

Вплив аутомезоконцентрату тромбоцитів на функціональний стан печінки щурів після часткової резекції паренхіми печінки

Мета роботи: визначити маркери функціонального стану печінки у щурів після часткової резекції паренхіми печінки за умов застосування аутомезоконцентрату тромбоцитів.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проводили на білих лабораторних щурах лінії Вістар, яких розділили на три групи: 1-ша група – інтактні тварини (контроль); 2-га група – тварини, яким проводили резекцію лівої частки печінки без проведення подальшої додаткової терапії; 3-тя група – тварини, яким після проведення часткової резекції лівої частки печінки вводили аутомезоконцентрат тромбоцитів.

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що на початкових етапах після часткової резекції печінки спостерігалася гіперферментемія аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази, γ -глутамілтрансфераз, що вказує на ушкодження клітин печінки та низьку інтенсивність процесів регенерації. Введення аутомезоконцентрату тромбоцитів вже на 6-ту добу після операційного втручання сприяло зниженню аланінамінотрансферази, аспартатамінотрансферази і γ -глутамілтрансфераз у сироватці крові, з нормалізацією досліджуваних показників на 18-ту добу експерименту. Введення аутомезоконцентрату тромбоцитів сприяло суттєвішому відновленню білок-синтезуючої функції печінки, на що вказують нижчі значення тимолової проби порівняно із показниками групи тварин, яким не вводили аутомезоконцентрату тромбоцитів.

Введення аутомезоконцентрату тромбоцитів запускає швидші регенеративні процеси у печінці, про що свідчить зниження гіперферментемії амінотрансфераз, γ -глутамілтрансфераз і показника тимолової проби. Нормалізація печінкових проб вказує на відновлення структурно-функціонального стану цього органа.

Ключові слова: печінка, резекція; аутомезоконцентрат тромбоцитів; аланінамінотрансфераза; аспартатамінотрансфераза; γ -глутамілтрансфераза.

Постановка проблеми і аналіз останніх досліджень та публікацій. Печінка як життєво важливий орган в організмі, виконує ряд функцій – детоксикація ксенобіотиків, синтез холестеролу, утворення жовчі, регуляція вуглеводного обміну, синтез протеїнів на експорт, депо вітамінів та мікроелементів, синтез деяких гормонів тощо [1]. Печінка розташовується в правому підбер'ї і складається з правої та лівої часток, які, у свою чергу, поділяються на сегменти, кожен із яких окремо забезпечений кровоносними судинами, нервами і жовчними протоками [2]. Сегменти відокремлені один від одного сполучнотканинними перегородками, що дозволяє уникнути під час операційного втручання в цей орган масивних кровотеч, а також порушення утворення та відтоку жовчі [3].

Внаслідок зростання хронічних захворювань печінки, невизначеності заходів для лікування доброякісних новоутворень печінки, зростання захворюваності на гепатоцелюлярні карциноми і цироз печінки стає необхідним пошук нових методів лікування таких пацієнтів [4]. Окрім того, більшість хронічних захворювань печінки – вірусні гепатити, алкогольна і неалкогольна жирова дистрофія печінки можуть прогресувати з утворенням фіброзної тканини у цьому органі [4, 5]. Розвиток фіброзу печінки часто призводить до незворотного рубцювання тканини. Все це спону-

є до проведення часткової резекції правої або лівої часток печінки. Резекція печінки сьогодні стає одним із поширених методів лікування вище зазначених захворювань печінки, проте відкритими залишаються питання швидкої регенерації цього органа після операційного втручання [6].

Вивчення процесів регенерації печінки характеризується складністю, оскільки механізми гепаторегенерації скоординовані взаємодією різних компонентів, які, ймовірно, порушені у пацієнтів із основними захворюваннями печінки [6, 7]. Тому вивчення механізмів регенерації печінки допоможе спрямувати конкретні методи лікування на стимулювання регенерації печінки або інгібування факторів, що пригнічують регенерацію печінки.

Перспективним у використанні регенеративної медицини є клітинна терапія, найбільшою популярністю серед яких користується збагачена тромбоцитами плазма (PRP). Окрім того, PRP можуть використовувати як ініціюючі засоби для стимуляції стовбурових клітин до самооновлення і диференціювання, що супроводжуватиметься регенеративними процесами у печінці [8].

Мета роботи: визначити маркери функціонального стану печінки у щурів після часткової резекції паренхіми печінки за умов застосування аутомезоконцентрату тромбоцитів (АМК).

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проводили на білих статевозрілих лабораторних щурах лінії Вістар, яких розділили на три групи: 1-ша група – інтактні тварини (контроль) (n=9); 2-га група – тварини, яким проводили резекцію лівої частки печінки без проведення а подальшому додаткової терапії (n=30); 3-тя група – тварини, яким після проведення резекції лівої частки печінки вводили аутомезоконцентрат тромбоцитів (n=30).

Усі маніпуляції з тваринами й їх утримання проводили відповідно до положень, затверджених «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Всім тваринам дослідних груп проводили часткову резекцію печінки. Для цього видаляли ліву передню частку печінки (~30 % загальної маси печінки). Тваринам 2-ї групи вводили АМК.

Для отримання АМК здійснювали центрифугування крові, у результаті якого плазму відділяли від еритроцитів і лейкоцитів. Після другого центрифугування отримували осад пулу тромбоцитів, який відділяли від “бідної” на тромбоцити плазми. Для досягнення концентрації біля 1×10^9 тромбоцитів/мл осад пропускали через фільтри, після чого концентрат збирали у кріопробірку та заморожували у рідкому азоті для отримання лізат-продукту з факторами росту.

Тваринам внутрішньовенно вводили 0,1 мл лізат-продукту, який перед використанням розморожували при температурі 37 °С. Тварин виводили з досліду по 6 тварин в кожній дослідній групі в терміни через 6, 12, 18 діб після резекції печінки шляхом їх евтаназії під легким ефірним наркозом.

Забір крові здійснювали у скляні пробірки, які піддавали центрифугуванню протягом 10 хв при 1500 об/хв. В отриманій сироватці крові визначали маркери функціонального стану печінки – ензимні активності аланінамінотрансферази (АЛТ), аспаратамінотрансферази (АСТ), γ -глутамілтрансферази (ГГТ). Ензимну активність АЛТ та АСТ визначали за кількістю утвореного пірувату. Принцип методу визначення продукту реакції ґрунтується на вимірюванні оптичної щільності динітрофенілгидразонів пірувату, які в лужному середовищі зафарбовуються у коричнево-червоний колір [9]. Активність ГГТ визначали за швидкістю утворення 3-карбокси-4-нітроаніліну та виражали в Од/л [10]. Про стан білково-синтетичної функції печінки судили за значенням тимолової проби (од. S-H) [11].

Кількісні показники отриманих результатів обробляли статистично з використанням ліцензованого пакету “STATISTICA 8”. Для кожного показника

визначали середнє значення та стандартне квадратичне відхилення. За кожним із отриманих варіаційних рядів оцінювали правильність розподілу ознак із застосуванням параметричних або непараметричних методів оцінки отриманих результатів. Різницю між порівнюваними значеннями визначали за критеріями Манна – Уїтні і Стьюдента. Достовірну різницю між групами вважали при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

Процеси регенерації печінки в організмі запускаються і регулюються великою кількістю процесів, які діють за аутокринним, паракринним та ендокринним механізмами [6, 7]. На рівні біохімічних процесів ці механізми мають перехресні зв'язки. Регенеративна реакція печінки на резекцію може бути варіабельною і включати як гіпертрофію, так і справжню проліферативну гіперплазію. Між паренхіматозними та непаренхіматозними клітинами можуть відбуватися складні взаємодії, які впливають на регенерацію паренхіми печінки [7]. Незрозумілими залишаються терміни, на яких найінтенсивніше відбуваються процеси регенерації печінки після часткової резекції. Основними маркерами, які відображають функціональний стан печінки, є активність амінотрансфераз у сироватці крові – АЛТ і АСТ.

Результати проведених досліджень показали, що на 6-ту добу після резекції печінки у сироватці крові щурів суттєво підвищені рівні активності АЛТ і АСТ (рис. 1). Так, ензимна активність АЛТ у 4,4 раза перевищувала значення контрольної групи тварин ($p \leq 0,05$) (рис. 1, а), а аспаратамінотрансферазна активність у 2 рази перевищувала значення контрольної групи тварин ($p \leq 0,05$) (рис. 1, б). Підвищення рівня АЛТ і АСТ у сироватці крові у ранні терміни після резекції печінки є прямим наслідком вивільнення їх у кров із зруйнованих гепатоцитів [12]. Імовірно, на цьому етапі відбувається фаза ініціація регенерації, яка включає надекспресію специфічних генів для підготовки клітин печінки до реплікації [7].

У міру віддалення від терміну проведення резекції печінки спостерігалось зниження ензимних активностей амінотрансфераз у сироватці крові з мінімальними значеннями на 18-ту добу експерименту (рис. 1). Проте досліджувані показники не набували значень інтактних тварин, що свідчить про пролонгування регенеративних процесів у печінці та про необхідність застосування додаткових факторів, які б пришвидшили процес регенерації. До таких засобів можна віднести АМК, основним діючим агентом якого є тромбоцити, які, окрім участі в гемостазі, можуть відігравати важливу

роль у регенерації печінки через виділення в ушкоджені тканини факторів росту [8].

Аналіз результатів дослідження показав, що введення АМК в організм щурів призводило до зниження ензимних активностей АЛТ і АСТ у си-

роватці крові вже на 6-ту добу після його застосування (рис. 1).

Так, значення ензимної активності АЛТ у 1,2 раза було нижчим від показників групи тварин після резекції печінки, яким не вводили АМК (рис. 1, а).

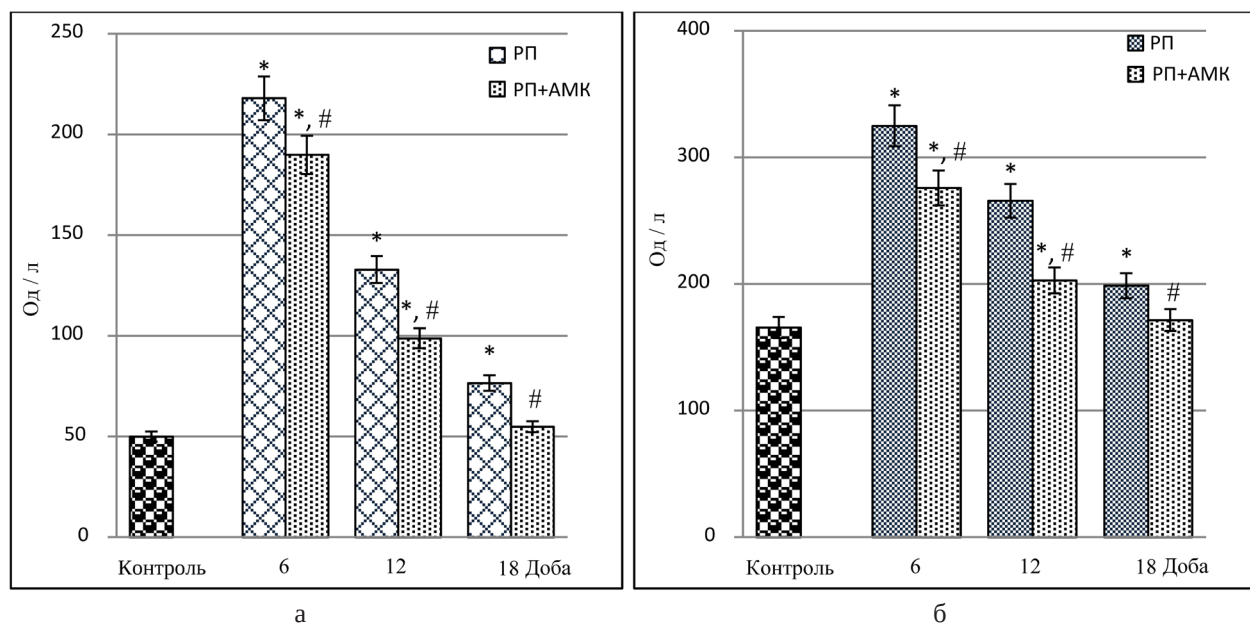


Рис. 1. Аланінамінотрансферазна (а) й аспаратамінотрансферазна (б) активності у сироватці крові щурів після часткової резекції печінки та за умов введення аутомезоконцентрату тромбоцитів.

Примітка (тут і надалі): РП – щури, яким проводили резекцію печінки; РП+АМК – щури, яким після резекції печінки щоденно вводили аутомезоконцентрат тромбоцитів; * – статистично достовірна різниця порівняно з показниками інтактних тварин; # – статистично достовірна різниця порівняно з показниками щурів, яким проводили резекцію печінки, але не вводили АМК ($p < 0,05$).

Значення ензимної активності АСТ у 1,2 раза нижче показника групи тварин, яким не вводили АМК (рис. 1, б). Подібні зміни спостерігалися на 12-ту і 18-ту доби, коли досліджувані показники у групі тварин, яким вводили АМК, були нижчими від показників щурів, які не отримували АМК (рис. 1). Введення АМК сприяло нормалізації активності амінотрансфераз у сироватці крові на 18-ту добу експерименту (рис. 1). Імовірно, тромбоцитарні фактори росту, які знаходяться в АМК, стимулюють проліферацію клітин паренхіми печінки, чим пришвидшують проходження серії циклів клітинного поділу [8]. При цьому можуть знижуватися запальні процеси у печінці, які можуть бути наслідком перенесеного операційного втручання в цей орган.

Іншим маркером, який вказує на структурно-функціональний стан печінки, є гіперферментемія ГГТ. Результати проведених досліджень показали підвищення ензимної активності ГГТ у сироватці крові щурів після часткової резекції пе-

чінки як у щурів, яким не вводили АМК, так і у щурів, яким вводили АМК (рис. 2). Проте гіперферментемія ГГТ була вищою на всіх етапах експерименту в групі тварин, яким не вводили АМК (рис. 2). На 18-ту добу введення АМК значення ензимної активності ГГТ наближалось до показників інтактних тварин (рис. 2).

Імовірно, в паренхімі печінки після її часткової резекції можуть виникати запальні процеси за рахунок значного підвищення прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ), що знижує її детоксикаційну функцію [13]. Екзогенні тромбоцити, окрім факторів росту, можуть містити біоактивні протеїни, що відіграють ключову роль в гомеостазі та індукують залучення лейкоцитів у процеси регенерації паренхіми печінки [14]. Окрім того, вони сприяють транспорту лейкоцитів до місця запалення. Всі ці фактори сприяють відновленню функціонування печінки, на що вказує значення тимолової проби.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

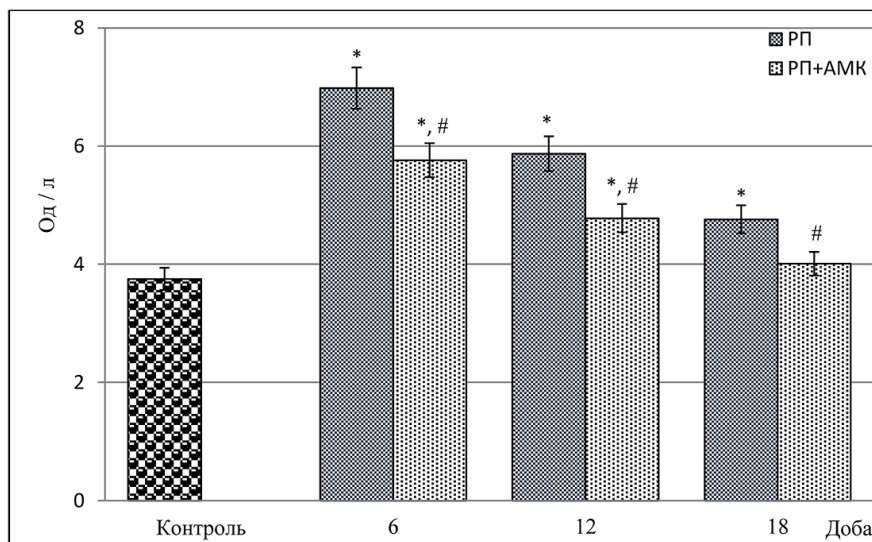


Рис. 2. Ензимна активність γ -глутамілтрансферази в сироватці крові щурів після часткової резекції печінки та за умов введення аутомезоконцентрату тромбоцитів.

Результати визначення показника тимолової проби показали, що його значення найвище у перші дні після часткової резекції печінки з тенденцією до зниження у міру віддалення від терміну операційного втручання (рис. 3). Проте навіть на 18-ту добу експерименту досліджуваний показник не набував значень групи інтактних тварин, оскільки у 1,3 раза перевищував показник контролю ($p \leq 0,05$) (рис. 3).

Введення АМК сприяло суттєвішому відновленню білок-синтезуючої функції печінки, на що вказували нижчі значення тимолової проби порів-

няно із показниками групи тварин, яким не вводили АМК (рис. 3). На 18-ту добу експерименту досліджуваний показник наближається до показника контролю (рис. 3).

Отже, виявлена гіперферментемія трансаміназ і ГГТ на початкових етапах після часткової резекції печінки вказує на ушкодження клітин печінки та низьку інтенсивність процесів регенерації. Введення АМК стимулює проліферацію клітин печінки, при цьому знижуючи запальні процеси в цьому органі, що сприяє швидкій регенерації печінки і відновленню її білок-синтезуючої функції.

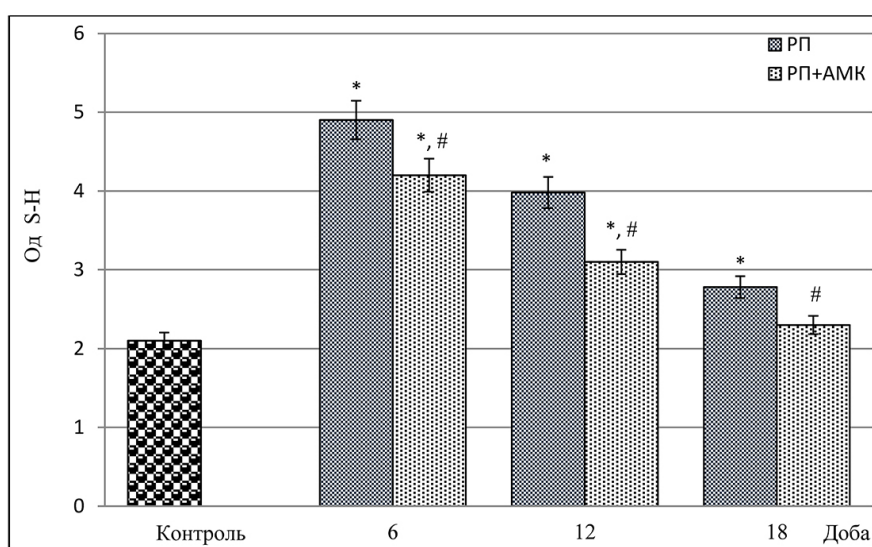


Рис. 3. Рівень тимолової проби у крові щурів після часткової резекції печінки та за умов введення аутомезоконцентрату тромбоцитів.

Висновки. Часткова резекція паренхіми печінки супроводжується гіперферментемією АЛТ, АСТ, ГГТ та порушенням білок-синтезуючої функції цього органа на початкових термінах після операційного втручання. У міру віддалення від терміну часткової резекції печінки показники функціонального стану печінки відновлюються, проте не набувають значень інтактних тварин на 18-ту добу експерименту.

Введення АМК запускає швидші регенеративні процеси у печінці, на що вказує зниження гіперферментемії амінотрансфераз, ГГТ і показника тимолової проби, що свідчить про відновлення структурно-функціонального стану цього органа. Знання механізмів впливу АМК на регенерацію печінки при захворюваннях цього органа дозволить використовувати цей підхід у клінічній практиці сучасних лікувальних заходів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. The circadian clock and liver function in health and disease / A. Mukherji, S. M. Bailey, B. Staels, T. F. Baumert // *J. Hepatol.* – 2019. – Vol. 71 (1). P. 200–211. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.020.
2. Almazroo O. A. Drug metabolism in the liver / O. A. Almazroo, M. K. Miah, R. Venkataramanan. – *Clin Liver Dis.* – 2017. – Vol. 21 (1). – P. 1–20. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
3. The immune niche of the liver / M. L. Cheng, D. Nakib, C. T. Perciani, S. A. MacParland // *Clin. Sci. (Lond).* – 2021. – Vol. 135 (20). – P. 2445–2466. DOI: 10.1042/CS20190654.
4. Molecular mechanisms driving progression of liver cirrhosis towards hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis b and c infections: a review / T. Kanda, T. Goto, Y. Hirotsu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20 (6). – P. 1358. DOI: 10.3390/ijms20061358.
5. Baglieri J. The role of fibrosis and liver-associated fibroblasts in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma / J. Baglieri, D. A. Brenner, T. Kisseleva // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20 (7). – P. 1723. DOI: 10.3390/ijms20071723.
6. Michalopoulos G. K. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications / G. K. Michalopoulos, B. Bhushan // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2021. – Vol. 18 (1). – P. 40–55. DOI: 10.1038/s41575-020-0342-4.
7. Michalopoulos G. K. Immune cells in liver regeneration / G. K. Michalopoulos, B. Bhushan // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8 (2). – P. 3628–3639. DOI: 10.18632/oncotarget.12275.
8. Platelet-Rich Plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020 / P. Everts, K. Onishi, P. Jayaram [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21 (20). – P. 7794.

DOI: 10.3390/ijms21207794.

9. Thomas L. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST). In: *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. – Frankfurt : TH Books Verlagsgesellschaft, 1998. – P. 55-65.
10. IFCC Primary reference procedures for the measurements of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 6. Reference procedure for the measurements of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase // *Clin. Chem. Lab Med.* – 2002. – Vol. 40. – P. 734–738.
11. Kunkel H. G. Mechanism and significance of the thymol turbidity test for liver disease / H. G. Kunkel, C. L. Hoagland // *J. Clin. Invest.* – 1947. – Vol. 26 (6). – P. 1060–1071.
12. Contrasting model mechanisms of alanine aminotransferase (ALT) release from damaged and necrotic hepatocytes as an example of general biomarker mechanisms / A. K. Smith, G. E. P. Ropella, M. R. McGill [et al.] // *PLoS Comput Biol.* – 2020. – Vol. 16 (6). – e1007622.
13. Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3 / I. O. Shymanskyi, O. V. Ketsa, M. M. Marchenko, M. M. Veliky // *Ukr. Biochem. J.* – 2018. – Vol. 90 (4). – P. 36–44. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj90.04.036>.
14. May dexpanthenol, platelet-rich plasma, and thymoquinone provide new hope to maintain liver regeneration after partial hepatectomy? / O. Aydın, F. Pehlivanlı, G. Karaca [et al.] // *Turk. J. Gastroenterol.* – 2019. – Vol. 30 (9). – P. 826–834. DOI: 10.5152/tjg.2019.18697.

REFERENCES

1. Mukherji, A., Bailey, S.M., Staels, B., & Baumert, T.F. (2019). The circadian clock and liver function in health and disease. *Journal of Hepatology*, 71 (1), 200-211. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.020.
2. Almazroo, O.A., Miah, M.K., & Venkataramanan, R. (2017). Drug metabolism in the liver. *Clinics in liver disease*, 21(1), 1-20. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.001.
3. Cheng, M.L., Nakib, D., Perciani, C.T., & MacParland, S.A. (2021). The immune niche of the liver. *Clinical Science*, 135(20), 2445-2466. DOI: 10.1042/CS20190654.
4. Kanda, T., Goto, T., Hirotsu, Y., Moriyama, M., & Omata, M. (2019). Molecular mechanisms driving progression of liver cirrhosis towards hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C infections: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1358. DOI: 10.3390/ijms20061358.
5. Baglieri, J., Brenner, D.A., & Kisseleva, T. (2019). The role of fibrosis and liver-associated fibroblasts in the pathogenesis of

hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1723. DOI: 10.3390/ijms20071723.

6. Michalopoulos, G. K., & Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(1), 40-55. DOI: 10.1038/s41575-020-0342-4.
7. Li, N., & Hua, J. (2017). Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget*, 8(2), 3628. DOI: 10.18632/oncotarget.12275.
8. Everts, P., Onishi, K., Jayaram, P., Lana, J.F., & Mautner, K. (2020). Platelet-rich plasma: new performance understandings and therapeutic considerations in 2020. *International journal of molecular sciences*, 21(20), 7794. DOI: 10.3390/ijms21207794.
9. Thomas, L. (1998). Alanine aminotransferase (ALT), Aspartate aminotransferase (AST). *Clinical Laboratory Diagnostics*. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 2, 55-65.
10. IFCC Primary reference procedures for the measurements of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 6. Ref-

erence procedure for the measurements of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin. Chem. Lab Med.*, 2002, 40, 734-738.

11. Kunkel, H.G., & Hoagland, C.L. (1947). Mechanism and significance of the thymol turbidity test for liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 26(6), 1060-1071.

12. Smith, A.K., Ropella, G.E., McGill, M.R., Krishnan, P., Dutta, L., Kennedy, R. C., ... & Hunt, C.A. (2020). Contrasting model mechanisms of alanine aminotransferase (ALT) release from damaged and necrotic hepatocytes as an example of general biomarker mechanisms. *PLoS Computational Biology*, 16(6), e1007622.

13. Shymanskyi, I.O., Ketsa, O.V., Marchenko, M.M., & Veliky, M.M. (2018). Liver cytochrome P450-hydroxylation system of tumor-bearing rats under the influence of ω -3 polyunsaturated fatty acids and vitamin D3. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 90, (4), 36-44. DOI: <https://doi.org/10.15407/ubj90.04.036>.

14. Aydın, O., Pehlivanlı, F., Karaca, G., Aydın, G., Altunkaya, C., Bulut, H., & Aydınuraz, K. (2019). May dextran, platelet-rich plasma, and thymoquinone provide new hope to maintain liver regeneration after partial hepatectomy?. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 30(9), 826-834. DOI: 10.5152/tjg.2019.18697.

Отримано 12.07.2023

Електронна адреса для листування: 1kostya1987@gmail.com

R. V. SALYUTIN, K. O. YUZVYK

Shalimov National Institute of Surgery and Transplantation

THE EFFECT OF AUTOMESOCONCENTRATE OF PLATELETS ON THE FUNCTIONAL STATE OF THE LIVER OF RATS AFTER PARTIAL RESECTION OF THE LIVER PARENCHYMA

The aim of the work: to determine the markers of the functional state of the liver in rats after partial resection of the liver parenchyma under the conditions of using automesoconcentrate of platelets (AMC).

Materials and Methods. Experimental studies were conducted on white Wistar laboratory rats, which were divided into three groups: group I – intact animals (control); group II – animals that underwent resection of the left lobe of the liver without further additional therapy; group III – animals that were injected with AMC after partial resection of the left lobe of the liver.

Results and Discussion. It was established that on in the initial stages after partial liver resection was observed alanine aminotransferase (ALT) hyperenzymemia, aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyltransferase (GHT), which indicates on damage to liver cells and low intensity of processes regeneration. Introduction of AMC already on the 6th day after surgery contributed to the reduction of ALT, AST and GGT in blood serum, with normalization studied indicators on the 18th day of the experiment. The introduction of AMC contributed more significant restoration of the protein-synthesizing function of the liver for what indicate lower values of the thymol test compared to the indicators of the group animals that were not administered AMC.

Administration of AMA triggers faster regenerative processes in the liver, as evidenced by a decrease in aminotransferase hyperenzymemia, HGT and thymol test. The normalization of liver samples indicates the restoration of the structural and functional state of this organ.

Key words: liver; resection; platelet automesoconcentrate; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; γ -glutamyltransferase.