

5. Комбинированная терапия $\alpha 1$ -адреноблокаторами и ингибиторами 5 α -редуктазы является терапией выбора у пациентов с высоким риском прогрессии ДГПЖ и ОЗМ.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аляев, Ю. Г. Лечение больных аденомой предстательной железы ингибитором 5-альфа-редуктазы I и II типа Аводартром (дутастерид) // Ю. Г. Аляев, А. З. Винаров, К. Л. Локшин // Урология. — 2006. — № 6. — С. 83–86.
2. Лопаткин, Н. А. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы / под ред. Н. А. Лопаткина. — М., 2001. — 236 с.
3. Andersson, K. E. Current concepts in the treatment of disorders of micturition. / K. E. Andersson // Drugs. — 2008. — № 35. — P. 77–94.
4. A medium term analysis of the subjective efficacy of treatment for women with detrusor instability and low bladder compliance / C. J. Kelleher [et al.] // Br J Obstet Gynaecol. — 1997. — Vol. 104. — P. 988–993.
5. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group / G. Gormley [et al.] // N. Engl. J. Med. — 1992. — Vol. 327, № 17. — P. 1185–1191.
6. Abrams, P. The significance of the symptoms associated with bladder outflow obstruction / P. Abrams, R. Feneley // Urol Int. — 2008. — P. 33.
7. Ткачук, В. Н. Медикаментозное лечение доброкачественной гиперплазии предстательной железы / В. Н. Ткачук. — М.: МДВ, 2009. — 128 с.
8. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5 α -reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia / C. G. Roehrborn [et al.] // Urology. — 2002. — Vol. 60, № 3. — P. 434–444.
9. Efficacy and safety of a long-term treatment with the dual 5 α -reductase inhibitor dutasteride in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia / F. Debuyne [et al.] // Eur. Urol. — 2004. — P. 23–28.
10. Andersson, K. E. Adrenoreceptor stimulants and blockers in obstetrics, gynecology and urology / K. E. Andersson // Receptor pharmacology. Lakartidningen. — 1998. — Vol. 50. — P. 332–335.
11. Clinical uroselectivity: Evidence from patients treated with slow-release alfuzosin for symptomatic benign prostatic obstruction / J. M. Buzelin [et al.] // Br J Urol. — 2007. — Vol. 79. — P. 898–906.
12. Мартов, А. Г. Опыт применения дутастерида перед трансуретральной резекцией простаты по поводу аденомы больших размеров / А. Г. Мартов, Д. В. Ергаков // Урология. — 2008. — № 4. — С. 46–50.
13. Ткачук, В. Н. Эффективность нового ингибитора 5-альфа-редуктазы Аводарта у больных аденомой предстательной железы / В. Н. Ткачук // Материалы XI съезда урологов России. — М., 2007. — С. 604–605.
14. Пушкарь, Д. Ю. Опыт применения короткого курса дутастерида у больных с доброкачественной гиперплазией простаты перед выполнением ТУРП / Д. Ю. Пушкарь, К. Б. Колонтарев // Эффективная фармакотерапия. Урология. — 2009. — № 3. — С. 36–39.
15. Лопаткин, Н. А. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы / под ред. Н. А. Лопаткина. — М., 1997. — 332 с.
16. Parsons, J. K. Benign prostatic hyperplasia and male lower urinary tract symptoms: epidemiology and risk factors / J. K. Parsons // Curr. Bladder Dysfunct. Rep. — 2010. — Vol. 5, № 4. — P. 212–218.
17. Abrams, P. Sphincterometry in the diagnosis of male bladder outflow obstruction / P. Abrams // J. Urol. — 2006. — Vol. 116. — P. 489–492.

Поступила 12.10.2016

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА И БИОЛОГИЯ

УДК 616.36-004-092-08.612.014

КЛЕТочная ТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У КРОЛИКОВ

Б. Б. Осипов, А. Н. Лычиков, А. Г. Скуратов, Д. Р. Петренев, А. А. Призенцов

Гомельский государственный медицинский университет

Цель: оценить эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при лечении экспериментального цирроза печени у кроликов.

Материал и методы. В качестве объекта для моделирования токсического поражения печени использовались белые калифорнийские кролики (15 особей) весом 2,5–3 кг в возрасте 7–8 месяцев. Моделирование острого и хронического поражения печени проводили путем подкожного введения 50 % раствора CCl_4 (тетрахлорметан) на оливковом масле из расчета 1 мл на килограмм массы тела два раза в неделю. В качестве терапевтического агента выступали аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (МСК). Введение взвеси МСК кроликам проводилось внутрипортально под масочным наркозом.

Результаты. Подкожное введение тетрахлорметана на протяжении 5 месяцев приводит к развитию цирроза печени у кроликов. Через месяц после введения МСК кроликам с циррозом отмечается улучшение гистологической картины пораженной печени в сравнении с наблюдаемой у кроликов контрольной группы, которым не вводили МСК.

Заключение. Трансплантация аутологичных МСК обладает положительным терапевтическим эффектом при лечении экспериментального цирроза печени у кроликов.

Ключевые слова: цирроз печени, экспериментальная модель, тетрахлорметан, кролики, мезенхимальные стволовые клетки.

CELL THERAPY OF EXPERIMENTAL LIVER CIRRHOSIS IN RABBITS

B. B. Osipov, A. N. Lyzhikov, A. G. Skuratov, D. R. Petreniov, A. A. Prisentsov

Gomel State Medical University

Objective: to evaluate the efficiency of mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of experimental liver cirrhosis in rabbits.

Material and methods. White Californian rabbits (15 individuals) weighing 2.5–3 kg and aged 7–8 months were used as objects for modeling of toxic liver injury. Modeling of acute and chronic liver injuries was performed

by subcutaneous injection of 50 % solution of carbon tetrachloride (CCl₄) at a dose of 1 ml/kg twice a week. Autologous mesenchymal stem cells (MSCs) were used as therapeutic agents. The rabbits were injected MSC suspension intraperitoneally under mask anesthesia.

Results. Subcutaneous injection of carbon tetrachloride for 5 months leads to the development of toxic liver injury in rabbits. We noted an improvement of the histological picture of the injured liver a month after the injection of autologous MSCs in the rabbits with liver cirrhosis in comparison with the rabbits of the control group which were not injected MSCs.

Conclusion. Transplantation of autologous MSCs has a positive therapeutic effect in the treatment of experimental liver cirrhosis in rabbits.

Key words: liver cirrhosis, experimental model, carbon tetrachloride, rabbits, mesenchymal stem cells.

Введение

Хронические диффузные заболевания печени являются весьма актуальной и серьезной проблемой современной медицины и хирургии, в частности. Заболеваниями печени страдают миллионы людей по всему миру, эта патология занимает существенное место среди причин ранней нетрудоспособности и смертности населения. Цирроз печени является основной причиной развития портальной гипертензии и осложнений, связанных с ней.

По данным статистики только в США более 5 миллионов человек страдают терминальными стадиями заболеваний печени. Цирроз печени находится на 9-м месте среди причин смертности в США (35 тыс. смертей каждый год, или 1,2 % всех летальных случаев в стране) [1]. В Республике Беларусь 1,5 тыс. человек ежегодно заболевают циррозом печени, смертность от этого заболевания составляет около 35 случаев на 100 тыс. населения.

Единственным эффективным методом лечения пациентов с терминальными стадиями заболеваний печени остается трансплантация. Однако, несмотря на огромные успехи в трансплантологии последних десятилетий, существует целый ряд проблем: дефицит донорских органов, высокие экономические затраты и другие факторы, не позволяющие полностью удовлетворить потребность в трансплантации печени. Таким образом, в последние годы возникла необходимость в разработке альтернативных подходов к лечению цирроза печени. Клеточная терапия в лечении заболеваний печени стала предметом научных исследований во всем мире [2, 3, 4].

Цель работы

Оценить эффективность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток при лечении экспериментального цирроза печени у кроликов.

Материал и методы

Для достижения цели нами использованы экспериментальные методы исследования на лабораторных животных, это позволяет дать комплексную оценку и разработать методы адекватной коррекции печеночной недостаточности, что не всегда возможно в клинических исследованиях.

Среди токсических моделей широкое распространение получила модель поражения пе-

чени, индуцированного тетрахлорметаном (CCl₄ — четыреххлористый углерод) [5]. Введение CCl₄ лабораторным животным приводит к ранней деструкции цитохрома P-450 микросом печени, угнетению фермента глюкоза-6-фосфатазы, ультраструктурно выявляемому интенсивному некрозу и жировой дистрофии печени, в конечном итоге, развитию цирроза печени.

В качестве объекта для моделирования цирроза печени использовались белые калифорнийские кролики, что давало ряд преимуществ по сравнению с мелкими лабораторными животными (крысы, мыши). Во-первых, способность печени кроликов к регенерации ниже, чем у крыс, что приближает условия эксперимента к клинически адекватным. Во-вторых, появляется возможность не только посмертного морфологического изучения органов, но и прижизненного морфофункционального исследования (лабораторно и инструментально) патологических изменений в «органах-мишенях» с меньшими последствиями для животного [6, 7].

Экспериментальные исследования проводились в соответствии с приказом Минвуза СССР № 742 от 13 ноября 1984 г. «Об утверждении правил работ с использованием экспериментальных животных», Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, принятой Советом Европы в 1986 г., согласно «Положению о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского института и мерах по реализации требований биомедицинской этики», утвержденному решением ученого Совета ГГМУ № 54-А от 23.05.2002 г., и требованиям, регламентирующим работу с экспериментальными животными.

Моделирование цирроза печени проводили путем подкожного введения кролику 50 % раствора CCl₄ (тетрахлорметан) на оливковом масле из расчета 1 мл на килограмм массы тела два раза в неделю.

Для прижизненной оценки развивающихся в ходе эксперимента патологических изменений использовали методы лабораторной (общий, биохимический анализы крови, коагуло-

грамма), инструментальной (УЗИ, инцизионная биопсия) диагностики.

Исследовались УЗ-признаки развивающегося цирроза печени и портальной гипертензии: неоднородная и повышенная эхогенность печени, изменение размеров печени (переднезадний размер — ПЗР), диаметра воротной вены (*vena portae*, VP), наличие свободной жидкости в брюшной полости. УЗИ выполнялось на аппарате «Аloka SSD-500».

В качестве терапевтического агента выступали аутологичные мезенхимальные стволовые клетки. Их источником являлся участок жировой ткани паховой области кролика, который забирался у каждого кролика под масочным наркозом до начала «затравки» тетрахлорметаном. Выделение и культивирование МСК проводили по стандартной методике протокола [8]. Введение взвеси МСК кроликам осуществлялось под масочным наркозом после верхней срединной лапаротомии путем внутриворотальной инъекции атравматичной (Pencil point) спинальной иглой G26. Концентрация МСК во взвеси составляла 5×10^6 в мл, объем введенной взвеси — 3 мл, скорость введения — 0,3 мл/с. После извлечения иглы из воротной вены при необходимости выполнялся гемостаз в области венепункции прижатием на 3–5 минут. Рана ушивалась послойно наглухо.

Кролики ($n = 20$), у которых развился цирроз печени, были разделены на 2 группы: экспериментальная группа № 1 (основная группа, $n = 10$), где после отмены тетрахлорметана проводилась клеточная трансплантация, и экспериментальная группа № 2 (контрольная, $n = 10$), в которой животным не вводились МСК. В обеих группах кролики содержались в одинаковых условиях в виварии.

Интактную группу составили 3 здоровых кролика, которым не вводили тетрахлорметан. Они содержались в тех же условиях, что и животные других групп и использовались для сравнения их лабораторных, инструментальных и гистологических данных с показателями животных экспериментальных групп.

Экспериментальная группа № 2 являлась группой циррозного контроля. Этим животным проводили моделирование цирроза печени тетрахлорметаном по описанной ранее методике. После развития цирроза введение тетрахлорметана прекращали (одновременно с животными экспериментальной группы № 1) для изучения естественного патоморфоза заболевания. В день отмены тетрахлорметана кроликам под масочным наркозом проводилась верхняя срединная лапаротомия, в ходе которой макроскопически оценивалось состояние печени и других органов, а также выполнялась инцизионная биопсия печени для гистологиче-

ского исследования с последующим послойным ушиванием раны.

Экспериментальная группа № 1 являлась основной. Этим животным проводили моделирование цирроза печени по той же методике. В день отмены тетрахлорметана кроликами данной группы проводилась верхняя срединная лапаротомия, в ходе которой макроскопически оценивалось состояние печени и других органов, выполнялась инцизионная биопсия печени для гистологического исследования, а также однократно вводилась суспензия аутологичных МСК по описанной ранее методике.

Животные выводились из эксперимента в одинаковые сроки: в день отмены тетрахлорметана (0-е сутки) и через 1 месяц после отмены тетрахлорметана и введения МСК (30-е сутки).

После выведения животных из эксперимента кусочки органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки по стандартной методике. Депарафинированные срезы печени окрашивали гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону, после чего изучали общую морфологическую и морфометрическую картину органа [9].

Результаты и обсуждение

Подкожное введение тетрахлорметана привело к токсическому поражению печени у кроликов. Острый токсический гепатит начал развиваться на 1-й неделе эксперимента и достиг максимума к 3–4-й неделям.

Процесс развития фиброза печени начался с 10-й недели эксперимента и завершился формированием цирроза печени с признаками портальной гипертензии (варикозное расширение вен пищевода и кардиального отдела желудка, асцит) к 20-й неделе (концу 5-го месяца эксперимента). Признаки развивающегося токсического гепатита с последующим исходом в цирроз подтверждались при выполнении УЗИ. Имели место увеличение размеров печени (ПЗР), увеличение диаметра воротной вены, изменение структуры паренхимы печени (неоднородная повышенная эхогенность, перипортальный фиброз), появление свободной жидкости (асцит) в брюшной полости (рисунок 1, таблица 1).

К 5-му месяцу введения тетрахлорметана у животных развился цирроз печени. Характер макроскопических изменений в печени и других органов, а также патоморфологическая картина резцированных участков печени были равнозначными у кроликов экспериментальных групп № 1 и № 2. Макроскопически печень увеличена в размерах, светло-коричневого цвета, плотная, бугристая, на разрезе мелкозернистой структуры, внутривороточные желчные протоки расширены. Также отмечались признаки портальной гипертензии: варикозное расширение вен кардиального отдела желудка, спленомегалия, асцит (рисунок 2).

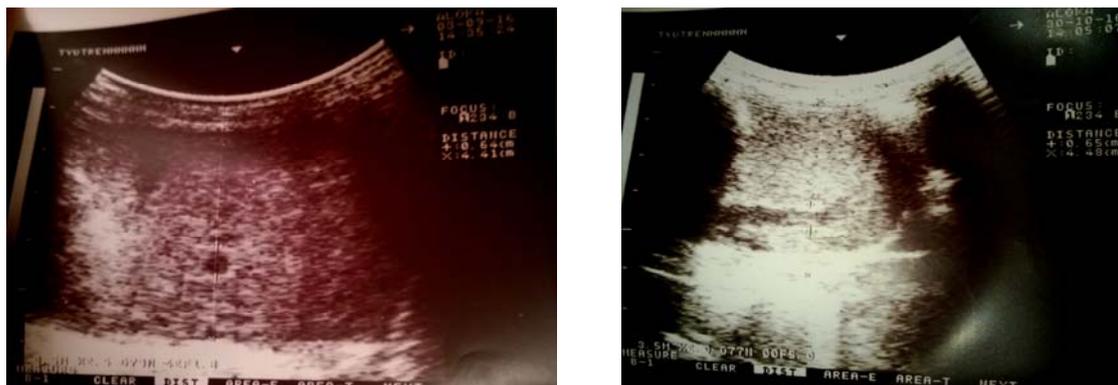
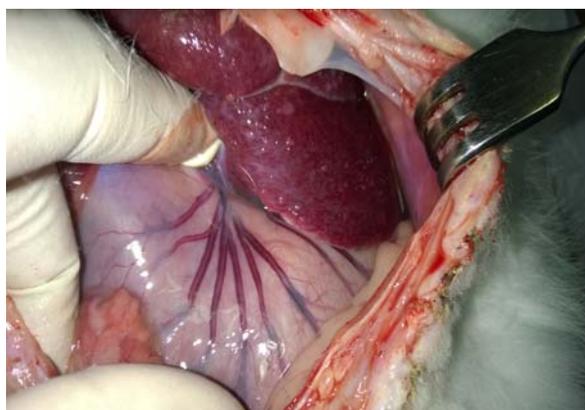


Рисунок 1 — УЗИ печени кролика с индуцированным циррозом печени (стрелкой указана воротная вена с перипортальным фиброзом)

Таблица 1 — Результаты УЗИ брюшной полости кроликов в ходе эксперимента (указаны медианы значений)

Срок проведения УЗИ	Показатели УЗИ	Интактная группа (здоровый контроль)	Экспериментальная группа № 2 (циррозный контроль)	Экспериментальная группа № 1 (основная)
До начала эксперимента (исходное состояние — здоровый кролик)	ПЗР, мм	33,5	34,0	34,2
	Диаметр VP (внешний), мм	4,0	4,0	4,1
5 месяцев эксперимента — конец «затравки» (0-й день введения МСК)	ПЗР, мм	38,4	43,3	44,2
	Диаметр VP (внешний), мм	4,1	6,3	6,1
6 месяцев эксперимента (30-й день после введения МСК)	ПЗР, мм	37,9	42,8	40,5
	Диаметр VP (внешний), мм	4,2	5,8	4,7



а



б

Рисунок 2 — Фотография брюшной полости кролика через 5 месяцев введения тетрахлолметана (а), макропрепарат печени (б)

При патоморфологическом исследовании резецированных долей печени изменения в обеих экспериментальных группах были равноценны. При микроскопии печени отмечалась выраженная дистрофия гепатоцитов. Определялись клетки с «пустой» цитоплазмой. При изучении биоптатов на большом увеличении наблюдались единичные некротизированные клетки. Определялся выраженный фиброз стромы

вокруг триад и центральных вен с формированием мостовидного фиброза, с образованием ложных долек и узлов регенерации. В фиброзированных триадах отмечалась пролиферация желчных протоков и умеренная лимфоидная инфильтрация. Наблюдалось очаговое полнокровие центральных вен и окружающих их синусов. Архитектоника печеночных долек была нарушена (рисунок 3).

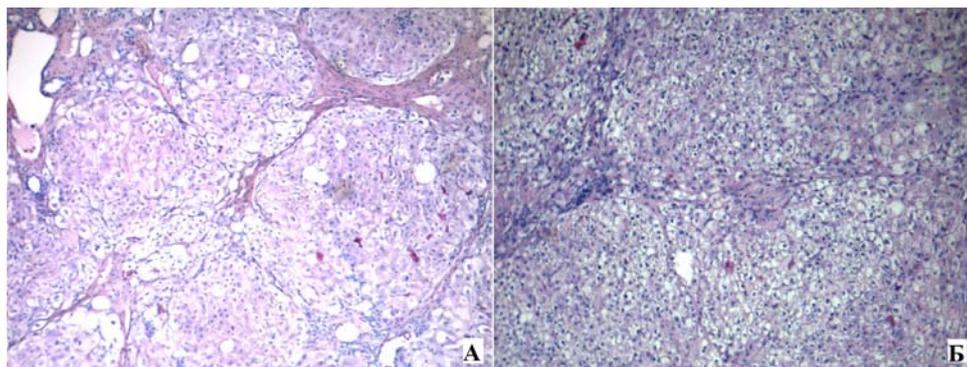


Рисунок 3 — Микропрепарат печени на 5-м месяце введения тетрахлорметана (0-й день введения МСК): экспериментальная группа № 2 (А), № 1 (Б). Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: x200

Через месяц после отмены тетрахлорметана и однократного введения взвеси аутологичных МСК (30-й день) наблюдались существенные различия в патоморфологической картине между кроликами экспериментальных групп № 1 и № 2. При микроскопии печени кроликов экспериментальной группы № 2 (без введения МСК) отмечалось нарастание дистрофических изменений в гепатоцитах, несмотря на отмену тетрахлорметана, что свидетельствует о стойкости патологических изменений в печени. Наблюдалось усиление некротических изменений с образованием очагов некроза. Фиброзные изменения стромы усилились, определялись участки выраженного фиброза с наличием пустых пространств, характерных для коллапса

стромы. Лимфоидная инфильтрация соединительнотканых сефт варьировала от умеренной до выраженной. Отмечалось полнокровие сосудов. Архитектоника печеночных долек была нарушена (рисунок 4В).

При гистологическом исследовании печени кроликов экспериментальной группы № 1 (с введением МСК) выявлены некоторые позитивные изменения: отмечалось появление участков нормального гистологического строения гепатоцитов с преимущественным расположением их вокруг центральных вен долек. Наблюдалась слабо выраженное истончение фиброзных сефт и слабо выраженная лимфоидная инфильтрация (рисунок 4Г). Однако архитектура долек все еще оставалась нарушенной.

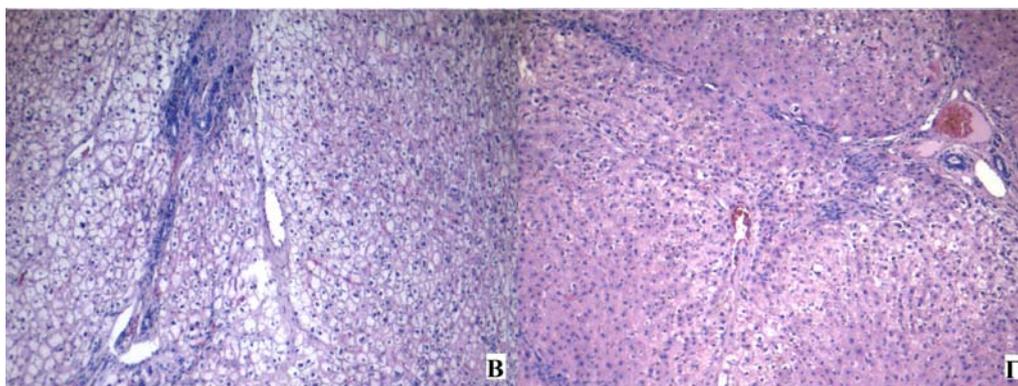


Рисунок 4 — Микропрепарат печени на 30-й день после отмены тетрахлорметана: экспериментальная группа № 2 — без введения МСК (В), № 1 — с введением МСК (Г). Окраска: гематоксилин-эозин. Увеличение: x200

Таким образом, через месяц после введения МСК кроликам с циррозом в этой группе было отмечено улучшение гистологической картины пораженной печени по сравнению с той, где животным не вводили МСК. Так как других отличий в ведении животных на этом этапе эксперимента не было, то, вероятно, имел место положительный эффект клеточной трансплантации на процессы регенерации органа при лечении экспериментального цирроза печени.

Заключение

1. Подкожное введение тетрахлорметана по представленной схеме приводит к токсическому поражению печени у кроликов. Процесс развития фиброза печени начинается с 10-й недели эксперимента и завершается формированием цирроза печени с признаками портальной гипертензии (варикозное расширение вен пищевода и кардиального отдела желудка, асцит) к 20-й неделе (концу 5-го месяца) эксперимента,

что подтверждается данными лабораторных и инструментальных методов исследования.

2. На фоне введения аутологичных МСК кроликам с индуцированным циррозом печени наблюдалось улучшение гистологической картины в пораженном органе, что, вероятно, свидетельствует о положительном влиянии клеточной трансплантации на процессы регенерации в печени при лечении экспериментального цирроза.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study / S. Scaglione [et al.] // *J Clin Gastroenterol.* — 2015. — № 49(8). — P. 690–696.
2. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А. Н. Лызикив [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2015. — № 3 (45). — С. 4–9.
3. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis / V. Volarevic [et al.] // *Stem Cells.* — 2014. — Aug 22. doi: 10. — P. 1002–1818.

4. Морфометрические параметры регенерации печени при частичной гепатэктомии и трансплантации мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте / А. Г. Скуратов [и др.] // *Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук.* — 2016. — № 4. — С. 57–65.

5. *Constantinou, C. Modeling liver fibrosis in rodents / C. Constantinou, N. Henderson, J. P. Iredale // Methods Mol Med.* — 2005. — № 117. — P. 237–250.

6. Модель токсического поражения печени у кроликов / А. Н. Лызикив [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2015. — № 2. — С. 45–50.

7. Сравнительная характеристика экспериментального моделирования токсического поражения печени у крыс и кроликов / А. Н. Лызикив [и др.] // *Актуальные проблемы медицины: сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 25-летию основания учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» (Гомель, 5–6 ноября 2015 года) / А. Н. Лызикив [и др.]. — Элект. текст. данные (объем 20,1 Мб). — Гомель: ГомГМУ, 2015. — С. 596–598.*

8. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells / P. A. Zuk [et al.] // *Mol Biol Cell.* — 2002. — Vol. 13(12). — P. 4279–4295.

9. *Автандилов, Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. — М.: Медицина, 1990. — 383 с.*

Поступила 15.02.2017

УДК 616.153.922:57.086.13]:599.323.4

ВЛИЯНИЕ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС НА СОДЕРЖАНИЕ ХОЛЕСТЕРОЛА

С. С. Осочук

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

Холестерол подвергается окислению в большей степени, чем полиненасыщенные жирные кислоты, что может привести к искажению результатов, полученных при замораживании сыворотки крови. Целью работы было исследование влияния низкотемпературного хранения сыворотки на показатели ее холестеролового профиля. Сыворотку крови лабораторных крыс делили на три порции. В 1-й порции определяли холестероловый профиль коммерческими наборами «Cormay Diana» в день ее получения. 2 и 3 порции обрабатывали после 3- и 7-дневного хранения при температуре -20 °С. Статистический анализ проводился в системе R 3.3.1. Для анализа повторных измерений использовали непараметрический критерий Квейд с поправкой по методу Бонферрони. По результатам проведенного исследования сделан вывод о статистически значимом влиянии замораживания сыворотки крови на результаты анализа холестеролового профиля крови и обсуждены возможные механизмы выявленных отличий.

Ключевые слова: холестерол, определение, хранение, ошибка.

THE EFFECT OF LOW-TEMPERATURE STORAGE OF RAT SERUM ON THE CONTENT OF CHOLESTEROL

S. S. Asachuk

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University

Cholesterol is oxidized to a greater extent than polyunsaturated fatty acids, which may distort the results in freezing of blood serum. The aim of the work was to study the effect of low-temperature storage of serum on the indices of its cholesterol profile. The blood serum of laboratory rats was divided into 3 portions. The profile of cholesterol in the first portion was determined with commercial kits Cormay-Diana on the day when it was received. The second and third portions were processed after 3 and 7 days of storage at a temperature of -20 °C. The statistical analysis was performed in the system R 3.3.1. The non-parametric Quade criterion with the Bonferroni correction was used for the analysis of the repeated measurements. According to the results of the carried out study we made a conclusion about the statistically significant effect of blood serum freezing on the result of the analysis of the cholesterol profile of blood and discussed possible mechanisms of the identified differences.

Key words: cholesterol, identification, storage, error.

Введение

Практически каждому врачу-клиницисту знакома ситуация, когда результаты лабора-

торного анализа одного и того же пациента, полученные с небольшим временным интервалом или без него из одной и той же или раз-