

eters. Version 7.1. — 2017. — Режим доступа: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

17. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. — М., 2014. — 39 с.

18. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute

Respiratory Pathogen / D. R. Roach [et al.] // Cell Host Microbe. — 2017. — Vol. 22. — P. 38–47.

19. Эпидемиологические особенности формирования патогенных свойств *Klebsiella spp.* и *Pseudomonas spp.* в урологическом стационаре / Б. И. Асланов [et al.] // Профилактическая и клиническая медицина. — 2012. — № 3(44). — С. 50–54.

Поступила 12.02.2018

УДК 616.36-004

ТОКСИКО-АЛИМЕНТАРНАЯ МОДЕЛЬ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ У КРЫС

Б. Б. Осипов, А. Н. Лызилов, А. Г. Скуратов, А. А. Призенцов

Учреждение образования
«Гомельский государственный медицинский университет»,
г. Гомель, Республика Беларусь

Цель: разработать экспериментальную модель цирроза печени у крыс и сравнить ее с тетрахлорметановой моделью поражения печени.

Материалы и методы. В качестве объекта для моделирования цирроза печени использовались белые крысы-самцы линии Wistar ($n = 30$). Моделирование проводили по разработанной токсико-алиментарной методике (экспериментальная группа, $n = 15$) и путем введения тетрахлорметана (контрольная группа, $n = 15$). Животных выводили в разные сроки (через 8, 12 недель от начала моделирования и через 3 месяца после прекращения моделирования) и изучали морфологическую морфометрическую картину печени.

Результаты. Разработанная токсико-алиментарная модель поражения печени приводит к развитию цирроза печени через 8 недель от начала моделирования (воспроизводимость — 93,3 %). При использовании тетрахлорметановой модели воспроизводимость цирроза печени через 8 недель составляет 26,7 %, что подтверждается статистически меньшей толщиной соединительнотканых септ в контрольной группе по сравнению с экспериментальной ($p = 0,016$, критерий Манна-Уитни). Разработанная модель обеспечивает сокращение времени моделирования (с 12 недель в контрольной группе до 8 недель в экспериментальной) цирроза печени, а также меньшую обратимость признаков цирроза печени через 3 месяца по сравнению с тетрахлорметановой моделью цирроза печени.

Заключение. Разработанная токсико-алиментарная модель поражения печени приводит к развитию цирроза печени через 8 недель от начала моделирования. Разработанная модель обеспечивает сокращение времени моделирования цирроза печени, повышение воспроизводимости, а также меньшую обратимость признаков цирроза печени через 3 месяца по сравнению с тетрахлорметановой моделью цирроза печени.

Ключевые слова: цирроз печени, экспериментальная модель, тетрахлорметан, соединительнотканые септы, морфометрия.

TOXIC-ALIMENTARY MODEL OF LIVER CIRRHOSIS IN RATS

B. B. Osipov, A. N. Lyzikov, A. G. Skuratov, A. A. Prizentsov

Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

Objective: to design an experimental model of liver cirrhosis in rats and to compare it with the carbon tetrachloride model of liver injury.

Material and methods. White Wistar rats ($n = 30$) were used as objects for modeling of toxic liver injury. The modeling was performed by the designed toxic-alimentary method (experimental group, $n = 15$) and by means of the carbon tetrachloride injection (control group, $n = 15$). The animals were sacrificed at different terms (8, 12 weeks after start of the modeling and 3 months after termination of the modeling), and the morphological and morphometric state of the liver was studied.

Results. The designed toxic-alimentary model of liver injury leads to liver cirrhosis 8 weeks after start of the modeling (reproducibility — 93.3 %). The reproducibility of liver cirrhosis in case of using the carbon tetrachloride model 8 weeks after start of the modeling is 26.7 %, which is proved by statistically lower thickness of connective-tissue septa in the liver in the control group in comparison with the experimental group ($p = 0.016$, Mann Whitney U test). The designed toxic-alimentary method ensures shorter timing of the modeling of liver cirrhosis (from 12 weeks in the control group to 8 weeks in the experimental group) and also lower reversibility of liver fibrosis signs 3 months after termination of the modeling in comparison with the carbon tetrachloride model of liver injury.

Conclusions. The designed toxic-alimentary model of liver injury leads to liver cirrhosis 8 weeks after start of the modeling. The developed model ensures shorter timing of the modeling of liver cirrhosis, increased reproducibility as well as lower reversibility of liver fibrosis signs 3 months after termination of the modeling in comparison with the carbon tetrachloride model of liver injury.

Key words: liver cirrhosis, experimental model, carbon tetrachloride, connective-tissue septa, morphometry.

Введение

Цирроз печени и его осложнения является актуальной и серьезной проблемой современной медицины и хирургии в частности, что подтверждается высокими показателями заболеваемости и смертности от данного заболевания в развитых странах. По данным статистики, только в США более 5 миллионов человек страдают терминальными стадиями заболеваний печени, а цирроз печени в этой стране находится на 9-м месте по причинам смерти (35 тыс. смертей каждый год, или 1,2 % всех летальных случаев в стране) [1]. В Великобритании в 2011 году число пациентов с циррозом было порядка 30 тыс. человек, при этом 7 тыс. новых случаев диагностировалось каждый год [2]. В Республике Беларусь 1,5 тыс. человек ежегодно заболевают циррозом печени, смертность составляет около 35 случаев на 100 тыс. населения и не имеет тенденции к снижению. Единственным эффективным методом лечения пациентов с терминальными стадиями заболеваний печени остается ортотопическая трансплантация печени. Однако ряд нерешенных проблем трансплантологии (дефицит органов, высокие экономические затраты и др.) приводит к необходимости поиска альтернативных методов лечения цирроза печени в поздних стадиях. Разработка и оценка эффективности новых методик лечения цирроза печени должны начинаться с экспериментальных исследований на лабораторных животных. Исходя из этого разработка оптимальной модели цирроза печени, которая отвечала бы всем требованиям экспериментальных исследований, является актуальной проблемой.

Существующие модели цирроза печени можно разделить на следующие группы: хирургические [3], фармакологические (токсические) [4], иммунологические [5, 6], трансгенные, вирусные [7]. Наиболее часто в экспериментальных исследованиях, направленных на изучение патогенеза, разработку новых методов лечения цирроза печени, используют токсическую модель поражения печени тетрахлорметаном [8, 9–13]. Тетрахлорметан (CCl_4) является гепатотоксином, который вызывает грубые центролобулярные некрозы в печени. Однако, несмотря на то, что длительное его введение приводит к формированию цирроза печени, данная модель имеет свои недостатки. Для развития цирроза печени требуется длительное время: 10–12 недель при внутрибрюшинном способе введения тетрахлорметана и 18–20 недель — при подкожном способе. Кроме того, развившиеся изменения в печени крыс после отмены тетрахлорметана носят обратимый характер, что делает данную модель менее объективной.

Таким образом, есть необходимость разработки оптимальной токсической модели цирроза печени, которая обеспечивает сокращение сроков моделирования цирроза печени, достижение более стойкого результата с меньшей обратимостью патологических изменений и повышение воспроизводимости цирроза печени.

Цель работы

Разработать экспериментальную модель цирроза печени у крыс и сравнить ее с тетрахлорметановой моделью поражения печени.

Материал и методы

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 году, 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 Ученым Советом ГГМУ №54-А от 23.05.2002 года, и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными.

В качестве объекта для моделирования использовались белые крысы-самцы линии Wistar ($n = 30$). До начала эксперимента всех животных случайным образом разделили на 2 группы: контрольную и экспериментальную. В контрольную группу вошли крысы ($n = 15$), которым проводили моделирование цирроза печени тетрахлорметаном путем его внутрибрюшинного введения в виде 50% раствора на оливковом масле из расчета 1 мл на кг массы тела два раза в неделю. Экспериментальную группу составили животные ($n = 15$), которым проводили моделирование цирроза печени по разработанному способу. Суть предложенной модели состоит во внутрибрюшинном введении двух гепатотропных ядов (50 % раствора тетрахлорметана из расчета 0,5 мл на кг массы тела два раза в неделю и раствора тиоацетамида из расчета 100 мг/кг один раз в неделю), а также в добавлении в рацион питания тугоплавких жиров (5 г топленого свиного сала в сутки) и 5 % раствора этилового спирта для питья. В данной модели используются 2 гепатотоксина (тетрахлорметан и тиоацетамид), которые имеют разные механизмы действия и точки приложения в печеночной дольке. Хотя тиоацетамид не является гепатотоксичным, его активные метаболиты ковалентно связываются с белками и липидами, вызывая оксидативный стресс и центролобулярные некрозы в печени.

В сравнении с тетрахлорметаном введение тиоацетамида ведет к большей перипортальной инфильтрации и более выраженной протоковой пролиферации. Все животные содержались в одинаковых условиях в виварии.

Моделирование поражения печени в обеих группах начинали в один день и продолжали вплоть до развития у лабораторных животных признаков цирроза печени. Затем моделирование прекращали и изучали естественный патоморфоз заболевания и обратимость развившихся в печени патологических изменений. Морфологию печени животных оценивали через 8 и 12 недель от начала моделирования и через 3 месяца после прекращения моделирования. В указанные сроки всем животным под масочным наркозом проводили эксплоративную лапаротомию, оценивали макроскопическую структуру печени, а также проводили инцизионную биопсию печени для гистологического исследования. После выведения животных из эксперимента оценивали общую морфологическую и морфометрическую структуру печени. Полученные срезы ткани печени окрашивали гематоксилином-эозином. Морфометрическое исследование гистологических препаратов проводили на микроскопе «Nikon eclipse 50i», с использованием пакета морфометрических программ «ImageJ» (NIH, USA) в 5 неперекрывающихся полях зрения при увеличении $\times 400$. Оценивались толщина соединительнотканых септ, выраженность дистрофи-

ческих изменений гепатоцитов, наличие и количество двухъядерных клеток. Толщина соединительнотканых септ измерялась десятикратно в одном поле зрения. Дистрофические изменения оценивали по 4 категориям: отсутствие дистрофии, слабо выраженная, умеренная и выраженная ее степень. Количество двухъядерных клеток оценивали в 5 полях зрения, при этом учитывали максимальное их количество в поле зрения.

Анализ и обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica», 8 (Statsoft, USA). Количественные данные, распределение которых не являлось нормальным, описывались с помощью медианы, 25 % и 75 % процентилей. В случае сравнения двух независимых групп применялся непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимым считали результат, если вероятность отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий не превышала 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Характеристика токсико-алиментарной модели цирроза печени у крыс через 8 недель. Разработанная модель поражения печени привела к развитию цирроза печени у 14 из 15 крыс (93,3%) экспериментальной группы через 8 недель после начала эксперимента, что подтверждается морфологическими и морфометрическими методами.

Макроскопически печень увеличена, мелкобугристая, уплотнена, край закруглен (рисунок 1а).



а

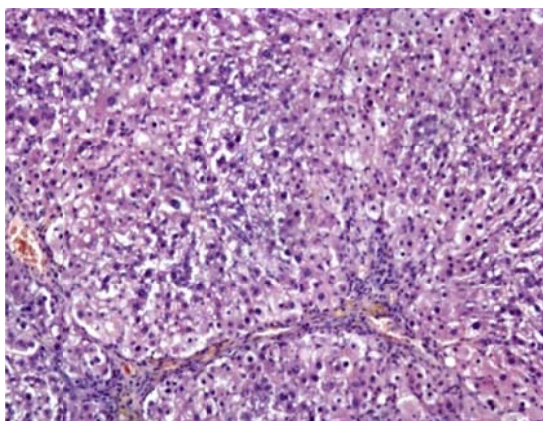


б

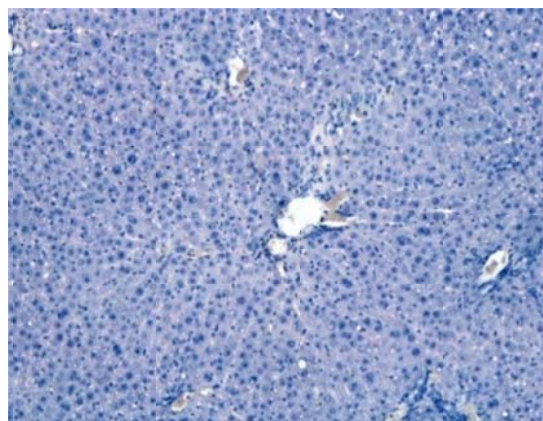
Рисунок 1 — Печень крысы через 8 недель моделирования цирроза печени: а — экспериментальная группа; б — контрольная группа

У большинства крыс экспериментальной группы на данном сроке определялась схожая патогистологическая картина. Наблюдались диффузный мелкоочаговый некроз гепатоцитов с дисконкомплексацией пластинчатого строения долек, а также выраженный серозный отек и скопления пигмента липофусцина преимуще-

ственно вокруг сосудов. На всех участках срезов в гепатоцитах отмечались выраженные дистрофические изменения. Наблюдалось разрастание соединительной ткани септ с формированием ложных долек, отмечалось большое количество диффузно расположенных двухъядерных клеток (рисунок 2а).



а



б

Рисунок 2 — Ткань печени крысы через 8 недель моделирования цирроза печени. Увеличение: $\times 100$.
Окраска: гематоксилин-эозин: а — экспериментальная группа; б — контрольная группа

Медиана толщины соединительнотканых септ в экспериментальной группе на данном сроке составила 35,32 (32,76–36,44) мкм.

Поскольку патогистологическая картина у большинства крыс экспериментальной группы соответствовала циррозу печени, моделирование было прекращено с целью дальнейшей оценки естественного патоморфоза заболевания и обратимости патологических изменений.

Характеристика тетрахлорметановой модели цирроза печени у крыс через 8 недель. Введение тетрахлорметана крысам контрольной группы привело к токсическому поражению печени. Однако через 8 недель после начала моделирования макроскопическая и патогистологическая картина цирроза печени были выявлены только у 4 из 15 крыс (26,7%), а у остальных животных определялись признаки хронического гепатита с умеренным фиброзом печени (рисунок 1б). Отмечались явления резко выраженной венозной гиперемии значительного количества кровеносных сосудов, в отдельных крупных сосудах — с лизисом эритроцитов. Дистрофические изменения в гепатоцитах определялись, но носили преимущественно умеренный характер. Количество двухъядерных клеток среди гепатоцитов было умеренным. Наблюдалось разрастание соединительной ткани септ преимущественно в перипортальной зоне с формированием единичных ложных долек (рисунок 2б). Медиана толщины соединительнотканых септ в контрольной группе через 8 недель от начала моделирования составила 27,44 (26,75–27,61) мкм. Таким образом, толщина септ в экспериментальной группе статистически выше, чем в контрольной через 8 недель моделирования ($p = 0,016$), что говорит о большей выраженности фиброза печени у крыс экспериментальной группы.

Так как в контрольной группе патогистологическая картина у большинства крыс не

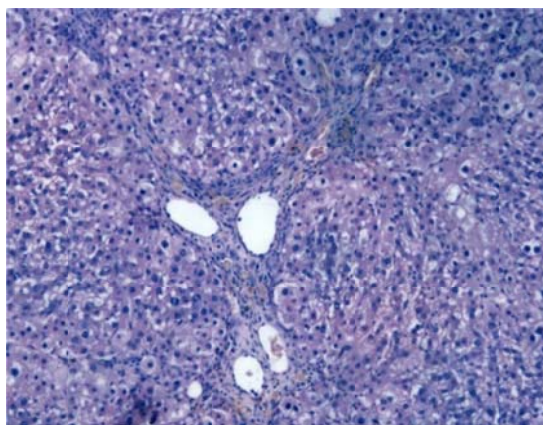
соответствовала циррозу печени, введение тетрахлорметана продолжили.

Характеристика тетрахлорметановой модели цирроза печени у крыс через 12 недель. Патогистологическая картина цирроза печени в контрольной группе была достигнута через 12 недель после начала введения тетрахлорметана у 13 из 15 крыс (86,7%).

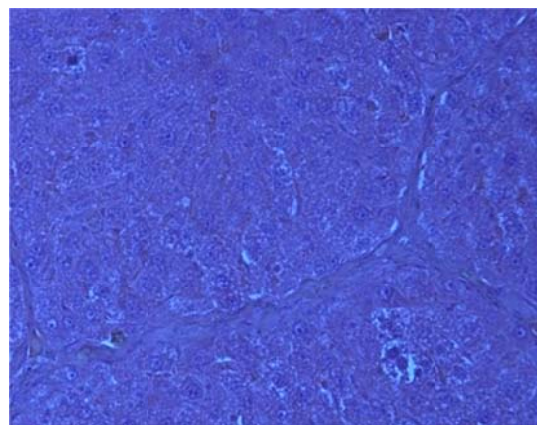
Морфологических различий между крысами разных групп на данном этапе эксперимента не было выявлено. Медиана толщины соединительнотканых септ в контрольной группе через 12 недель эксперимента составила 34,79 (33,99–34,98) мкм. Таким образом, статистических различий между толщиной септ в экспериментальной группе через 8 недель и контрольной группе через 12 недель не было выявлено ($p = 0,75$). Учитывая наличие признаков цирроза печени у большинства крыс контрольной группы, моделирование было прекращено с целью дальнейшей оценки естественного патоморфоза заболевания и обратимости патологических изменений.

Характеристика экспериментального цирроза печени через 3 месяца после прекращения моделирования. В экспериментальной группе при микроскопии наблюдалось сохранение патогистологической картины цирроза печени. Отмечалась выраженная дистрофия гепатоцитов, сохранялся выраженный фиброз стромы, наблюдалось диффузное расположение большого количества двухъядерных клеток (рисунок 3а).

Медиана толщины соединительнотканых септ в экспериментальной группе на данном сроке составила 31,57 (30,7–32,92) мкм. Статистической разницы в толщине септ в день отмены моделирования и через 3 месяца после прекращения моделирования в экспериментальной группе не было выявлено ($p = 0,25$).



а



б

Рисунок 3 — Патоморфологическая картина печени крысы через 3 месяца после окончания моделирования. Увеличение: $\times 100$. Окраска: гематоксилин-эозин: а — экспериментальная группа; б — контрольная группа

В контрольной группе при патоморфологическом исследовании наблюдались уменьшение толщины фиброзных сефт, умеренно выраженная дистрофия гепатоцитов с сохранением умеренного фиброза стромы, единичные ложные дольки и большое количество двухъядерных клеток (рисунок 3б). Медиана толщины соединительнотканых сефт в контрольной группе на данном сроке составила 26,44 (25,75–26,61) мкм. Толщина сефт в контрольной группе через 3 месяца после отмены моделирования статистически ниже, чем в день отмены моделирования ($p = 0,009$). Также выявлена статистическая разница в толщине сефт в контрольной и экспериментальной группе через 3 месяца после прекращения моделирования ($p = 0,009$).

Таким образом, можно говорить о частичном обратном развитии признаков цирроза печени у крыс контрольной группы через 3 месяца после отмены тетрахлорметана. У крыс экспериментальной группы через 3 месяца в целом сохранялись признаки цирроза печени с незначительным истончением сефт, не имеющим статистической достоверности ($p = 0,25$). Это говорит о стойкости и меньшей обратимости патологических изменений в печени при использовании разработанной нами модели цирроза печени по сравнению с тетрахлорметановой моделью.

Заключение

Разработанная токсико-алиментарная модель поражения печени приводит к развитию цирроза печени через 8 недель от начала моделирования. Воспроизводимость данной модели в указанные сроки составляет 93,3 %. При использовании тетрахлорметановой модели воспроизводимость цирроза печени через 8 недель составляет 26,7 %, что подтверждается статистически меньшей толщиной соединительнотканых сефт в контрольной группе по сравнению с экспериментальной ($p = 0,016$, критерий Манна-Уитни).

Разработанная модель обеспечивает сокращение времени моделирования (с 12 недель в контрольной группе до 8 недель в экспериментальной) цирроза печени, а также меньшую обратимость признаков цирроза печени через 3 месяца по сравнению с тетрахлорметановой моделью цирроза печени.

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. Dunbar, J. K. The rising tide of liver Cirrhosis mortality in the UK: can its halt be predicted? / J. K. Dunbar, I. K. Crombie // *Alcohol Alcohol.* — 2011 — № 46(4). — P. 459–463.
3. Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis / S. Heinrich [et al.] // *Surgery.* — 2010. — № 149. — P. 445–451.
4. Hayashi, H. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* — 2011. — № 5. — P. 729–738.
5. Response of sinusoidal liver cells in CDE-diet / E. Ueberham [et al.] // *Comp. Hepatol.* — 2010. — № 13. — P. 8–9.
6. T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration / A. V. Tumanov [et al.] // *Gastroenterology.* — 2009. — № 136. — P. 694–704.
7. Häussinger, D. Liver regeneration / edited by Dieter Häussinger. — Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin/Boston. — 2011. — 232 p.
8. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis / P. C. Tsai [et al.] // *Liver Transpl.* — 2009. — № 5(15). — P. 484–495.
9. Anti-fibrotic effect of chorionic platederived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl₄-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases / M. J. Lee [et al.] // *J. Cell. Biochem.* — 2010. — № 6 (111) — P. 1453–1463.
10. Модель токсического поражения печени у кроликов / А. Н. Лыжиков [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2015. — № 2. — С. 45–50.
11. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model / A. Piryaei [et al.] // *Stem Cell Rev.* — 2011. — № 1(7). — P. 103–118.
12. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis / W. Zhao [et al.] // *World J. Gastroenterol.* — 2012. — № 10(18). — P. 1048–1058.
13. Экспериментальное моделирование токсического повреждения печени / А. Г. Скуратов [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии.* — 2011. — № 4 (30). — С. 27–33.

Поступила 26.02.2018