

УДК 577.1:[616.36-004:599.323.4]

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ТОКСИЧЕСКОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У БЕЛЫХ КРЫС****\*Лебедева Е.И., \*\*Прудников В.С., \*Мяделец О.Д.****\*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
г. Витебск, Республика Беларусь,****\*\* УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь**

*В эксперименте получена модель токсического цирроза печени путем интрагастрального введения четыреххлористого углерода и этанола методом свободного выпаивания. Стандартизацию модели осуществляли в ходе морфологических и биохимических исследований. Выявлены особенности данной модели с учетом пола животных.*

*The model of a toxic liver cirrhosis was obtained in the experiment by intragastric administration of carbon tetrachloride and ethanol by free watering. Standardization of model was performed in the morphological and biochemical studies. The features of this model considering sex of the animals were detected.*

**Ключевые слова:** экспериментальная модель, цирроз печени, белые крысы, четыреххлористый углерод, этанол.

**Keywords:** experimental model, cirrhosis, white rats, carbon tetrachloride, ethanol.

**Введение.** По мере формирования производственного фармацевтического сектора усиливается интерес к разработке и испытанию лекарственных средств. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования по созданию экспериментальных моделей патологических процессов, которые по своим проявлениям, реакциям клеточных популяций и биохимическому статусу в значительной степени соответствовали бы протеканию заболеваний у человека. Важность создания моделей *in vivo* для скрининга лекарственных препаратов определяется необходимостью выявления эффектов лекарств в естественных условиях существования системного кровотока, сохранности микроциркуляторного русла, иннервации, а главное – функционирующих гематопаренхиматозных барьеров, воспроизведение которых в полной мере невозможно в органах и тканевых культурах *in vitro* [8].

В настоящее время количество экспериментальных моделей поражения печени так велико, что их практически невозможно перечислить [2, 7, 14, и многие другие].

Отсутствие стандартизованных воспроизводимых экспериментальных моделей существенно затрудняет сравнительную оценку результатов многочисленных исследований эффективности лекарственных средств, а в ряде случаев ставит под сомнение прогноз достижения целевого эффекта у человека [1]. Моделирование цирроза печени на крысах представляет собой непростую задачу, решение которой во много раз определяет возможность комплексной оценки гепатопротективных средств и побочных эффектов лекарственных препаратов. Можно утверждать, что в настоящее время модель цирроза печени, вызванная четыреххлористым углеродом (тетрахлорметаном,  $CCl_4$ ), является наиболее распространенной [9, 10, 11, 12, 15, 16, 17]. К сожалению, для моделирования цирроза достаточно часто применяются различные варианты введения  $CCl_4$ : подкожно [10], интрагастрально [12], интраперитонеально [17] 1-3 раза в неделю. При этом доза колеблется от 0,05 до 0,30 мл/кг или ингаляционно [15]. При введении  $CCl_4$  растворяют в минеральном или оливковом масле [13]. Длительность введения может значительно колебаться – от 9 до 30 недель [11, 12, 13]. Как следствие, степень патологических изменений в печени, достигаемая в подобных экспериментах, может сильно варьировать, тем самым значительно осложняя сравнение данных, получаемых разными авторами. Применение различных вариантов эксперимента приводит к формированию портального фиброза и редко сопровождается истинными цирротическими изменениями гистоархитектоники печени с формированием соединительно-тканых септ, ограничивающих псевдодольки [8]. В связи с этим результаты исследований противцирротической эффективности препаратов, выполненных на таких моделях, зачастую без должного гистологического контроля, следует признать несостоятельными [1, 8]. Большинство авторов не уделяет внимания динамике морфологических изменений печени и не учитывает гендерные различия. Более существенные нарушения функции печени удается получить при комбинированном введении  $CCl_4$  и этанола. Механизм повреждения паренхимы печени при этом аналогичен, однако степень и глубина повреждения клеток повышается вследствие синергизма этих веществ. В моделировании цирроза во избежание регенерации важно, чтобы между приемами яда не было продолжительных перерывов [4]. В связи с этим цель настоящего исследования состояла в отработке экспериментальной модели токсического цирроза печени у белых крыс для оценки эффективности лекарственных средств.

**Материал и методы исследования.** Экспериментальная часть работы была выполнена на базе НИЛ Витебского государственного медицинского университета. Биохимические и морфологические исследования выполнены в НИИПВМ и Б Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины. Формирование цирроза печени и отработка методики выполнена на 164 половозрелых беспородных белых крысах обоего пола массой 180-250г в осенне-зимний период, причем 50 животных использовали в отработке методики, а 24 служили контролем. Животные были разделены на группы: 6 опытных (n=12, 6 самцов и 6 самок) и контрольная (n=24, 12 самцов и 12 самок). Для характеристики протекания патологического процесса группы животных выводили из опыта через 3, 6, 9, 12, 16, 19 нед эксперимента.

В опытах использовали белых крыс одного возраста, прошедших карантинный режим вивария и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. В параллельно исследуемых группах животные имели

одинаковую массу тела. Животных содержали в пластиково-металлических клетках с опилками, по 6 особей в каждой клетке, при естественном освещении, со свободным доступом к корму и воде. Чтобы избежать влияния суточных биоритмов, все исследования проводили в одно и то же время суток. Экспериментальная часть работы проведена согласно правилам лабораторной практики РБ (приложение к приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь № 31 от 31.10.2006) и международным рекомендациям Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных и иных целях (г. Странбург, 1986).

Токсический цирроз печени вызывали путем хронической интоксикации белых крыс органическим гепатотропным ядом –  $\text{CCl}_4$ . За основу была принята модель внутрижелудочной затравки 50%-ным масляным раствором 3 раза в неделю в дозе 0,3 мл/100г массы животного [4]. Однако применение данной методики в предложенном режиме оказалось невозможным ввиду массовой гибели животных от острой печеночной недостаточности. Поэтому использовали отработанную опытным путем методику интрагастрального введения с помощью зонда 40%-го масляного раствора  $\text{CCl}_4$  в дозе 0,2 мл/100г массы животного два раза в неделю, в утренние часы за 4 часа до кормления в течение 19 недель. Параллельно с этим вместо воды в качестве питья крысы получали 5%-ный раствор этанола из поилок в режиме свободного доступа на протяжении всего опыта. Контрольные (плацебо) животные получали эквивалентное количество растворителя  $\text{CCl}_4$  (оливковое масло) и в качестве питья использовали кипяченую воду из поилок в режиме свободного доступа. Интактные животные – крысы тех же возрастов и массы, что и экспериментальные

Особое внимание уделяли показателям, характеризующим протекание патологических процессов и возможности применения отработанной модели для оценки эффективности лекарственных препаратов. Для этого проводили регулярное наблюдение за животными, во время которого отмечали потребление корма и воды, изменения внешних признаков (волосного покрова, видимых слизистых оболочек), особенности поведения, а также осуществляли еженедельное взвешивание. Вывод животных из опыта осуществляли одномоментной гильотинной декапитацией с отбором крови для биохимического исследования, проведением комплекса гистологических и гистохимических исследований печени, а также биометрических показателей (масса тела, относительная и абсолютная масса печени).

Для выявления общих гистологических и фибропластических изменений срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Массону. Для проведения гистохимических исследований криостатные срезы окрашивали смесью суданов III и IV с целью выявления нейтральных жиров. Изучение гистологических препаратов выполняли с помощью микроскопа OLYMPUS BX 51 со встроенной видеокамерой OLYMPUS XC 30 (Япония). Биохимические исследования выполняли на биохимическом автоматическом анализаторе EuroLyser (Австрия) с использованием стандартных диагностических наборов реактивов фирмы «Cormau» (Польша) [3].

Статистический анализ полученных результатов проводили в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007 и STATISTIKA 6.1. Определяли средние значения и стандартные отклонения. Учитывали малую выборку животных, неправильное распределение исследуемых признаков, а также неравенство дисперсий. Для статистической обработки полученных результатов, был использован непараметрический U-критерия Манна-Уитни. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследований.** В ходе эксперимента у подопытных животных отмечалась желтушность шерстного и кожного покрова в области шеи, туловища, хвоста и дистальных отделов конечностей. При введении каждой очередной дозы  $\text{CCl}_4$  спустя несколько мин наблюдали их возбуждение, выражавшееся в беспокойстве, резких движениях передних конечностей, попытке зарывания в подстилку и вытягивание тела. Эти изменения исчезали примерно через один час.

К концу эксперимента клиническая картина подопытных белых крыс характеризовалась следующими изменениями: бледностью конъюнктивы, снижением двигательной активности, заторможенностью, дряблостью скелетных мышц, выраженной желтушностью хвоста и потерей его упругости, тусклой окраской, взъерошенностью и загрязненностью шерстного покрова, обширными участками облысения в области брюшной стенки, потерей аппетита и отказом от приема корма. Животные с трудом находили пищу, что может быть связано либо с нарушением зрения, либо обоняния, либо двигательной реакцией, либо совокупностью этих процессов. Животные слабо реагировали на прикосновение и другие манипуляции. Отмечалась замедленная рефлекторная реакция на звуковые раздражители. Описанные выше клинические признаки наиболее выражено проявлялись у самцов, и их смертность в 2 раза достоверно превысила смертность самок во время эксперимента (рисунок 1). У контрольных и экспериментальных животных был выявлен достоверный одинаковый прирост массы тела в 1, 2 раза как у самцов, так и у самок.



Рисунок 1 – Динамика смертности животных во время эксперимента

Выраженная патология была отмечена у экспериментальных животных при заборе материала: обнаружены плотная и бугристо-узловатая поверхность печени красновато-желтой окраски, спленомегалия, увеличение и зернистая дистрофия почек, серозный лимфаденит портальных и брыжеечных лимфоузлов, зернистая дистрофия миокарда, метеоризм желудка и кишечника.

У отдельных животных через 16 и 19 нед развивался асцит. Объем жидкости светло-желтого цвета в брюшной полости составлял 10% -12% от массы тела. При вскрытии у них отмечалось наличие крови алого цвета с пониженной свертываемостью. Содержание альбумина в сыворотке крови таких животных было достоверно резко снижена по сравнению с контролем и животными с циррозом без асцита. Развитие асцита у отдельных экспериментальных животных нельзя считать случайностью. Его наличие у отдельных животных свидетельствует о возможности моделирования данного состояния у белых крыс. Патогенез асцита при циррозе сложен и не полностью установлен. За его развитие признается ответственным ряд факторов: портальный блок, гипоальбуминемия, нарушения системной гемодинамики [5].

Исследование печени контрольных крыс и животных с экспериментальным циррозом показало, что относительная масса печени подопытных животных достоверно увеличивалась по сравнению с группой контроля: у самцов в 1,7 раза, а у самок – в 1,4 раза (рисунок 2). Увеличение массового коэффициента печени свидетельствует о гемодинамических нарушениях в этом органе.

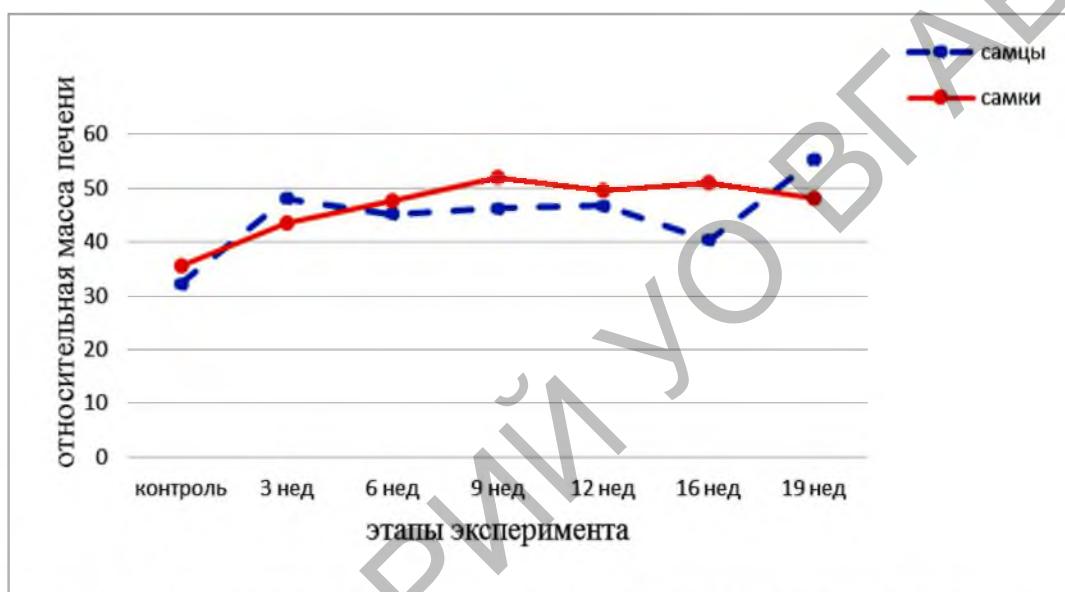


Рисунок 2 – Динамика изменения относительной массы печени у животных во время эксперимента

Гистологическая картина печени животных контрольной группы в целом соответствовала критериям нормы.

Гистологический анализ органа подопытных крыс показал развитие хронического патологического процесса в динамике, основными проявлениями которого являлся цирроз печени. В гепатоцитах определяли глыбчатую агрегацию матрикса, соответствующей картине зернистой дистрофии. В этих же клетках выявляли мелкие и средней величины вакуоли с ровными контурами (рисунок 3). При окраске суданом эти вакуоли интенсивно окрашивались в желтый, оранжевый, оранжево-желтый, оранжево-красный и красный цвета.

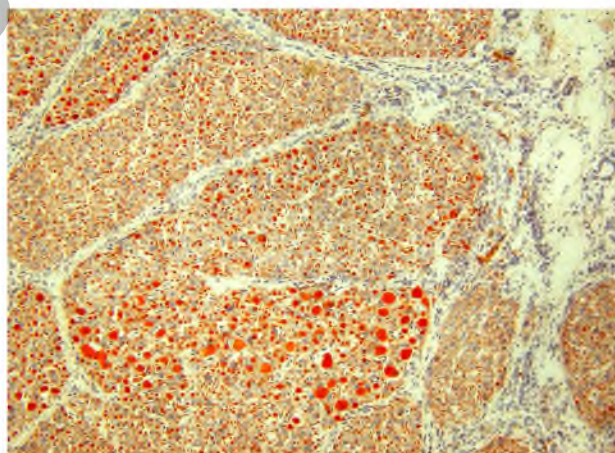


Рисунок 3 – Срез печени животных через 19 нед эксперимента. Окраска смесью суданов III и IV. Ув. 200

В ряде клеток наблюдали крупные жировые вакуоли. При разрушении этих клеток свободнолежащие капли жира определялись в межклеточном пространстве. Микроскопическая картина печени характеризовалась также потерей балочной структуры паренхимы, интенсивным разрастанием



соединительной ткани вокруг портальных трактов, узловой трансформацией паренхимы с формированием ложных долек, разделенных между собой фиброзными тяжами (рисунок 4).

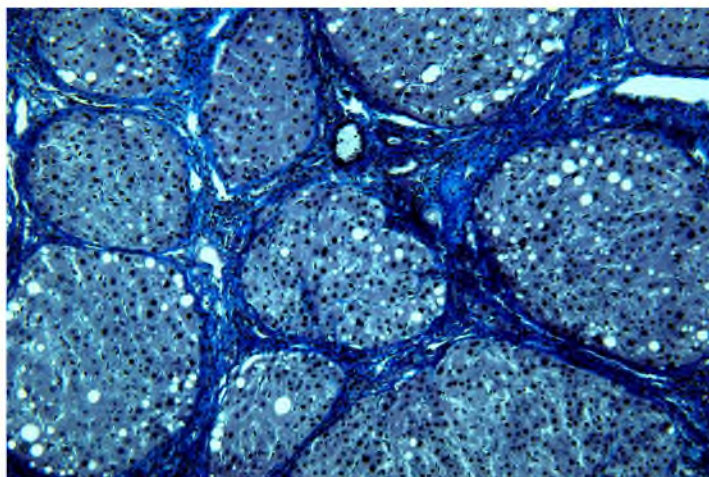


Рисунок 4 – Срез печени животных через 19 нед эксперимента. Окраска по методу Массона. Ув. 200

Наблюдалось расширение и кровенаполнение как портальных сосудов так и синусоидных капилляров, а также сладжирование эритроцитов и лейкостаз. На протяжении всего эксперимента выявлялась активизация новообразования кровеносных сосудов. Повышение портосистемного градиента является пусковым фактором как артериального, так и венозного ангиогенеза. Гипоперфузия синусоидов – второй важный фактор инициации ангиогенеза. На начальных этапах развития портальной гипертензии ангиогенез может рассматриваться как компенсаторная реакция. В дальнейшем этот процесс участвует в прогрессировании портальной гипертензии. Восстановление структуры и функции печени при ее поражениях возможно только при адекватном кровоснабжении органа. Стимуляция ангиогенеза и оксигенации печени являются важнейшими задачами гепатологии [6]. Дальнейшее изучение ангиогенеза в эксперименте позволит существенно расширить лечебные возможности заболеваний печени.

Наряду с дистрофией, некрозом, фибропластическими процессами и перестройкой печеночных долек наблюдались признаки регенераторной активности. Она выражалась в утолщении терминальной пластинки, наличии небольшого количества двуядерных и крупноядерных клеток. Несмотря на непрекращающееся прогрессирование патологического процесса в печени, интенсивная регенерация исчезала только к концу эксперимента (19 нед). Это подтверждает тот факт, что введение CCL<sub>4</sub> и этанола методом свободного выпайвания вызывает как повреждение печени, так и стимуляцию регенераторных процессов. В паренхиме печени выявлялась также компенсаторно-приспособительная пролиферация междольковых желчных протоков. Часто возле этих протоков определялись лимфо-гистиоцитарные пролифераты.

При изучении биохимических показателей сыворотки крови животных с циррозом печени, описанных в предыдущей работе [3], выявлены гиперферментемия, гипогликемия, гипоальбуминемия, гиперурикемия, гиперлипидемия, гипербилирубинемия, а также снижение уровня мочевины и увеличение уровня креатинина. Показаны достоверные половые отличия по большинству биохимических показателей сыворотки крови контрольных и экспериментальных животных.

**Заключение.** Стандартизация и дальнейшее изучения экспериментальной патологии печени позволит унифицировать сравнение эффективности лекарственных препаратов. Данная экспериментальная модель может быть использована при доклиническом исследовании, а также в научно-исследовательских целях.

**Литература.** 1. Арутюнян И.В. Моделирование цирроза печени на лабораторных животных / И.В. Арутюнян, А.В. Макаров, Т.Х. Фатхудинов, Г.Б. Большакова // Клиническая экспериментальная морфология. – 2012. – №2. – С. 45–50. 2. Кедровская Н.А. Иммуномодулирующие и гепатопротективные эффекты различных лекарственных форм фосфоалива в условиях индометацинового токсического поражения печени / Н.А. Кедровская, О.В. Белоконова // Курский научно-практический вестник "Человек и здоровье". – 2009. – №4. – С. 5–10. 3. Лебедева Е.И. Половые биохимические различия сыворотки крови у белых крыс при экспериментальном циррозе / Е.И. Лебедева // Новости медико-биологических наук. – 2014. – Т. 10, №4. – С. 165–170. 4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Ч. 1. М: Гриф и К, 2012. – 944 с. 5. Силивончик, Н.Н. Лечение осложнений цирроза печени: метод. пособие / Н.Н. Силивончик. – Минск: Изд-во БГМУ, 2000. – 44 с. 6. Слета И.В. Микрогемоциркуляция печени при различных способах лечения экспериментального цирроза / И.В. Слета [и др.] // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 242. 7. Толстикова Т.Г. Биохимические показатели крови и количество гепатоцитов в печени крыс с токсическим гепатитом при действии аланинамида бетулоновой кислоты / Т.Г. Толстикова [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – №5. – С. 120–123. 8. Чепур С.В. Особенности экспериментального моделирования соматических и неврологических заболеваний для оценки эффективности лекарственных препаратов / С.В. Чепур [и др.] // Биомедицина. – 2012. – №1. – С. 16–28. 9. Ahmed S. K. Role of bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of CCL<sub>4</sub> induced liver fibrosis in albino rats: a histological and immunohistochemical study / S. K. Ahmed [et al.] // International Journal of Stem Cells. – 2014. – Vol. 7, No. 2. – P. 87-97. 10. Domenicali M. A novel model of CCL<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites in the mouse / M. Domenicali [et al.] // J. Hepatol. – 2009. – Vol. 51, N.6. – P. 991-9. 11. Dongmei Qin Effect of cichorium glandulosum extracts on CCL<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis/ Qin Dongmei [et al.] // Iran Red Crescent Med J. – 2013. – Vol. 15, N.12. – P. 1-8. 12. Goldani H.A. The role of food restriction on CCL<sub>4</sub>-induced cirrhosis model in rats / H.A. Goldani [et al.] // Exp Toxicol Pathol. – 2007. – Vol. 58, N.5. – P. 331-7. 13. Lessa A.S. Ultrasound imaging in an experimental model of fatty liver disease and cirrhosis in rats / A.S. Lessa [et al.] // BMSVetRes. – 2010. – Vol. 6, N.6. – P. 6-13. 14. Olaleye M. T. Protective effects of parinari curatellifolia flavonoids against acetaminophen-induced hepatic necrosis in rats / M. T. Olaleye // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2014. – N.21. – P. 486-492. 15. Vasina V. Portal hypertension and liver cirrhosis in

rats effect of the  $\beta_3$ -adrenoceptor agonist SR58611A / V. Vasina [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2012. – N.167. – P. 1137-1147. 16. Wenting Li *Mest attenuates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in rats by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway* / Li Wenting [et al.] // *Gut and Liver*. – 2014. – Vol. 8, N.3. – P. 282-291. 17. Zhang J.J. *Development of a new animal model of liver cirrhosis in swine* / J.J. Zhang [et al.] // *EurSung Res*. – 2009. – Vol. 42, N.1. – P. 35-9.

Статья передана в печать 16.04.2015 г.

УДК 602.9:611.018.46:636.1:612.017

## ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЛОШАДИ НА РАННИХ ПАССАЖАХ INVITRO

\*Малюк Н.А., \*\*Безденежных Н.А., \*\*Адаменко И.Н.

\*Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев, Украина,

\*\*Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, г. Киев, Украина

*Проведенные иммуноцитохимические исследования подтверждают, что мезенхимальные стволовые клетки костного мозга лошади во время культивирования invitro на втором пассаже являются гетерогенными. Они экспрессируют маркеры мезенхимальных, эпителиальных и гемопоэтических клеток, тогда как на пятом пассаже культура клеток является иммунофенотипически гомогенной фракцией и экспрессирует маркеры мезенхимального происхождения.*

*Immunocytochemical studies confirm that mesenchymal stem cells of horse bone marrow during cultivation invitro at the second passage are heterogeneous, they express markers of mesenchymal, epithelial and hematopoietic cells, whereas at the fifth passage cell culture becomes immunophenotypic homogeneous, that express markers of mesenchymal origin.*

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, моноклональные антитела, иммуноцитохимический анализ, E-кадгерин, N-кадгерин, актин, виментин.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, monoclonal antibodies, immunocytochemical analysis, E-cadherin, N-cadherin, actin, vimentin.

**Введение.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) находят все более широкое применение в разных областях биологии, гуманной и ветеринарной медицины благодаря их высокой способности дифференцироваться в разные типы клеток и низкой иммуногенности. Известно, что МСК присутствуют во многих органах и тканях взрослого организма: костном мозге (КМ), коже, жировой и мышечной ткани. Тем не менее, в качестве “золотого стандарта” при изучении биологических свойств данного типа клеток является костный мозг.

Анализ фенотипа в последние годы широко используется для идентификации и выделения разных клеточных популяций. Этот метод основан на выявлении специфических мембранных молекул с помощью моноклональных антител. В данный момент учеными описано много мембранных антигенов, которые характеризуют соответствующие стадии дифференцировки клеток в том или другом направлении. Выявление экспрессии этих поверхностных маркеров является очень перспективным и продуктивным подходом в исследовании стволовых и прогениторных клеток.

О принадлежности клеток к этой категории надо оценивать исходя из наличия нескольких поверхностных антигенов, потому что обнаружить один универсальный маркер, который позволяет четко идентифицировать популяцию МСК, не возможно. МСК человека, например, после экспансии должны быть позитивными на CD105, CD73, CD90. Одновременно МСК не должны экспрессировать CD45, CD14, CD11b, CD79a и CD11[5].

Вышеописанный профиль экспрессии поверхностных молекул представляет лишь минимальные критерии к антигенному фенотипу МСК. На их поверхности присутствуют и много других антигенных маркеров, таких как CD49c, CD51, CD54, CD59, CD 71 и CD166.

Возможно, в дальнейшем на поверхности МСК будут обнаружены и другие специфические молекулы, которые будут пригодны для использования в качестве антигенных маркеров, что приведет к уточнению данного критерия [6, 7, 8].

Детальная характеристика антигенного профиля усложняется теми обстоятельствами, что набор экспрессирующих молекул не одинаков у разных клонов МСК и меняется в процессе культивирования, даже если эти клоны сходны морфологически своими потенциями.

Следует знать, что при иммунофенотипическом анализе МСК лабораторных животных, их CD-рецепторный аппарат отличается от рекомендованного для клеток человека, а протоколов исследований по изучению иммуноферментного профиля лошадей на разных пассажах культивирования в доступных литературных источниках не обнаружено.

Таким образом, изучение иммунофенотипического профиля мультипотентных стволовых клеток лошадей имеет как теоретическое, так и практическое значение. При этом, изучение CD рецепторов мезенхимальных стволовых клеток костного мозга лошадей во время культивирования *in vitro* на ранних пассажах является актуальным заданием для характеристики клеточной культуры.