

## АНОТАЦІЯ

*Волошина О. В.* Морфофункціональна характеристика гепатоцитів печінки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі асептичного запалення.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина – Українська медична стоматологічна академія, Полтава, 2020.

Дисертація присвячена вивченню морфофункціонального стану гепатоцитів інтактних щурів, реакції їх на одноразове підшкірне введення кріоконсервованої плаценти та введенні її при гострому експериментальному асептичному запаленні очеревини.

На сьогодні основними ускладненнями гострої хірургічної патології є гостре асептичне запалення очеревини, що за пато- і морфогенезом, клінічними проявами суттєво відрізняється від інших форм запалення. Бактеріальні токсини, продукти аутолізу тканин у великих дозах надходять у лімфу, загальний кровообіг та пошкоджують органи-цілі, що відносяться до високодиференційованих систем організму: легені, печінка, нирки та наднирники, центральна нервова система. Це призводить до порушення їх структурно-функціональної організації та метаболізму, що сприяє прогресуванню ендотоксемії.

Печінка відіграє центральну роль в обміні речовин: білковому, вуглеводному, ліпідному, біологічно-активних речовин, вітамінів і мікроелементів. Порушення структури і функції гепатоцитів займає одне з провідних місць в патогенезі асептичного запалення очеревини у щурів. В літературі описані експериментальні дані та позитивні клінічні результати щодо ефективного використання кріоконсервованої плаценти при різних патологічних станах, в тому числі її вплив на перебіг запальних процесів. Але досить багато аспектів у питаннях механізмів дії тканинної терапії залишаються недостатньо вивченими, що й зумовлює необхідність подальших досліджень у даній області.

Метою роботи було визначити морфофункціональну характеристику гепатоцитів у інтактних щурів, реакцію їх на одноразове підшкірне введення кріоконсервованої плаценти та введення її при гострому експериментальному асептичному запаленні очеревини.

Завданнями дослідження було:

1. Визначити особливості структурної організації та метричних показників гепатоцитів у інтактних щурів.

2. Вивчити морфофункціональний стан гепатоцитів при одноразовому підшкірному введенні кріоконсервованої плаценти.

3. Дослідити зміни гепатоцитів при експериментальному асептичному запаленні.

4. Встановити особливості впливу одноразового підшкірного введення кріоконсервованої плаценти на морфофункціональний стан гепатоцитів при гострому експериментальному асептичному запаленні очеревини.

Для досягнення мети та вирішення поставлених завдань дослідження використані гістологічний, електронномікроскопічний, морфометричний метод, метод варіаційної статистики.

У результаті комплексних морфологічних досліджень вперше отримані нові дані стосовно особливостей структурної перебудови гепатоцитів печінки інтактних щурів, після одноразового підшкірного введення кріоконсервованої плаценти та введенні її при гострому експериментальному асептичному запаленні очеревини. А також морфометричних параметрів діаметру гепатоцитів, їх площі, ядерно-цитоплазматичного співвідношення, діаметру та площі ядер гепатоцитів у щурів інтактною групи.

Встановлено, що у щурів інтактною групи структурна організація печінки принципово від людини не відрізняється. Вона має часточкову будову. В тонких міжчасточкових сполучнотканинних прошарках судини формують триаду - міжчасточкову артерію та міжчасточкову вену, які супроводжує міжчасточкова жовчна протока. Між синусоїдами розміщуються гепатоцити у вигляді печінкових балок. Середній показник

площі гепатоцитів складає у тварин інтактної групи  $1364,226 \pm 35,982$  мкм<sup>2</sup>, ядерно-цитоплазматичне співвідношення –  $0,196 \pm 0,006$ . Середня площа ядер дорівнює  $249,304 \pm 5,861$  мкм<sup>2</sup>.

Доведено, що при введенні щурам кріоконсервованої плаценти змінюється клітинний і судинний компоненти печінки, що проявляється повнокров'ям і розширенням синусоїдів на ранніх термінах спостереження, з 7-ої до 14 доби збільшуються діаметри просвітів навколочасточкових та центральних вен. На підставі отриманих даних встановлено, що відновлення перфузії крові і структурної організації судин визначається на 21-у добу експерименту. З 7-ої доби в гепатоцитах виявляється коагуляція цитоплазми та дрібнокрапельна гідропічна дистрофія, кількість двоядерних клітин збільшена, локально візуалізувались гепатоцити з великими гіперхромними ядрами, помірно розширені жовчні капіляри. На 10-у добу виявляється вогнищева гідропічна дистрофія цитоплазми в окремих гепатоцитах, двоядерні клітини зустрічаються зрідка. Відновлення гістофункціонального стану гепатоцитів визначається на 14-у добу спостереження.

Після дії ККП визначаються зміни метричних параметрів гепатоцитів. Середня площа клітин і ядер прогресивно збільшувалась з 1-ої до 10-ої доби і сягала 37 % і 42 % відповідно ( $p < 0,001$ ). До 30-ої доби спостерігалась тенденція до зменшення показників, але повного відновлення не визначається. Значення ядерно-цитоплазматичного індексу збільшились на 24,9 % на 2-у добу і відновились на 3-ю.

Встановлено, що на ранніх термінах гострого експериментального асептичного запалення очеревини спостерігаються помірно розширені, повнокровні центральні вени, просвіти синусоїдів нерівномірно розширені. Балкова структура печінкових часточок є збереженою. У більшості гепатоцитів ядра контурувалися, окремі з ознаками каріопікнозу або каріолізісу. Спостерігається зерниста дистрофія цитоплазми. Локально визначаються лімфо-гістіоцитарні інфільтрати. Деструктивні зміни гепатоцитів максимально проявляються на 21-у добу експерименту.

Більшість клітин містить пікнотичні ядра, великі вакуолі в перинуклеарній зоні, що є ознаками цитолізу більшості гепатоцитів. Розширені синусоїди заповнені форменими елементами крові, в ендотеліоцитах спостерігаються значні деструктивні зміни. До 30-ої доби експерименту на тлі зруйнованих гепатоцитів виявляються у невеликій кількості цілі одноядерні гепатоцити, зменшилась кількість тромбів у центральних венах, відновлювались судини на периферії печінкових часточок, але повного відновлення структурних компонентів не встановлено.

Доведено, що гостре експериментальне асептичне запалення очеревини впливає на метричні показники гепатоцитів, що проявляється збільшенням на 3-ю добу ядерно-цитоплазматичного індексу на 47 % ( $p < 0,001$ ), який до 30-ї доби не відновився і на 24 % ( $p < 0,001$ ) переважає значення в інтактній групі тварин. На тлі недостовірних змін площі клітин, площа ядер на 66 % ( $p < 0,001$ ) збільшується на 7-у добу і до 30-ї доби на 19 % є більшою за значення в інтактній групі ( $p < 0,001$ ). Кількість багатоядерних гепатоцитів прогресивно зменшувалась до 10-ї доби на 37 %.

При підшкірному введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого експериментального асептичного запалення очеревини в клітинному і судинному компонентах часточок печінки щурів до 10-ї доби експерименту встановлені стереотипні зміни як і в групі з асептичним запаленням. З 14-ї доби спостереження у складі часточок визначаються переважна більшість незмінених гепатоцитів та гемокапілярів, ультраструктура їх була наближена до печінки тварин інтактної групи. На 30-у добу структура гепатоцитів і гемомікросудин відновились.

Ядерно-цитоплазматичний індекс на 7-у добу експерименту збільшується на 47 % ( $p < 0,001$ ) і відновлюється до 30-ї доби. Середня площа клітин змінювалась недостовірно. Показники середньої площі ядер гепатоцитів на 5-у добу спостереження на 32 % ( $p < 0,001$ ) перевищує значення в інтактній групі щурів і до 30-ї доби вірогідно від значень в

інтактній групі не відрізняється. Кількість багатоядерних гепатоцитів вірогідно не змінюється протягом спостереження.

Встановлено, що при гострому експериментальному асептичному запаленні очеревини застосування біологічно активних речовин, які містить кріоконсервована плацента, дозволяє нормалізувати морфологічний стан компонентів печінкової часточки. Отже, протизапальний ефект біологічно активних речовин кріоконсервованої плаценти проявляється обмеженням альтеративних і посиленням репаративних явищ.

*Ключові слова:* печінка, гепатоцит, гостре експериментальне асептичне запалення, введення, кріоконсервована плацента, щури.

## **SUMMARY**

*Voloshina O.V.* Morphofunctional characteristics of the hepatocytes in administration of cryopreserved placenta in aseptic inflammation.

PhD thesis on the Specialty 14.03.09. – “Histology, Cytology and Embryology” (222 – Medicine) – Ukrainian Medical Stomatological Academy, Poltava, 2020.

The dissertation is aimed at the study of morphofunctional state of hepatocytes of intact rats, their response to single-dose subcutaneous administration of cryopreserved placenta (CPP) and its administration in experimental acute aseptic peritoneal inflammation (EAAPI).

Currently, the main complications of acute surgical pathology are the acute aseptic inflammation of the peritoneum, which is significantly different from other forms of inflammation by its clinical manifestations in patho- and morphogenesis. Bacterial toxins and tissue autolysis products enter the lymph and circulatory system in large doses, damaging the target organs that are assigned to highly differentiated systems of the body: lungs, liver, kidneys and adrenal glands, central nervous system. This leads to disruption of their structural and functional

organization and metabolism, which promotes the progression of endotoxemia.

The liver play a leading role in the protein, carbohydrate, lipid, biologically active substances, vitamins and microelements metabolism. Disruption of the structure and function of hepatocytes occupies one of the leading places in the pathogenesis of aseptic inflammation of the peritoneum in rats. The literature describes experimental data and positive clinical results on the effective use of cryopreserved placenta in various pathological conditions, including its influence on the course of inflammatory processes. However, many aspects of the mechanisms of action of tissue therapy remain insufficiently studied, which necessitates further research in this area.

The aim of the study was to determine the morphofunctional characteristics of hepatocytes in intact rats, their reaction to a single subcutaneous injection of cryopreserved placenta and its introduction in acute experimental aseptic inflammation of the peritoneum.

The objectives of the research were:

1. To determine the features of structural organization and metric parameters of hepatocytes in intact rats.
2. To study the morphofunctional state of hepatocytes with a single subcutaneous injection of cryopreserved placenta.
3. Investigate changes in hepatocytes in experimental aseptic inflammation.
4. To establish the features of the effect of a single subcutaneous injection of cryopreserved placenta on the morphofunctional state of hepatocytes in acute experimental aseptic peritonitis.

To achieve the goal and solve the objectives of the research were used histological, electron microscopic, morphometric method, the method of variation statistics.

As a result of complex morphological researches, new data were obtained for the first time on the features of structural rearrangement of hepatocytes of intact rats, after a single subcutaneous injection of cryopreserved placenta and its introduction in acute experimental aseptic inflammation of the peritoneum. As well

as morphometric parameters of hepatocyte diameter, their area, nuclear-cytoplasmic ratio, diameter and area of hepatocyte nuclei in rats of the intact group.

It was found, that in rats of the intact group, the structural organization of the liver is not fundamentally different from humans. It has a lobular structure. In the thin interparticle connective tissue layers, the vessels form a triad - the interparticle artery and the interparticle vein, which are accompanied by the interparticle bile duct. Hepatocytes in the form of hepatic beams are located between sinusoids. The average hepatocyte area in animals of the intact group is  $1364.226 \pm 35.982 \mu\text{m}^2$ , the nuclear-cytoplasmic ratio is  $0.196 \pm 0.006$ . The average area of the nuclei is  $249,304 \pm 5,861 \mu\text{m}^2$ .

It is proved that the introduction of cryopreserved placenta in rats changes the cellular and vascular components of the liver, which is manifested by plethora and dilation of sinusoids in the early stages of observation, from the 7th to the 14th day the diameters of the lumens of the peripheral and central veins increase. Based on the obtained data, it was found that the restoration of blood perfusion and structural organization of blood vessels is determined on the 21st day of the experiment. From the 7th day in hepatocytes coagulation of cytoplasm and small-droplet hydropic dystrophy is revealed, the number of dinuclear cells is increased, hepatocytes with large hyperchromic nuclei are locally visualized, moderately dilated bile capillaries. On the 10th day there is a focal hydropic dystrophy of the cytoplasm in some hepatocytes, binuclear cells are rare. Restoration of the histofunctional state of hepatocytes is determined on the 14th day of observation.

After action of CPP changes of metric parameters of hepatocytes are defined. The average area of cells and nuclei progressively increased from the 1st to the 10th day and reached 37% and 42%, respectively ( $p < 0.001$ ). By the 30th day, there was a tendency to decrease, but full recovery is not determined. The values of the nuclear cytoplasmic index increased by 24.9% on the 2nd day and resumed on the 3rd.

It had been established that in the early stages of acute experimental aseptic

peritoneal inflammation there are moderately dilated, full-blooded central veins, sinusoidal lumens unevenly dilated. The beam structure of the liver lobes is preserved. In most hepatocytes, the nuclei were contoured, some with signs of karyopyknosis or karyolysis. There is granular dystrophy of the cytoplasm. Lympho-histiocytic infiltrates are determined locally. Destructive changes in hepatocytes are most pronounced on the 21st day of the experiment. Most cells contain pyknotic nuclei, large vacuoles in the perinuclear zone, which are signs of cytolysis of most hepatocytes. Dilated sinusoids are filled with shaped elements of blood, in endotheliocytes there are significant destructive changes. By the 30th day of the experiment, against the background of destroyed hepatocytes, a small number of whole mononuclear hepatocytes were detected, the number of clots in the central veins decreased, vessels on the periphery of the hepatic lobules were restored, but complete restoration of structural components was not found.

It is proved that acute experimental aseptic inflammation of the peritoneum affects the metric parameters of hepatocytes, which is manifested by an increase on the 3rd day of the nuclear cytoplasmic index by 47% ( $p < 0,001$ ), which by the 30th day has not recovered and by 24% ( $p < 0.001$ ) predominates in the intact group of animals. Against the background of insignificant changes in the area of cells, the area of nuclei increases by 66% ( $p < 0.001$ ) on the 7th day and by the 30th day by 19% is higher than the value in the intact group ( $p < 0.001$ ). The number of multinucleated hepatocytes progressively decreased by the 10th day by 37%.

At subcutaneous administration of cryopreserved placenta on the background of acute experimental aseptic inflammation of the peritoneum in the cellular and vascular components of the lobes of the rat liver to the 10th day of the experiment, stereotyped changes were found as in the group with aseptic inflammation. From the 14th day of observation, the vast majority of unchanged hepatocytes and hemocapillaries are determined in the composition of the lobes, their ultrastructure was close to the liver of animals in the intact group. On the 30th day, the structure of hepatocytes and hemomicrovascular was restored.

It was found that the nuclear cytoplasmic index on the 7th day of the

experiment increases by 47% ( $p < 0.001$ ) and recovers by the 30th day. The average cell area varied insignificantly. Indicators of the average area of hepatocyte nuclei on the 5th day of observation by 32% ( $p < 0.001$ ) exceeds the value in the intact group of rats and to the 30th day probably does not differ from the values in the intact group. The number of multinucleated hepatocytes probably does not change during observation.

It is established that in acute experimental aseptic peritonitis the use of biologically active substances contained in cryopreserved placenta allows to normalize the morphological state of the components of the hepatic lobe. Therefore, the anti-inflammatory effect of biologically active substances of cryopreserved placenta is manifested by the restriction of alterative and increased reparative phenomena.

*Key words:* liver, hepatocyte, acute experimental aseptic inflammation, administration, cryopreserved placenta, rats.

## **НАУКОВІ ПРАЦІ, В ЯКИХ ОПУБЛІКОВАНІ ОСНОВНІ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Волошина О.В. Методи експериментальних досліджень гепатоцитів при асептичному перитоніті / О.В. Волошина, А.С. Григоренко, І.М. Донець // Вісник Української медичної стоматологічної академії. Актуальні проблеми сучасної медицини. – Полтава. – 2018. – Т. 18. – Вип. 2(62) – С. 151-154. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел стосовно морфологічних методів дослідження, проведення експерименту, аналіз результатів, написання розділу 2 дисертації, відповідь рецензентам).*
2. Волошина О.В. Морфологічна структура гепатоцитів при асептичному запаленні очеревини щурів / О.В. Волошина, В.І. Шепітько // Світ медицини та біології. – 2018. – №4(66). – С. 149-151. *(Особистий внесок здобувача: проведення експерименту, проведення гістологічних досліджень, опис електронномікроскопічного дослідження, аналіз результатів, статистична*

*обробка результатів, написання розділу 4 та 6 дисертації, відповідь рецензентам).*

3. Шепітько В.І. Порівняльна характеристика морфології гепатоцитів при впливі різних патогенних факторів / В.І. Шепітько, О.В. Волошина, Л.Б. Пелипенко // Вісник проблем біології і медицини. – 2019.– Т.2(149). – Вип.1. – С. 55-59. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, написання розділу огляд літератури, відповідь рецензентам).*

4. Voloshyna O.V. Structural organization of rat hepatic cells and their correction with cryopreserved placenta in experimental peritonitis / Voloshyna O.V. // East European Science Journal. – 2019. –3 №10 (50). – part 2. – P. 23-28.

#### НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ЗАСВІДЧУЮТЬ АПРОБАЦІЮ МАТЕРІАЛІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Волошина О.В., Шепітько В.І. Електронномікроскопічна характеристика гепатоцитів печінки у щурів в нормі / О.В. Волошина, В.І. Шепітько. Матеріали III Всеукраїнської науково-практичної конференції „Морфологія людини та тварин”, присвяч. 70-й річниці з дня народження О.І. Цебржинського, 2-3 листопада 2017 р. – Миколаїв. – С. 36-37. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, оформлення тексту публікації).*

2. Шепітько В.І. Порушення структури гепатоцитів на тлі асептичного запалення та можливий взаємозв'язок з органами порожнини рота / В.І. Шепітько, Т.П. Скрипнікова, О.В. Волошина // Матеріали міжнародної заочної наук. практ. конф., присвяч. 95-річчю від дня народження проф. Т.П. Максименка "Актуальні питання стоматології". – Полтава. – 2018. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, аналіз результатів власного дослідження, оформлення тексту публікації).*

3. Волошина О.В. Запальні захворювання в порожнині рота та їх роль в функціональному порушенні печінкових клітин / О.В. Волошина, В.І. Шепітько // Матеріали обласної наук. прак. конф. "Актуальні питання дитячої стоматології", присвяч. пам'яті к.мед.н., доц. Павленко Л.Г., стендова доповідь, 4 грудня 2018 р. – Полтава. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, аналіз результатів власного дослідження, оформлення тексту публікації)*.
4. Волошина О.В. Динаміка ультраструктурних змін гепатоцитів при експериментальному перитоніті / О.В. Волошина, А.С. Григоренко. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря», 10-11 квітня 2019 року. – Вінниця: „Твори”. – С.16-18. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, аналіз результатів власного дослідження, оформлення тексту публікації)*.
5. Волошина О.В. Електронно-мікроскопічні зміни гепатоцитів щурів при запальному процесі очеревини / О.В. Волошина. Матеріали наук. прак. конф., присвячена 100-річчю з дня народження проф. М.А. Дудченка "Від нових наукових концепцій в терапії до конкретного пацієнта", стендова доповідь, 29 серпня 2019 р. – Полтава.
6. Волошина О.В. Морфологічні зміни структур печінки щурів при одноразовій трансплантації кріоконсервованої плаценти / О.В. Волошина, В.І. Шепітько. Збірник наук. практ конф. „Прикладні аспекти морфології. Експериментальні і клітинні дослідження”, 10-11 жовтня 2019 р. – Тернопіль. – С.27-29. *(Особистий внесок здобувача: пошук, аналіз та узагальнення літературних джерел, проведення експерименту та аналіз результатів власного дослідження, оформлення тексту публікації)*.
7. Волошина О.В. Ультраструктура гепатоцитів щурів при одноразовому введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного перитоніту / О.В. Волошина. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції

молодих учених „Медична наука в практику охорони здоров'я”, 22 листопада 2019 р. – Полтава. – С. 44-45.

## НАУКОВІ ПРАЦІ, ЯКІ ДОДАТКОВО ВІДОБРАЖАЮТЬ НАУКОВІ РЕЗУЛЬТАТИ ДИСЕРТАЦІЇ

8. Патент України №134352 на корисну модель. Спосіб корекції гепатоцитів щурів трансплантацією кріоконсервованої плаценти на фоні асептичного запалення очеревини щурів / Волошина О.В., Шепітько В.І., Пелипенко Л.Б., Григоренко А.С. – №134352 U20182574; заявл.17.12.2018 р., опубл. 10.05.2019 р. Бюл. №.9.