Література

1. Joyeux-Faure M. Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? / M. Joyeux-Faure // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2007. – Vol. 323, № 3. – P. 759-762.
2. G-CSF-induced evacuation of sinusoidal NK cells and the facilitation of liver regeneration in a partial hepatectomy / K. Oishi, K. Hayamizu, X. Aihaiti [et al.] // *Cytokine.* – 2006. – Vol. 34, № 1-2. – P. 66-75.
3. Lorenzini S. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis / S. Lorenzini // *Aliment. Pharmacol. Ther.* – 2008. – Vol. 27, № 10. – P. 932-939.
4. Effects of stem cells activation by cytokines in the conditions of toxic affection of reproductive system in mice males / V. Zaporozhan, E. Kholodkova, A. Shcherbatyuk [et al.] // *Tissue engineering.* – 2007. – Vol. 13, № 7. – P. 1683.
5. Granulocyte-colony stimulating factor usage in regeneration of dystrophic myocardium. / V. Zaporozhan, N. Perepelyuk, E. Kholodkova [et al.] // *The international journal of artificial organs.* – 2005. – Vol. 28, № 4. – P. 354.
6. Щербатюк А.Л. Можливості застосування гранулоцитарного колонієстимулюючого фактора при токсичному ураженні внутрішніх органів / А.Л. Щербатюк, О.С. Козаненко // *Вчені майбутнього: праці наук.-прак. конф. з міжнар. уч.* – 2006. – С. 54.
7. Mechanism of mobilization of mesenchymal stem cell under the effect of granulocyte colony-stimulating factor / V.V. Zhdanov, L.A. Stavrova, A.M. Dygai, E.D. Goldberg // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2007. – Vol. 144, № 1. – P. 151-153.
8. Erythropoietin attenuates hydrogen peroxide-induced damage of hepatocytes / N. Yazihan, H. Ataoglu, B. Yener, C. Aydin // *Turk. J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol. 18, № 4. – P. 239-244.
9. Della-Puca R. The regulation of phospholipase-A2 (PLA-2) by cytokines expressing hematopoietic growth-stimulating properties / R. Della-Puca, V.S. Gallicchio // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1996. – Vol. 212, № 2. – P. 174-184.
10. Using of erythropoietin in heart failure: the experimental and clinical investigation / V. Zaporozhan, N. Perepelyuk, E. Kholodkova, D. Pukhtyeyev // *Eur. J. of Clinical Investigation.* – 2008. – Vol. 38, Suppl. 1. – P. 39-40.
11. Холодкова О.Л. Порівняльний аналіз впливу деяких цитокінів на морфологічний стан печінки мишей при токсичному гепатиті / О.Л. Холодкова, А.Л. Щербатюк, Д.М. Пухтєєв // *Здобутки клін. та експерт. мед.* – 2008. – № 1. – С. 72-76.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭРИТРОПОЭТИНА ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЕГО ФОРМИРОВАНИЯ

POSSIBILITIES OF USING ERYTHROPOIETIN FOR THE PURPOSE OF CORRECTING HEPATIC FIBROSIS AT DIFFERENT STAGES OF ITS DEVELOPMENT

Резюме. Приведены результаты морфологических исследований влияния эритропоэтина в разных дозах на состояние печени мышей на разных стадиях фиброзного процесса. Выделены три стадии фиброзного процесса: 1) синусоидальный фиброз; 2) портальный фиброз; 3) мостовидный фиброз. Эффективной оказалась коррекция эритропоэтином в дозе 220 МЕ/кг.

Ключевые слова: фиброз печени, эритропоэтин, эксперимент.

Abstract. The results of morphological and morphometric studies, dealing with the effect of erythropoietin in different doses on the condition of the rat liver at various stages of the fibrotic process are presented. Three stages of the fibrotic process have been singled out: 1) sinusoidal fibrosis; 2) portal fibrosis; 3) bridging fibrosis. Erythropoietin correction turned out to be effective in a dose of 220 IU/kg.

Key words: hepatic fibrosis, erythropoietin, experiment.

Research Institute of Molecular-Genetic and Cellular Medicine (Odesa)

Надійшла 21.10.2008 р.
Рецензент – проф. О.І.Федів (Чернівці)