

## ОЗОНОТЕРАПИЯ, КАК ФАКТОР, ВЛИЯЮЩИЙ НА РЕЗУЛЬТАТЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

УДК 612.223.12:616.36-004-08-092.9

**Осипов Б.Б.**

*УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь*

## OZONOTHERAPY AS A FACTOR HAVING AN IMPACT ON THE RESULTS OF CELL THERAPY OF EXPERIMENTAL LIVER CIRRHOSIS

**Osipov B.B.**

*UO "Gomelskij Gosudarstvennyi Medicinskij Universitet", Gomel, Belarus*

### **Введение**

По данным ВОЗ в последние десятилетия в мире отмечается рост заболеваемости и смертности вследствие хронических диффузных заболеваний печени, в том числе цирроза печени.

При декомпенсированном циррозе печени, до недавнего времени, терапия была симптоматической. Ортопическая трансплантация печени теперь предлагается, как операция выбора при терминальной стадии цирроза печени [1, 2]. Однако дефицит донорских органов не позволяет этому методу решить проблему лечения пациентов с терминальными стадиями заболеваний печени [3]. Поэтому поиск альтернативных методов лечения хронических диффузных заболеваний печени в поздних стадиях остается актуальной проблемой. Клеточная терапия, активно используемая в последние годы при многих заболеваниях [4], стала одним из таких методов. Ряд экспериментальных исследований продемонстрировали улучшение лабораторной и гистологической картины при использовании стволовых клеток в лечении хронических заболеваний печени. В частности, мы в своих экспериментальных исследованиях показали, что трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток обладает положительным терапевтическим эффектом при экспериментальном циррозе печени у кроликов [5, 6, 7]. Однако неоднозначные результаты экспериментального и клинического применения стволовых клеток в гепатологии привели к необходимости поиска способов, которые могли бы улучшить результаты клеточной терапии цирроза печени.

В некоторых исследованиях была доказана роль оксидативного стресса и снижения активности антиоксидантной системы в патогенезе цирроза печени [8, 9]. Поэтому оправданным может являться назначение антиоксидантов для коррекции прооксидантного и ан-

тиоксидантного дисбаланса. В качестве антиоксиданта нами выбран медицинский озон.

**Цель исследования:** оценить влияние озонотерапии на результаты клеточной терапии цирроза печени в эксперименте

### **Материал и методы**

Для выполнения целей нашей работы использовались белые крысы самцы линии Вистар (n=45). Экспериментальные исследования проводились согласно «Положению о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе Гомельского государственного медицинского университета и мерах по реализации требований биомедицинской этики», утвержденным Ученым Советом ГомГМУ №54-А от 23.05.2002 года, и требованиями, регламентирующими работу с экспериментальными животными.

Для развития цирроза печени у крыс использовали предложенную нами токсико-алиментарную модель цирроза печени. Суть модели заключается во внутрибрюшинном введении крысам в течение 8 недель 50% раствора СС14 (тетрахлорметана) на оливковом масле из расчета 0,5 мл на кг массы тела два раза в неделю и раствора тиацетамида из расчета 100 мг/кг один раз в неделю. Кроме того ежедневно с кормом животным вводят 5 г топленого свиного сала, а также добавляют к питьевой воде 5% раствора этилового спирта. На данную модель получен положительный результат предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение Республики Беларусь №a20160406 от 20.11.2016.

После развития цирроза печени токсическое воздействие прекращали одновременно всем животным и

разделяли их на 3 группы. В группу 1 входили крысы с циррозом печени (n=15), которым не проводили никаких терапевтических воздействий (контрольная группа). В группу 2 входили крысы с циррозом (n=15), которым после окончания «затравки» проводили однократную внутрипортальную трансплантацию взвеси аутологичных МСК. И наконец, в группу 3 вошли крысы с циррозом (n=15), которым после окончания «затравки» в течение 5 дней проводили курс озонотерапии, а на следующий день после последнего сеанса озонотерапии также осуществляли однократное внутрипортальное введение суспензии аутологичных МСК.

Озонотерапия проводилась путем внутрибрюшинного введения стерильного *озонированного физиологического раствора* (0,9% раствор натрия хлорида, ОФР). ОФР получали путем барботирования стерильного физиологического раствора озонкислородной смесью на медицинской озонотерапевтической установке УОТА-60-01 «Медозон» (ООО «фирма МЕДОЗОН», Россия). В нашем исследовании использовался ОФР в концентрации 5 мг/л. Вводили ОФР из расчета 5 мкг озона на кг массы тела животного. Озонотерапию проводили курсом из 5 процедур, которые выполняли ежедневно в одно и то же время. Для большей объективности эксперимента крысам групп 1 и 2 провели 5 процедур введения *неозонированного физиологического раствора* в том же количестве. Для клеточной терапии мы применяли аутологичные мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК). Источником аутологичных МСК являлся участок жировой ткани паховой области крысы, забор которого проводили у каждой крысы под масочным наркозом до начала моделирования цирроза печени. Выделение и культивирование МСК из жировой ткани проводили по стандартной методике протокола.

Трансплантация аутологичных МСК проводили путем инъекции в воротную вену крысы после предварительной верхней срединной лапаротомии и визуализа-

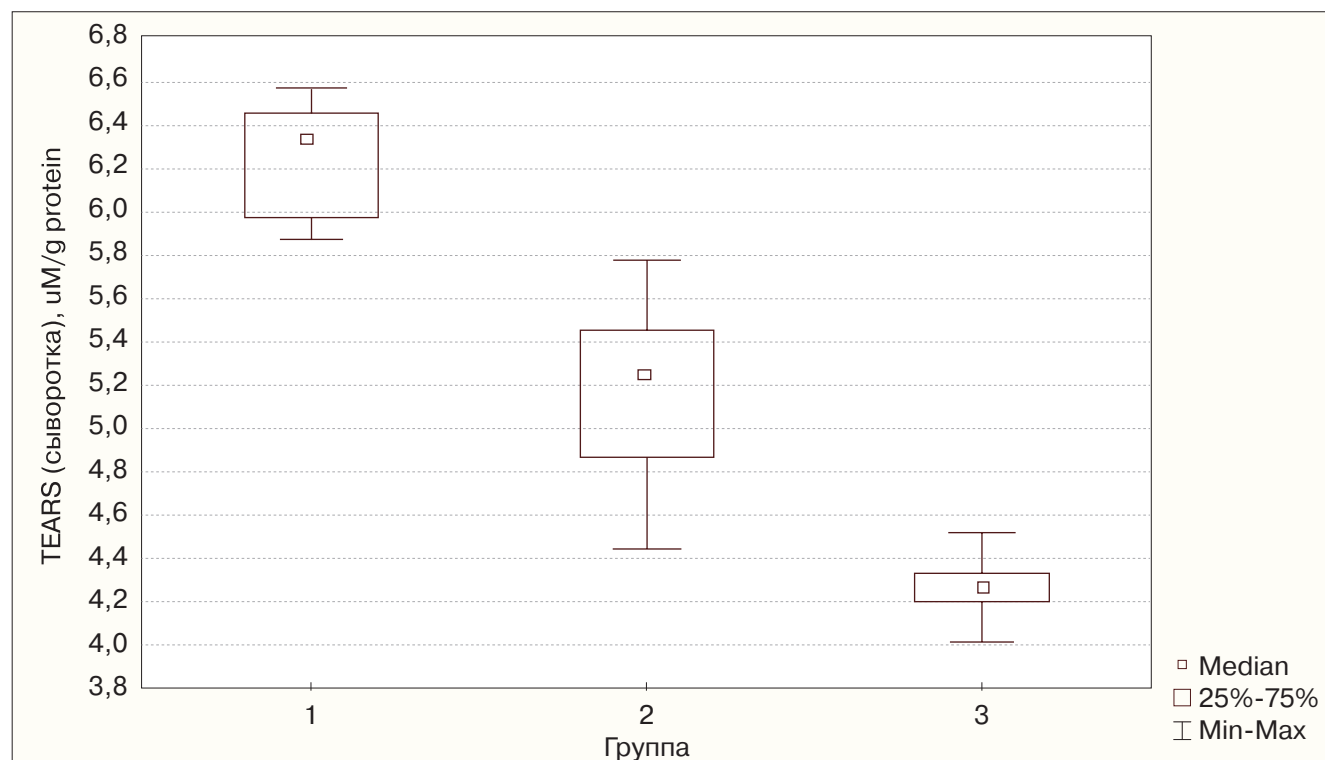
ции воротной вены. Количество введенных клеток составило  $5 \times 10^6$  на килограмм массы тела крысы.

Животные разных групп выводили из эксперимента в одинаковые сроки: в день окончания моделирования цирроза печени (по 5 животных из каждой группы), через 30 дней после введения МСК (по 5 животных из каждой группы) и 90 дней после введения МСК (оставшиеся животные всех групп). Также в день окончания моделирования из эксперимента были выведены 5 здоровых крыс для определения «нормальных» гистологических и лабораторных показателей.

После выведения животных из эксперимента изучали общую морфологическую и морфометрическую картину печени. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином. Морфометрическое исследование гистологических препаратов проводили на микроскопе Nikon eclipse 50i с использованием пакета морфометрических программ ImageJ (NIH, США). Оценивалась толщина соединительнотканых септ, выраженность дистрофических изменений.

В качестве прооксидантного маркера был выбран такой показатель сыворотки крови, как ТБК-продукты (TBARS), который является продуктом окислительной деструкции протеинов и поэтому может выступать, как индикатор выраженности окислительного стресса. Активность же антиоксидантной системы организма оценивалась по уровню фермента глутатионпероксидазы в сыворотке крови. После выведения животных из эксперимента кровь собирали в одноразовые полипропиленовые пробирки (SARSTEDT) и выдерживали при 4°C в течение 1 ч. Сыворотку крови получали центрифугированием (2000g, 20 мин., 4°C), помещали в микропробирки (Eppendorf) и хранили (-80°C) до использования.

Для оценки различий лабораторных показателей и толщины соединительнотканых септ в исследуемых группах использовались непараметрические методы статистики, а именно критерий Манна-Уитни для срав-



**Рис. 1.** Статистическая характеристика групп в зависимости от концентрации ТБК-продуктов (TBARS) в сыворотке крови крыс через 30 дней после трансплантации МСК и курса озонотерапии.

нения двух независимых групп, а также критерий Краскела-Уоллиса при сравнении трех независимых групп. Статистически значимыми результаты считались при  $p < 0,05$ . Все расчеты производились с использованием пакета программ Statistica 8 (Statsoft, США).

### Результаты и обсуждение

#### Патогистологическая картина и показатели прооксидантной и антиоксидантной систем в день окончания моделирования цирроза печени.

Во всех группах животных на данном сроке выявлялась схожая патогистологическая картина цирроза печени с диффузным мелкоочаговым некрозом гепатоцитов, разрастанием соединительной ткани септ, формированием ложных долек, а также большим количеством диффузно расположенных двухъядерных клеток. Медиана толщины септ в группе 1 была 36,44 (31,53-39,01) мкм, в группе 2 – 35,32 (32,76-36,44) мкм и в группе 3 – 34,79 (33,99-34,98) мкм. На данном этапе не обнаружено статистической разницы в толщине септ во всех группах ( $p=0,7843$ ).

Медиана концентрации ТБК-продуктов (TBARS) в сыворотке крови в группе 1 составила 6,89 (6,23-7,11) мкм/г белка, в группе 2 – 6,77 (6,31-7,22) мкм/г белка, в группе 3 – 6,82 (6,18-7,04) мкм/г белка. Для сравнения, аналогичный показатель у здоровых крыс составил 2,10 (2,03-2,15) мкм/г белка. Медиана активности глутатионпероксидазы сыворотки крови в 1-ой группе составила 270,14 (264,78-278,23) Ед/л, во 2-ой группе – 265,18 (258,87-274,98) Ед/л, а в 3-й группе – 277,36 (265,12-282,76) Ед/л. Медиана же активности глутатионпероксидазы у здоровых крыс равнялась 437,25 (431,17-463,13) Ед/л.

Таким образом, не было выявлено статистической разницы в морфометрических и лабораторных показателях между 3-мя группами ( $p=0,97$ ). А вот у здоровых

крыс концентрация ТБК-продуктов и активность глутатионпероксидазы сыворотки крови статистически ниже, чем аналогичные показатели во всех 3-х группах ( $p=0,009$ ).

#### Патогистологическая картина и показатели прооксидантной и антиоксидантной систем через 30 дней после трансплантации МСК и курса озонотерапии.

Через 30 в группе 1 сохранялась патогистологическая картина цирроза печени без положительной динамики, дистрофические изменения в гепатоцитах были выраженными, медиана толщины септ составила 30,57 (29,7-31,92) мкм. В группе 2 при патоморфологическом исследовании фиброз стромы сохранялся, наблюдались единичные ложные дольки, дистрофические изменения были умеренно выраженными, медиана толщины септ составила 24,20 (23,75-25,70) мкм. И наконец, в группе 3 морфометрически происходило уменьшение количества двухъядерных клеток, дистрофические изменения были слабо выраженными, медиана толщины септ составила 20,60 (18,79-20,98) мкм. Таким образом, в 1-й группе толщина септ была статистически выше, чем во 2-й и в 3-й группе ( $p=0,0041$ ). Причем в 3-й группе толщина септ была статистически ниже, чем во 2-й ( $p=0,009$ ).

Медиана активности глутатионпероксидазы сыворотки крови в 1-ой группе составила 325,49 (318,23-329,55) Ед/л, во 2-ой группе – 820,19 (807,45-901,81) Ед/л, а в 3-й группе – 1148,07 (1004,18-1204,69) Ед/л. Статистическая характеристика групп в зависимости от концентрации ТБК-продуктов (TBARS) в сыворотке крови представлена на рисунке 1

Таким образом, во 2-й и 3-й группах через 30 дней концентрация ТБК-продуктов сыворотки крови статистически ниже ( $p=0,0025$ ), а активность глутатионпероксидазы сыворотки крови статистически выше

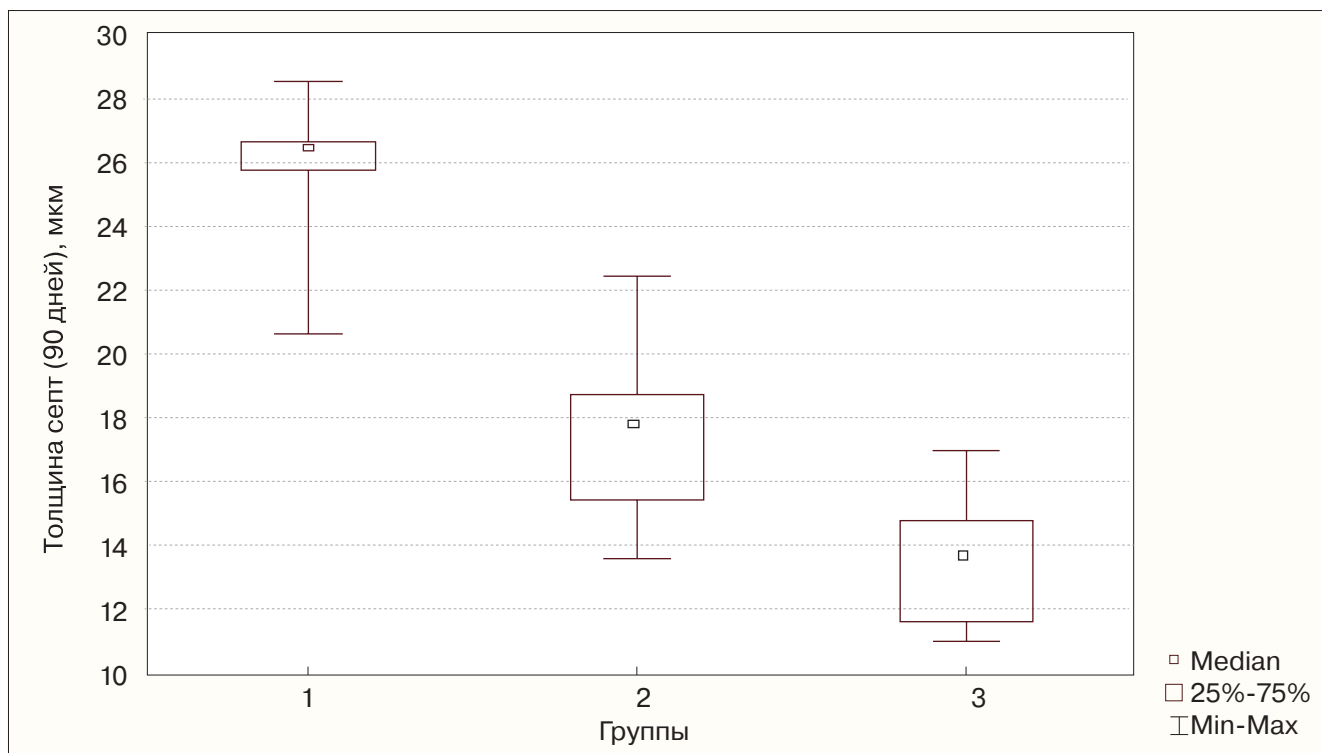


Рис. 2. Статистическая характеристика групп в зависимости от толщины соединительнотканых септ через 90 дней после трансплантации МСК и курса озонотерапии.

( $p=0,0019$ ), чем в 1-й группе. Кроме того в 3-й группе данные показатели статистически отличаются от показателей во 2-ой группе ( $p=0,016$  для ТБК-продуктов и  $p=0,009$  для глутатионпероксидазы).

### Патогистологическая картина и показатели прооксидантной и антиоксидантной систем через 90 дней после трансплантации МСК и курса озонотерапии.

Через 90 дней в образцах печени крыс группы 1 микроскопически отмечались слабо выраженные регенераторные изменения, незначительное уменьшение количества двухъядерных клеток с умеренной степенью выраженности дистрофических изменений. Во 2-ой группе при морфометрическом исследовании наблюдалось снижение количества двухъядерных клеток с сохранением участков с нарушенной гистоархитектоникой печеночных долек и слабо выраженной дистрофией. И наконец, в 3-й группе гистоархитектоника долек стремилась к нормальной. Количество двухъядерных клеток небольшое, встречались участки с незначительным перипортальным фиброзом. Гепатоциты были без дистрофических изменений или со слабо выраженной дистрофией. Статистическая характеристика групп в зависимости от толщины соединительнотканых септ на данном этапе представлена на рисунке 2.

Таким образом, в 1-й группе толщина септ была статистически выше, чем во 2-й и в 3-й группах ( $p=0,0049$ ). В свою очередь, в 3-й группе данный показатель был статистически ниже, чем во 2-й группе ( $p=0,047$ ).

Медиана концентрации ТБК-продуктов (TBARS) в сыворотке крови в группе 1 составила 5,05 (4,67-5,24) мкМ/г белка, в группе 2 – 4,38 (4,19-4,55) мкМ/г белка, в группе 3 – 3,02 (2,87-3,18) мкМ/г белка. Медиана активности глутатионпероксидазы сыворотки крови в 1-ой

группе составила 447,79 (425,17-467,45) Ед/л, во 2-ой группе – 545,25 (537,76-557,46) Ед/л, а в 3-й группе – 662,21 (567,56-678,34) Ед/л.

Таким образом, через 90 дней во 2-й и 3-й группах концентрация ТБК-продуктов ниже ( $p=0,0045$ ), а активность глутатионпероксидазы выше ( $p=0,0052$ ), чем в 1-й группе. Кроме того имеются статистические различия в данных показателях между 2-й и 3-й группами ( $p=0,009$  для ТБК-продуктов и  $p=0,047$  для глутатионпероксидазы).

### Выводы

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток приводит к последовательному улучшению гистологической картины при экспериментальном циррозе печени через 30 и 90 дней после клеточной терапии, что подтверждается статистически значимым улучшением морфометрических показателей.

Озонотерапия способствует улучшению результатов клеточной терапии экспериментального цирроза печени. Механизм положительного влияния озонотерапии, вероятно, связан с антиоксидантным эффектом, который проявляется в статистически значимом уменьшении концентрации прооксидантных маркеров (продукты окислительной деструкции протеинов) и повышением активности антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидаза) сыворотки крови по сравнению с животными, не получавшими курс озонотерапии.

У крыс с циррозом печени, получавших только клеточную терапию, также отмечается некоторое улучшение (статистически значимое) прооксидантных и антиоксидантных показателей сыворотки крови по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать о косвенном, антиоксидантном эффекте трансплантации стволовых клеток.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шумаков, В.И. Трансплантология: руководство для врачей / В.И. Шумаков. – М: Медицинское информационное агентство, 2006. – 544 с.
2. Bussutil, R.W. Transplantation of the liver, 3rd edition / R.W. Bussutil, G.K. Klintmalm. – Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. – P.1485
3. Андрейцева О.И. Возможности ортотопической трансплантации печени при лечении больных с терминальными поражениями печени. / О.И. Андрейцева // Консилиум медикум. – 2004. – № 6
4. Лызикив, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы. / А.Н. Лызикив, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцов. // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – №3. – С. 4-8.
5. Осипов, Б.Б. Клеточная терапия экспериментального цирроза печени у кроликов / Б.Б. Осипов, А.Н. Лызикив, А.Г. Скуратов, Д.Р. Петренев, А.А. Призенцов // Проблемы здоровья и экологии. – 2017. – № 1 – С.57-62.
6. Осипов, Б. Б. Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток при циррозе печени в эксперименте [Электронный ресурс] / Б. Б. Осипов [и др.] // Современные технологии в хирургической практике: сб. материалов Респ. науч. -практ. конф., [28 апр. 2017 г., г. Гродно] / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, УО "Гродн. гос. мед. ун-т"; редкол.: В. А. Снежицкий [и др.]. – Гродно, 2017. – С. 154-157. – 1 эл. опт. диск.
7. Осипов, Б.Б. Модель токсического поражения печени у кроликов / А.Н. Лызикив, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, Д.А. Зиновкин, А.М. Михасев // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 2. – С.45-50. Parola, M. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis / M. Parola, G. Robino // J Hepatol. – 2001 – №35 – P. 297– 306.
8. Parola, M. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis / M. Parola, G. Robino // J Hepatol. – 2001 – №35 – P. 297–306.
9. Rolo, A.P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A.P. Rolo, J.S. Teodoro, C.M. Palmeira // Free Radic. Biol. Med. – 2012 – №1 – P. 59-69.

### REFERENCES

1. Shumakov V.I. Transplantologija [Transplantology]. Moscow: Medical information agency; 2006. 544 p. (Russian).
2. Bussutil, R.W. Transplantation of the liver, 3rd edition / R.W. Bussutil, G.K. Klintmalm. – Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. – P.1485
3. Andrejceva O.I. Vozmozhnosti ortotopicheskoj transplantacii pecheni pri lechenii bol'nyh s terminal'nymi porazhenijami pecheni [Opportunity of ortotopic liver transplantation in treatment of patients with terminal liver diseases]. Konsilium medikum [Medical consilium]. 2004. 6.(Russian).
4. Lyzikov A.N., Osipov B.B., Skuratov A.G., Prizencov A.A. Stvolovye kletki v regenerativnoj medicene: dostizhenija i perspektivy [Stem cells in regenerative medicine: achievements and perspectives]. Problemy zdorov'ja i jekologii; 2015.3. P. 4-8(Russian).
5. Osipov B.B., Lyzikov A.N., Skuratov A.G., Petrenov D.R., Prizencov A.A. Kletochnaja terapija jeksperimental'nogo cirroza pecheni u krolikov [Cell therapy of experimental liver cirrhosis in rabbits]. Problemy zdorov'ja i jekologii. 2017. 1. P.57-62(Russian).
6. Osipov B.B., Lyzikov A.N., Skuratov A.G., Zinovkin D.A., Petrenov D.R. Transplantacija mezenhimal'nyh stvolovyh kletok pri cirroze pecheni v jeksperimente [Jelektronnyj resurs][Transplantation of mesenchymal stem cells in experimental liver cirrhosis]. Sovremennye tehnologii v hiruricheskoj praktike: sb. materialov Resp. nauch. -prakt. konf., [28 apr. 2017 g., g. Grodno] / M-vo zdorvoohranenija Resp. Belarus', UO "Grodno. gos. med. un-t"; redkol.: V. A. Snezhickij [i dr.]. Grodno. 2017. P.154-157 (Russian).
7. Osipov B.B., Lyzikov A.N., Skuratov, A.G. Zinovkin D.A., Mihasev A.M. Model' toksicheskogo porazhenija pecheni u krolikov [Model of toxic liver injury in rabbits]. Problemy zdorov'ja i jekologii. 2015. 2. P.45-50.(Russian)
8. Parola, M. Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis / M. Parola, G. Robino // J Hepatol. – 2001 – №35 – P. 297– 306.
9. Rolo, A.P. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis / A.P. Rolo, J.S. Teodoro, C.M. Palmeira // Free Radic. Biol. Med. – 2012 – №1 – P. 59-69.

**РЕЗЮМЕ**

Целью данного исследования являлась оценка влияния озонотерапии на результаты клеточной терапии цирроза печени в эксперименте у крыс. В качестве объекта в данной работе использовались белые крысы-самцы линии Вистар ( $n=45$ ). После моделирования у всех крыс цирроза печени одной группе крыс (группа 3) проводился курс озонотерапии. Затем крысам групп 2 и 3 проводили однократное внутривенное введение суспензии мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Животных выводили из эксперимента перед введением МСК, через 30 и 90 дней после трансплантации, изучали патогистологическую картину печени, а также прооксидантные и антиоксидантные маркеры сыворотки крови со статистической обработкой полученных результатов.

Введение аутологичных МСК при экспериментальном циррозе печени приводит к статистически значимому последовательному снижению толщины соединительнотканых септ в печени ( $p=0,0041$ ), снижению концентрации прооксидантных маркеров ( $p=0,0025$ ) и повышению активности антиоксидантных ферментов ( $p=0,0019$ ) сыворотки крови через 30 и 90 дней после клеточной терапии по сравнению с контрольными животными. Курс озонотерапии перед клеточной терапией приводит к статистически значимому улучшению указанных показателей по сравнению с аналогичными показателями при монотерапии стволовыми клетками ( $p<0,05$ ).

По результатам исследования можно сделать вывод, что трансплантация аутологичных МСК приводит к последовательному улучшению гистологической картины при экспериментальном циррозе печени через 30 и 90 дней после клеточной терапии. Озонотерапия способствует улучшению результатов клеточной терапии экспериментального цирроза печени. Механизм положительного влияния озонотерапии, вероятно, связан с антиоксидантным эффектом, который проявляется в статистически значимом уменьшении концентрации прооксидантных маркеров и повышением активности антиоксидантных ферментов сыворотки крови.

**Ключевые слова:** мезенхимальные стволовые клетки, цирроз печени, озонотерапия, глутатионпероксидаза, морфометрия, клеточная терапия, антиоксиданты, прооксидантные маркеры.

**ABSTRACT**

The purpose of our study was to evaluate the impact of ozonotherapy on the results of cell therapy of experimental liver cirrhosis. White Wistar male rats ( $n=45$ ) were used as an object of our study. After modeling of liver cirrhosis a course of ozonotherapy for one group of rats (group 3) was performed. Then animals of groups 2 and 3 were treated with single intra-portal injection of autologous mesenchymal stem cells (MSCs). Animals had been sacrificed before cell therapy, 30 days and 90 days after cell transplantation, pathohistological state of liver, prooxidant and antioxidant markers of blood serum had been examined with further statistical analysis.

Administration of autologous MSCs in experimental liver cirrhosis leads to statistically significant consistent reduction of thickness of connective-tissue septa in liver ( $p=0,0041$ ), decreasing of prooxidant markers concentration and increasing of antioxidant markers activity ( $p=0,009$ ) 30 days and 90 days after cell transplantation in comparison with control animals. Course of ozonotherapy before cell therapy leads to statistically significant improvement of mentioned indicators in comparison to those in case of monotherapy with stem cells ( $p<0,05$ ).

Transplantation of autologous MSCs leads to consistent improvement of histological state in liver cirrhosis 30 days and 90 days after cell therapy. Ozonotherapy facilitates the improvement of the results of cell therapy of experimental liver cirrhosis. The mechanism of the positive impact of ozonotherapy is probably in its antioxidant effect, which occur in statistically significant decreasing of prooxidant markers concentration and increasing of antioxidant markers activity.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, liver cirrhosis, ozonotherapy, glutathione peroxidase, morphometry, cell therapy, antioxidants, prooxidant markers.

**Контакты:**

**Осипов Б.Б.** E-mail: b\_osipov\_jr@mail.ru