

OG 322

Оцінка впливу моноклеарних стовбурових клітин у порівнянні із гепатопротектором на морфологічний стан тканини печінки у щурів із індукованим неалкогольним стеатогепатитом та гіперхолестеринемією в експерименті

АНОТАЦІЯ

Актуальність. Відомо, що печінка належить до органів із вираженим функціональним резервом, так зменшення кількості активних гепатоцитів до 50% від загальної маси печінки не асоціюється із підвищенням рівнів печінкових трансаміназ. Важливим аспектом ефективної терапії є своєчасна комплексна діагностика, однак захворювання гепатобіліарного тракту, зокрема неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) характеризується пролонгованою відсутністю маніфестації, що призводить до прогресування перебігу захворювання. У теперешній час НАЖХП за частотою зустрічаємості в структурі хронічних захворювань гепатобіліарної системи поступається тільки вірусним гепатитам. Доведено, що НАЖХП є незалежним фактором ризику розвитку та прогресування кардіоваскулярної патології, важливою компонентою якої є атерогенна гіперхолестеринемія (ГХ), що виявляється у 20-80% пацієнтів з НАЖХП. За відсутності модифікації образу життя та патогенетично обґрунтованого лікування НАЖХП може трансформуватись в неалкогольний стеатогепатит (НАСГ) із подальшим прогресуванням у цироз печінки, гепатоцелюлярну карциному.

Незважаючи на значні досягнення в області гепатології, з нашої точки зору особливого значення має вивчення застосування клітинної терапії на показники функціонального та морфологічного стану тканини печінки за умов НАСГ та ГХ. Тому, **метою** дослідження було оцінити вплив мононуклеарних стовбурових клітин (МСК) у порівнянні із гепатопротектором на морфофункціональний стан тканини печінки в щурів з НАСГ та ГХ в експерименті.

Матеріали та методи. Дослідження було проведено на 100 статевозрілих самцях Wistar. Тварини були розподілені на наступні групи: I (n=30) - щури з НАСГ та ГХ без корекції - контрольна група; II (n=30) - щури з НАСГ та ГХ, з інтрагастральним введенням комплексного гепатопротектору "Гепадиф" (Волартан Фарма, Казахстан/Україна) із розрахунку 3 мг/кг; III

(n=30) - щури з НАСГ та ГХ і внутрішньовенним введенням МСК; IV (n=10) - інтактна група.

Моделювання НАСГ відбувалось шляхом заміни стандартного корму віварію на атерогенний раціон із додатковим інтрагастральним введенням пальмової олії із розрахунку 50 г/кг маси тіла протягом 90 діб. Перший день введення Гепадифу та МСК вважали першим днем експерименту. Тварин виводили з експерименту на 90-у добу моделювання патології та 30-у добу корекції шляхом дислокації I шийного хребця під ефірною анестезією. МСК вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції у хвостову вену, двічі в об'ємі 0,05 мл з інтервалом 1 раз в 7 діб. Визначали показники загального аналізу крові, ліпідограми, печінкових трансаміназ з подальшим патоморфологічним дослідженням тканини печінки.

Результати та обговорення. На 90-у добу атерогенної дієти рівень ЗХ становив $3,17 \pm 0,4$ ммоль/л, активність АЛТ була 163 ± 7 од/л, АСТ 125 ± 4 од/л, виявлені морфологічні ознаки НАСГ. У щурів II групи на 30-у добу корекції рівень ЗХ був меншим на 14%, активність АЛТ була меншою на 24%, АСТ на 12% у порівнянні з I групою ($p < 0,03$). Гістологічно виявлено виражену білкову дистрофію, стеатоз III ступеня. У щурів III групи на 30-у добу після застосування МСК рівень зх був меншим на 32%, активність АЛТ була меншою на 46%, АСТ на 47% у порівнянні з I групою ($p < 0,03$). Морфологічно спостерігали мікровезикулярну жирову дистрофію, стеатоз II ступеня.

Висновки. Використання атерогеного раціону із додатковим інтрагастральним введенням пальмової олії 50 г/кг протягом 90 діб призводить до формування НАСГ та ГХ. На 30-у добу після використання комплексного гепатопротектору у тварин з НАСГ та ГХ спостерігалось зменшення прояви жирової та білкової дистрофії, у порівнянні із вихідними зразками та контрольною групою. На 30-у добу після застосування МСК у тварин з НАСГ та ГХ було виявлено значне зменшення ферментативної активності печінкових трансаміназ та рівнів атерогенних ліпопротеїдів, що відповідало тенденції до поліпшення морфологічної структури тканини печінки.

Ключові слова: експериментальний неалкогольний стеатогепатит, гіперхолестеринемія, мезенхімальні стовбурові клітини.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
Розділ 1. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	8
1.1 Дизайн експерименту.....	8
1.2 Методи лабораторних досліджень.....	9
1.3 Методи патоморфологічних досліджень.....	9
1.4 Методи статистичних досліджень.....	10
Розділ 2. АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	11
ВИСНОВКИ.....	16
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	17

ВСТУП

Актуальність. Відомо, що серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності населення більшості країн світу в тому числі і України. Відомо, що корекція факторів ризику є головним превентивним заходом у боротьбі з кардіоваскулярними захворюваннями (КВЗ). Так, КВЗ провокує низка факторів ризику - гіперхолестеринемія (ГХ), ожиріння, метаболічні розлади, паління тютюну, недостатня фізична активність, артеріальна гіпертензія (АГ), вживання алкоголю тощо [1,2]. Вважається, що довготривала ГХ є найчастішою причиною передчасного розвитку ішемічної хвороби серця (ІХС) та атеросклерозу, що з часом може маніфестувати розвитком кардіоваскулярних та цереброваскулярних катастроф [3,4].

Сьогодні, неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) є незалежним фактором ризику розвитку та прогресування кардіоваскулярної патології, важливою компонентою якої є атерогенна ГХ, що виявляється у 20-80% пацієнтів з НАЖХП [3,5,6]. Щорічно в Європі реєструють більше 3,5 мільйонів летальних випадків в наслідок КВЗ, з яких половина в наслідок ІХС [4].

У теперешній час встановлено, що в хворих, які мали ознаки цитолізу "невідомого походження" протягом тривалого часу у 20-32% було виявлено НАЖХП [7]. Серед першочергових факторів розвитку НАЖХП вважають метаболічний синдром, цукровий діабет 2 типу та ГХ [5,6]. Окремим патогенетичним аспектом розвитку НАЖХП та прогресування до НАСГ є порушення структурно-функціонального стану тканини печінки і розвиток білково-енергетичної недостатності, білірубіностазу, ГХ, гіпергомоцистеїнемії [8,9]. Поступова трансформація жирової дистрофії печінки в стеатогепатит обумовлена поглибленням патологічних процесів в тканині, накопиченням ліпідів в гепатоцитах з наступним порушенням цитоархітекtonіки останніх, посиленням вільнорадикального окислення, накопичення продуктів перекисного окислення ліпідів, що призводить до появи ацидозу з подальшим некрозом гепатоцитів [8,9]. Причини та патогенез трансформації стеатозу в

НАСГ і його прогресування до кінця не вивчені і враховуючи позапечінкові наслідки розвитку НАСГ, необхідний вчасний та комплексний підхід до корекції патологічного стану з метою запобігання прогресування НАЖХП і своєчасної корекції ГХ.

Метою дослідження було оцінити вплив моноклеарних стовбурових клітин (МСК) у порівнянні із гепатопротектором на морфофункціональний стан тканини печінки у щурів з НАСГ та ГХ в експерименті.

РОЗДІЛ 1

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

1.1 Дизайн експерименту.

Дослідження було виконане на базі навчальної лабораторії кафедри нормальної та патологічної клінічної анатомії ОНМедУ. Загальна чисельність лабораторних тварин склала $n=100$ статевозрілих самців щурів Wistar, віком 3-4 міс, масою 150-170 г. Моделювання НАСГ відбувалось шляхом заміни стандартного корму віварію на атерогенний раціон із додатковим інтрагастральним введенням пальмової олії із розрахунку 50 г/кг маси тіла протягом 90 діб.

Після патофорфологічного та біохімічного досягнення патологічного стану експериментальних тварин було розподілено на групи: I ($n=30$) - щури з НАСГ та ГХ без корекції - контрольна група; II ($n=30$) - щури з НАСГ та ГХ, з інтрагастральним введенням гепатопротектору "Гепадиф" (Волартан Фарма, Казахстан/Україна) із розрахунку 3 мг/кг; III ($n=30$) - щури з НАСГ і ГХ та внутрішньовенним введенням МСК; IV ($n=10$) - інтактна група. Перший день введення Гепадифу та МСК вважали першим днем експерименту. Тварин виводили з експерименту на 90-у добу моделювання патології та 30-у добу корекції шляхом дислокації I шийного хребця під ефірною анестезією.

Виділення МСК відбувалось шляхом седиментації кісткового мозку на «Гелофузині» [10]. Контроль виділеного пулу клітин проводили розчином толуїдиновим синім. Отримані клітини вводили шляхом внутрішньовенної ін'єкції у хвостову вену, двічі в об'ємі 0,05 мл з інтервалом 1 раз в 7 днів, дотримуючись правил асептики та антисептики.

Всі експериментальні тварини перебували в стандартних умовах віварію з природнім світловим режимом день/ніч, воду і їжу отримували *ad libitum*, на дослідні групи розподілялись випадковим чином. Всі процедури з тваринами були проведені відповідно до міжнародних біотичних правил і норм (European Communities Council Directives of 24 November 1986, 86/609/EEC) протягом

періоду року, коли тривалість світлового періоду доби перевищувала 10 годин. Підготування тварин до експерименту, всі інвазійні втручання, знеболювання та виведення з експерименту проводили згідно відповідних інструкцій (Наказ №755 від 12.08.77р. “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”; Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст.230 від 2006 р., із змінами, внесеними відповідно Закону № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст.76.; а також загальними етичними принципами експериментів на тваринах (I Національний конгрес з біоетики, 20.09.2001 р., м. Київ). Етичним кодексом вченого України (НАНУ, 2009 р.).

1.2 Методи лабораторних досліджень.

Всім експериментальним тваринам були проведені антропометричні виміри (маси тіла кожні 14 днів, маси печінки та математичний розрахунок індексу маси печінки (ІМП)); лабораторні дослідження: загального аналізу крові (ЗАК), біохімічні (загальний холестерин (ЗХ), тригліцериди (ТГ), ліпопротеїди дуже низької щільності (ЛПДНЩ), ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ), ліпопротеїди високої щільності (ЛПВЩ), вираховування коефіцієнта атерогенності (КА), активність печінкових трансаміназ (аланінамінотрансфераза (АЛТ), аспартатамінотрансфераза (АСТ), гамма-глутамілтранспептидаза (ГГТп), лужна фосфатаза (ЛФ) та математичний розрахунок індексу де Рітіса (АСТ/АЛТ), глюкоза крові), інструментальні (ЕКГ).

1.3 Методи патоморфологічних досліджень.

Тканину печінки фіксували в забуференому розчині формаліну концентрацією 10 % протягом 48 годин з подальшим заливанням в парафін «Histomix» та отримання зрізів 3-5 мкм на ротаційному мікротомі Leica RM2125, з забарвленням гематоксиліном-еозином (ГЕ), відповідно до стандартних методик CLSI GP28-A[ISBN 1-56238-563-1] інституту клінічних та

лабораторних досліджень США. Для забарвлення тканини печінки за Судан III, печінку фіксували в забуференому розчині формаліну 10 % протягом 48 годин, промивали дистильованою водою, заморожували та отримували зрізи за допомогою мікротому-кріостату МК-25. Патоморфологічне дослідженням проводили за допомогою світлового мікроскопа «Leica – DLMS».

1.4 Методи статистичних досліджень.

Отримані результати досліджень були адаптовані для математичного обчислення та оброблені методом описової та варіційної статистики з використанням ліцензійних програм Microsoft Excel (Microsoft corporation, 2018) та статистичного пакету програм SPSS Statistics 21.0. Оцінку вірогідності розходження середніх величин проводили з використанням парного t-критерія Стьюдента. Результати вважали статистично достовірними при значені $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 2

АНАЛІЗ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Таблиця 1

Динаміка біохімічних показників сироватки крові досліджуваних груп

Показник	Інтактна група n=10	Контрольна група n=30	I група 30 доба n=30	II група 30 доба n=30	III група 30 доба n=30
АЛТ, од/л	42±3,05	163±7	158±6,12*	120,5±6,24&	85±6,31&#
АСТ, од/л	35±2,07	125±4	121±4,52*	106±5,13&	65±2,64&#
ЗХ, ммоль/л	1,9±0,11	3,7±0,4	3,62±0,33*	2,84±0,20&	2,45±0,1&#
ЛПНЩ, ммоль/л	0,57±0,1	2,06±0,3	1,98±0,37*	1,39±0,24	0,95±0,12&#
ЛПДНЩ, ммоль/л	0,42±0,1	1,17±0,12	1,15±0,15*	0,92±0,09	0,62±0,1&#
ЛПВЩ, ммоль/л	0,91±0,1	0,47±0,12	0,49±0,1*	0,53±0,07	0,88±0,09&#
ТГ, ммоль/л	0,9±0,1	1,51±0,2	1,46±0,12*	1,28±0,08	0,97±0,11&#
КА у.о.	1,1±0,02	6,9±0,4	6,38±0,36	4,36±0,35	1,78±0,17
Глюкоза ммоль/л	4,08±0,69	9,5±0,7	9,4±0,63*	7,2±0,56	5,21±0,31&#

*Примітка: показники представлені у вигляді $M \pm t$, M - середнє арифметичне, t - відхилення від середнього; * - $p < 0,05$ у порівнянні з інтактною групою; & - $p < 0,05$ у порівнянні I групою; # - $p < 0,05$ у порівнянні з II групою.*

На 90-у добу моделювання патологічного стану активність АЛТ була більшою 74 % ($p < 0,01$), АСТ на 72 % ($p < 0,01$) у порівнянні з інтактними

тваринами (табл. 1). Рівень ЗХ був більшим на 49 % ($p < 0,02$), ТГ на 40 % ($p < 0,02$), ЛПНЩ на 72 ($p < 0,01$) у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 1). Рівень ЛПВЩ був меншим на 94 % ($p < 0,01$) у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 1). Порівняльний аналіз отриманих даних ЗАК експериментальних груп на всіх етапах знаходились на рівні базальних значень. Активність ГГТп та ЛФ знаходились на рівні референсних величин.

Макроскопічно: печінка збільшена в розмірі, блідо-жовтого кольору, щільної консистенції. Мікроскопічно, ГЕ: виражена білкова дистрофія, виражена гідропічна дистрофія, поодинокі ділянки мостоподібних некрозів з периваскулярною лімфоцитарною інфільтрацією, центролобулярний внутрішньоклітинний холестаза та виражене повнокрів'я судин (Рис. 1); Судан III: дифузна мікро-, макровезикулярна жирова дистрофія, стеатоз III-IV ступеня (Рис. 2). Виявлені зміни відповідають сформованому НАСГ.

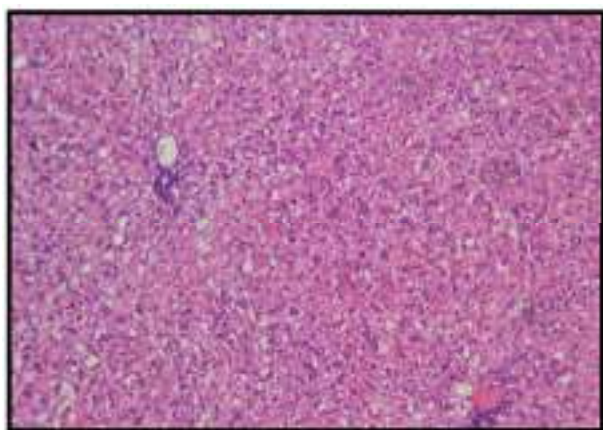


Рис. 1. Контрольна група 90 доба

ГЕ x 200.

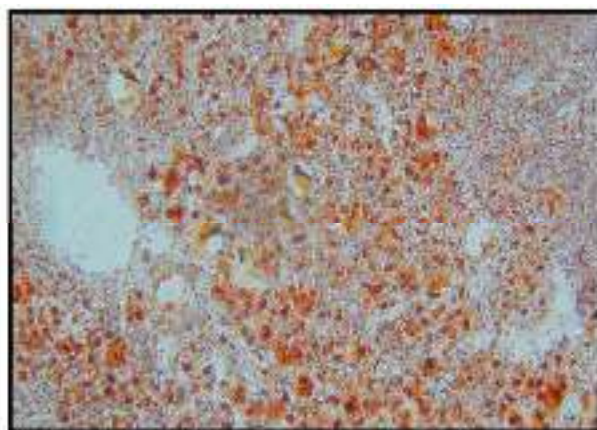


Рис. 2. Контрольна група 90 доба

Судан III x 200.

На 30-у добу експерименту у тварин I групи спостерігалось незначне покращення показників ліпідогамми та зменшення активності печінкових трансаміназ у порівнянні з висхідними даними, однак показники статистичної достовірності не набували. У порівнянні з інтактними тваринами активність АЛТ була більшою у 2,5 рази ($p < 0,01$), АСТ у 2,5 рази ($p < 0,01$) (табл. 1). Рівень ЗХ був меншим на 96 % ($p < 0,01$), ТГ на 62 % ($p < 0,02$), ЛПНЩ у 2,5 рази ($p < 0,01$) у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 1). ЛПВЩ зменшився на

46 % ($p < 0.02$) у порівнянні з інтактними тваринами (табл. 1). Порівняльний аналіз отриманих даних ЗАК експериментальних груп на всіх етапах знаходились на рівні базальних значень. Активність ГГТп та ЛФ знаходились на рівні референсних величин.

Макроскопічно: печінка збільшена в розмірі, блідо-жовтого кольору, щільної консистенції. Мікроскопічно, ГЕ: виражена білкова дистрофія, виражена гідропічна дистрофія, поодинокі ділянки мостоподібних некрозів, виражене повнокрів'я судин; Судан III: дифузна мікро-, макровезикулярна жирова дистрофія, стеатоз II-III ступеня.

На 30-у добу терапії у тварин II групи активність АЛТ була менша на 24 % ($p < 0.02$), АСТ на 12 % ($p < 0.03$) порівняно до I групи (табл. 1). Рівень ЗХ був меншим на 22 % ($p < 0.05$), ТГ на 12 % ($p > 0.05$), ЛПНЩ на 30 % ($p > 0.05$) у порівнянні з I групою (табл. 1). Рівень ЛПВЩ був вище на 8,16 % у порівнянні з I групою ($p > 0.05$) (табл. 1).

Макроскопічно печінка збільшена у розмірі, блідо-жовтого кольору. Мікроскопічно, ГЕ: дифузна білкова дистрофія із фокусами гідропічної дистрофії, повнокрів'я судин, білірубіностаз (Рис. 3); Судан III: дифузна мікро-макровезикулярна жирова дистрофія, стеатоз III ступеня (Рис. 4).

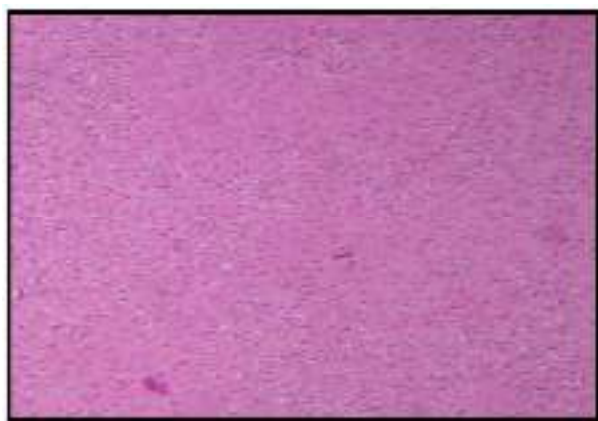


Рис. 3. II група 30 доба

ГЕ x 200.

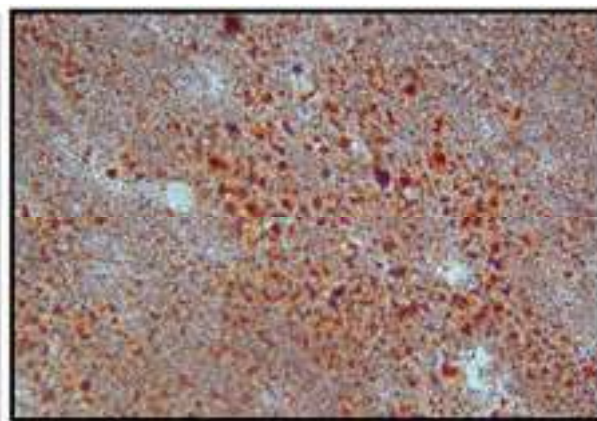


Рис. 4. II група 30 доба

Судан III x 200.

На 30-у добу терапії у тварин III групи активність АЛТ зменшилась на 46 % ($p < 0.02$), АСТ на 47 % ($p < 0.03$) при порівнянні з I групою (табл. 1). Рівень ЗХ був менше на 32 % ($p < 0.02$), ТГ на 34 % ($p < 0.02$), ЛПНЩ на 52 % ($p < 0.02$) у

порівнянні з I групою (табл. 1). Рівень ЛПВЩ був більше на 80 % ($p < 0,01$), у порівнянні з I групою (табл. 1). У порівнянні з II групою активність АЛТ була меншою на 29 % ($p < 0,01$), АСТ на 38 % ($p < 0,01$) (табл. 1). Рівень ЗХ на 14 %, ТГ на 24 % ($p < 0,05$), ЛПНЩ на 32 % ($p < 0,02$) у порівнянні з II групою (табл. 1). Рівень ЛПВЩ збільшився на 66 % ($p < 0,01$), у порівнянні з II групою (табл. 1). При патоморфологічному дослідженні у тварин III групи на 30-у добу терапії виявлено: печінка збільшена у розмірі, бліда, блідо-жовтого кольору. Мікроскопічно, GE: вогнища білкової дистрофії, повнокрів'я судин, (Рис.5); Судан III: мікроевезикулярна жирова дистрофія, стеатоз II ступеня (Рис. 6).

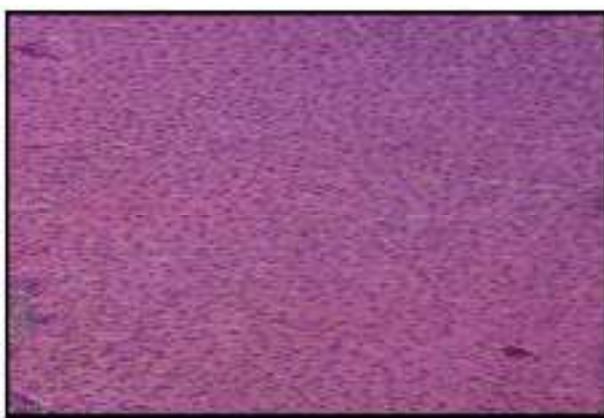


Рис. 5. III група 30 доба

GE x 200



Рис.6. III група 30 доба

Судан III x 200

У тварин інтактної групи на 30-у добу експерименту біохімічні показники не перевищували середні значення у самців щурів лінії Wistar (табл. 1). Макроскопічно печінка нормальних розмірів, темно-червоного кольору, помірної щільності. Мікроскопічно: збережена гістоархітектоніка, чітко виражена балочна структура тканини, запальних та дистрофічні зміни не спостерігаються (Рис. 7-8).

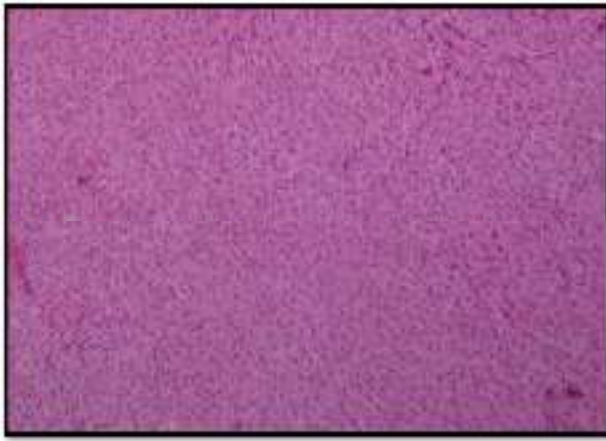


Рис. 7. Інтактні
ГЕ x 200



Рис. 8. Інтактні
Судан III x 200

ВИСНОВКИ

1. Заміна стандартного корму віварія на атерогенний раціон з додатковим інтрагастральним введенням пальмової олії із розрахунку 50 г/кг маси тіла на 90 добу призводить до формування НАСГ із ГХ

2. На 30-у добу після використання гепатопротектору у тварин з НАСГ та ГХ спостерігалось зменшення проявів цитолітичного синдрому, часткова нормалізація ліпідного обміну, гістологічно тканина печінки мала ознаки білкової дистрофії, вогнищевої мікроезичулярної жирової дистрофії, що зменшувались у порівнянні із контрольною групою.

3. На 30-у добу після застосування МСК у тварин з НАСГ та ГХ у порівнянні із контрольною та застосуванням гепатопротектору групами було виявлено достовірне зменшення ферментативної активності печінкових трансаміназ та рівнів атерогенних ліпопротеїдів, а також поліпшення морфологічної структури тканини печінки, що характеризувалось білковою дистрофією, вогнищевою мікроезичулярною жировою дистрофією, стеатозом II ступеня.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Ruan Y, Guo Y, Zheng Y. Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: results from SAGE Wave. *BMC Public Health*. 2018;18(1): 778p. doi:10.1186/s12889-018-5653-9.
2. Saydah S, Bullard KM, Cheng Y, et al. Trends in cardiovascular disease risk factors by obesity level in adults in the United States, NHANES 1999-2010. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(8):1888–1895 p. doi:10.1002/oby.20761.
3. Wang HH, Garruti G, Liu M, Porthincasa D, Wang DQ. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: recent advances in reverse cholesterol transport. *AnnHepatol*.2017;16(Suppl.1:s3-105.);s27-s.42p. doi:10.5604/01.3001.0010.5495.
4. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. Веб джерело: <http://www.ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html>.
5. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64 (1): 73–84. doi:10.1002/hep.28431.
6. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Natur Reviews. Gastroenterol & Hepatol*. 15 (1) 2018: doi:10.1038/nrgastro.2017.109. PMID 28930295.
7. Pariente A. Hepatic cytolysis (aminotranferases increase) in adults. *Hepato-Gastro*. 2013. 629-638 p. doi: 10.1684/hpg.2013.0916.
8. Farooq MO, Bataller R. Pathogenesis and Management of Alcoholic Liver Disease. 2016;34(4):347–355 p. doi:10.1159/000444545.
9. Friedman SL, Neuschwander-Tetri BA, Rinella M, Sanyal AJ. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*. 24 (7): 908–922. doi:10.1038/s41591-018-0104-9.

10. Cai J, Lin H, Yang Y. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by natural sedimentation velocity method. Chinese J of Tissue Engineering Res. 2973-2980. 10.3969/j.issn.2095-4344.2015.19.004.