

,О.М.Драпкина// Кардиоваскулярная терапия и профилактика.- 2020.- Том 19.- № 3.- С.219-226.

5.Биомаркеры сердечно-сосудистых заболеваний/Щербак С. Г., Лисовец Д.Г., Сарана А.М., [и др.]// Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация.- 2019.-том 1.-№ 2.- С.60 -76.

### **Сведения об авторах**

С.П. Скирпичников - студент

Л.А. Каминская - кандидат химических наук, доцент

### **Information about the authors**

S.P. Skirpichnikov – student

L.A. Kaminskaia -Candidate of Sciences (Chemistry), Associate Professor

**\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

svyatoi\_otec\_semeon@mail.ru

**УДК 616-092.9**

## **ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ПЛАЦЕНТАРНЫМИ ММСК И ФУКОКСАНТИНОМ ПРИ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ**

Василий Николаевич Слаутин<sup>1</sup>, Дарья Михайловна Коновалова<sup>1</sup>, Дмитрий Юрьевич Гребнев<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра патологической физиологии

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения РФ

<sup>2</sup>ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий»

Екатеринбург, Россия

### **АННОТАЦИЯ**

**Введение.** В настоящее время отсутствуют эффективные нехирургические методы лечения терминальных стадий фиброза печени. Перспективным представляется использование мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), способных вырабатывать антифибротические факторы роста, противовоспалительные цитокины и матриксные металлопротеиназы, а также применение фукоксантина, антифибротическое действие которого было доказано *in vitro* на культуре перисинусоидальных клеток печени. **Ито. Цель исследования** - оценить эффективность комбинированного применения плацентарных ММСК и фукоксантина при фиброзе печени. **Материал и методы.** Эксперименты проведены на 30 мышах, разделённых на 3 группы: интактную группу, группа ССL<sub>4</sub>, группу комбинированного лечения. В исследовании использовались ММСК, выделенные из хориона плаценты мышей. Для моделирования фиброза печени мышам группы ССL<sub>4</sub>, группы комбинированного лечения вводили тетрахлорметан в дозе 2 мкл/кг внутривентриально 2 раза в неделю в течение 6 недель. Трансплантацию ММСК осуществляли в дозе 1 млн. клеток в хвостовую вену. Фукоксантин вводили ежедневно *per os* в дозе 10 мг/кг. Для оценки эффективности комбинированного лечения проведено исследование гистологических препаратов с использованием шкалы METAVIR. Для количественной оценки

соединительной ткани в печени использован краситель Sirius red. Иммуногистохимическим методом произведён анализ количества  $\alpha$ -SMA+ клеток, а также ТИМП-1 положительных областей. Методом ИФА в гомогенате печени проведено определение TGF- $\beta$ . **Результаты.** Применение комбинированной терапии привело к снижению выраженности фиброзных изменений. Площадь окрашенной на наличие коллагенов области и количество  $\alpha$ -SMA+ клеток были снижены более чем на 50%. Уровни TGF- $\beta$  и ТИМП-1 достигли значений интактной группы. **Выводы.** Результаты настоящего исследования продемонстрировали высокую эффективность стратегии комбинированной терапии фиброза с использованием ММСК и фукоксантина при фиброзе печени.

**Ключевые слова:** Комбинированная терапия, фиброз печени, перисинусоидальные клетки Ито, ТИМП-1.

## **EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPY WITH PLACENTAL MMSC AND FUCOXANTHIN IN LIVER FIBROSIS**

Vasilii N. Slautin<sup>1</sup>, Daria M. Konovalova<sup>1</sup>, Dmitry Yu. Grebnev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathological Physiology

Ural state medical university

<sup>2</sup>Institute of Medical Cell Technologies

Yekaterinburg, Russia

### **Abstract**

**Introduction.** Currently, there are no effective non-surgical methods for the treatment of terminal stages of liver fibrosis. The use of MSC seems promising due to their ability to produce antifibrotic growth factors, anti-inflammatory cytokines, and matrix metalloproteinases, as well as the use of fucoxanthin, the antifibrotic effect of which has been proven in vitro on the culture of HSC. **The purpose of the study** was to examine the effectiveness of the combined use of placental MSCs and fucoxanthin in liver fibrosis. **Material and methods.** Experiments were carried out on 30 mice divided into 3 groups: intact animals' group, CCL<sub>4</sub> group, combined treatment group. The study used MSC isolated from the placental chorion of mice. To simulate liver fibrosis, mice of the CCL<sub>4</sub> group and the combined treatment group were injected with carbon tetrachloride at a dose of 2  $\mu$ l/ kg, intraperitoneally, 2 times a week, for 6 weeks. MSC transplantation was carried out at a dose of 1 million cells into the tail vein. Fucoxanthin was administered daily, through a gastric tube, at a dose of 10 mg / kg. To assess the effectiveness of combined treatment, histological studies were performed using the METAVIR scale. Sirius red dye was used for coloring on ECM. The immunohistochemical method was used to analyze the number of  $\alpha$ -SMA+ cells, as well as TIMP-1 positive regions. The determination of TGF- $\beta$  in liver homogenate was carried out by the ELISA method. **Results.** The use of combination therapy led to a decrease in the severity of fibrotic changes. Indicators of the area of staining on connective tissue and the number of  $\alpha$ -SMA+ cells were reduced by more than 50%. The levels of TGF- $\beta$  and TIMP-1 reached normal values. **Conclusions.** The results of this study demonstrated the high effectiveness of the combined therapy of placental MSC and fucoxanthin in liver fibrosis.

**Keywords:** Co-treatment, liver fibrosis, HSC, TIMP-1.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Отсутствие эффективных методов лечения терминальных стадий фиброза печени, альтернативных хирургическому, является актуальной проблемой здравоохранения. Хирургический метод – трансплантация печени – обладает рядом недостатков: дороговизна, нехватка доноров и длинные листы ожидания, высокая частота осложнений и др.

Одним из альтернативных нехирургических методов лечения фиброза печени является клеточная терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). Однако современные методы лечения на основе клеток сталкиваются со значительными сложностями при внедрении в клиническую практику. Поэтому перспективным представляется комбинированное введение ММСК с веществами, обладающими антифибротическим действием, для усиления терапевтического потенциала клеточной терапии.

Целью настоящего исследования является оценка эффективности комбинированной терапии плацентарными ММСК и фукоксантином при фиброзе печени.

К преимуществам использования плацентарных ММСК относятся: нехирургический метод получения, высокий пролиферативный потенциал, высокая пролиферативную активность, сниженная адипогенная дифференцировка, высокая выживаемость по сравнению с ММСК, полученными из костного мозга и жировой ткани [1, 2].

Фукоксантин – это каротиноид, содержащийся в бурых и диатомовых водорослях. Известно, что фукоксантин обладает антиоксидантным, противовоспалительным, гепатопротекторным действием. Кроме того, в работе М.В.Ким и соавт. было продемонстрировано, что фукоксантин способен блокировать активацию перисинусоидальных клеток печени Ито *in vitro* [3].

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ**

В исследовании использовались 30 самцов мышей в возрасте 8-10 недель (массой 20-22 г). Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава РФ. Для моделирования фиброза печени CCL<sub>4</sub>, разведённый на персиковом масле (1:4), вводили внутривенно в дозе 2 мкл/г в течение 6 недель 2 раза в неделю. Животные были разделены на 3 группы: интактную группу, группу CCL<sub>4</sub> и группу комбинированного лечения. Животные группы CCL<sub>4</sub> получали тетрахлорметан в течение 6 недель. Вывод из эксперимента проводили через 5 недель после последней инъекции. Животные группы комбинированного лечения после моделирования фиброза печени получали фукоксантин (SigmaAldrich, USA) в дозе 10 мг/кг *per os* в течение 5 недель и ММСК в дозе 1 млн. клеток внутривенно в хвостовую вену.

Для гистологического исследования из левой доли печени были взяты кусочки органа размером 10x10x5 мм, которые фиксировались в 10% растворе

нейтрального забуференного формалина («Ретиноиды», Россия) для изготовления гистологических срезов.

Для гистологической оценки выраженности фиброза печени использовалась шкала METAVIR. Окраска на содержание коллагена I и III типов проводилась с использованием набора Picro Sirius Red Stain Kit (Abcam, Великобритания). Полученные микропрепараты исследовались с использованием светового микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). В каждом препарате печени было проанализировано 15 областей площадью по 0,28 мм<sup>2</sup>. Общая распространенность фиброза в печени была выражена в процентах и определена как отношение окрашенной на коллагены области к общей площади анализируемого препарата. Итоговое значение общей выраженности фиброза определялось как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение в 15 областях. Для анализа микрофотографий использована морфометрическая программа SIAMS 800 (ООО «Сиамс», Россия).

Для проведения иммуногистохимических исследований гистологические препараты инкубировали с первичными кроличьими антителами к мышши (Abcam, Великобритания) в течение 12 часов при температуре +4<sup>0</sup>C: ТИМП-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1; Anti-TIMP1 antibody), 1: 500 (Abcam, Великобритания);  $\alpha$ -SMA (Alpha-smooth muscle actin; Recombinant Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, clone EPR5368), 1: 1000 (Abcam, Великобритания).

Срезы инкубировали с вторичными антителами (Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP), 1: 500) при комнатной температуре в течение 2 часов (Abcam, Великобритания). Для выполнения иммуногистохимических исследований была использована система детекции (DAB Substrate Kit) с субстратом пероксидазы (Abcam, Великобритания). Окраска ядер клеток гистологического препарата была выполнена с использованием гематоксилина Майера (Avantor, Нидерланды). Подсчёт клеток, положительных по ТИМП-1 и  $\alpha$ -SMA производился в 15 областях площадью по 0,28 мм<sup>2</sup> (объектив x20).

Методом ИФА определялся уровень трансформирующего фактора роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) в гомогенате печени. Выявление TGF- $\beta$  выполнялось с использованием набора Mouse TGF beta 1 ELISA Kit (Abcam, Великобритания). Оценка производилась на иммуноферментном и биохимическом анализаторе Chem Well 2910 (Combi, США).

Полученные данные обрабатывались вариационно-статистическим методом с использованием t-критерия Стьюдента. При отсутствии нормальности распределения статистическая значимость различий определялась с опорой на непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия при  $p < 0,05$  считались статистически значимыми.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ**

По результатам гистологической оценки фиброзных изменений в печени по шкале METAVIR, мышши интактной группы не имели фиброзных изменений. Животные группы CCL<sub>4</sub> имели 3 стадию (80%) и 2 стадию (20%) фиброза печени. После применения комбинированной терапии установлено снижение количества мышшей с 3 стадией фиброза печени на 75%. Более того у 10%

лабораторных животных группы комбинированной терапии установлена 0 стадия фиброза печени (таблица 1).

Таблица 1

Лабораторные животные с различными стадиями фиброза по шкале METAVIR через 5 недель после моделирования фиброза печени

Группа	Стадия 0	Стадия 1	Стадия 2	Стадия 3	Стадия 4
Интактная группа	10	0	0	0	0
Группа CCL <sub>4</sub>	0	0	2	8	0
Комбинированное лечение	1	5	2	2	0

Также, для оценки выраженности фиброзных изменений проведено измерение площади окрашенной на коллагены области. Установлено значительное увеличение содержания соединительной ткани в группе CCL<sub>4</sub> по сравнению с группой интактных животных ( $2,28 \pm 0,23\%$ ,  $7,33 \pm 0,80\%$ ),  $p < 0,05$ . Использование комбинированной терапии привело к снижению данного показателя на  $50,47\%$  ( $3,63 \pm 0,38\%$ ),  $p < 0,05$ .

Уровень TGF- $\beta$  оценивался методом ИФА в гомогенате печени. В группе CCL<sub>4</sub> значение данного показателя увеличилось в 2 раза ( $12,27 \pm 1,80$  нг/г,  $23,05 \pm 1,40$  нг/г),  $p < 0,05$ . В группе комбинированного лечения уровень TGF- $\beta$  достиг показателей группы интактных животных ( $12,03 \pm 1,63$  нг/г),  $p < 0,05$ .

Количество  $\alpha$ -SMA+ клеток оценивалось с использованием иммуногистохимического метода исследования. В группе CCL<sub>4</sub> было установлено значительное увеличение данного показателя ( $11,90 \pm 2,78$  кл. /мм<sup>2</sup>,  $193,69 \pm 19,35$  кл. /мм<sup>2</sup>),  $p < 0,05$ . Применение терапии ММСК и фукоксантина привело к снижению данного показателя на  $54,22\%$  по сравнению с группой CCL<sub>4</sub> ( $88,67 \pm 9,77$  кл. /мм<sup>2</sup>),  $p < 0,05$ .

Иммуногистохимическим методом также оценивался уровень тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1. Площадь окрашенной на ТИМП-1 области была значительно увеличена в группе CCL<sub>4</sub> по сравнению с группой интактных животных ( $7,83 \pm 0,80\%$ ,  $12,81 \pm 0,99\%$ ),  $p < 0,05$ . Площадь окрашенной на ТИМП-1 области в группе комбинированной терапии не имела достоверных различий с группой интактных животных ( $7,87 \pm 0,82\%$ ),  $p < 0,05$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ

К основным признакам, характеризующим фиброз печени, можно отнести: количественное изменение содержания коллагенов, качественное изменение состава внеклеточного матрикса, изменение топографического распределения соединительной ткани, увеличение содержания  $\alpha$ -SMA+ миофибробластов, повышенные уровни ТИМП-1 [4].

Длительное и/или хроническое повреждение печени способно активировать процессы фиброгенеза. Провоспалительные цитокины, факторы роста и АФК воздействуют на клетки Ито, запускают процессы их активации и дифференцировки в миофибробласты. Ключевым профиброгенным фактором

роста является TGF- $\beta$  [5]. Так, в группе CCL<sub>4</sub> установлено значительное повышение уровня TGF- $\beta$  по сравнению с интактной группой.

Главным источником миофибробластов в печени (от 82% до 96%) являются перисинусоидальные клетки Ито [5]. В настоящем исследовании было установлено значительное увеличение количества  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> клеток в печени в группе CCL<sub>4</sub> по сравнению с результатами группы интактных животных.

Перисинусоидальные клетки печени Ито выполняют функции депонирования витамина А и синтеза коллагена IV и VI типов. Миофибробласты после активации и дифференцировки синтезируют фибриллярные коллагены I и III типа и фибронектин [6]. В данном исследовании выявлено значительное увеличение площади окрашенной на коллаген I и III типов области в группе CCL<sub>4</sub> по сравнению с интактной группой, а также нарушение топографического распределения качественно изменённого внеклеточного матрикса.

Миофибробласты синтезируют избыточное количество ТИМП-1, ингибирующего активность антифибротических ферментов [6]. Площадь окрашенной на ТИМП-1 области в группе CCL<sub>4</sub> была значительно выше, чем в группе интактных животных.

## **ВЫВОДЫ**

Результаты настоящего исследования продемонстрировали высокую эффективность стратегии комбинированной терапии фиброза с использованием ММСК и фукоксантина при фиброзе печени.

Применение комбинированной терапии плацентарными ММСК и фукоксантином привело к снижению выраженности фиброзных изменений, снижению количества  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> миофибробластов и площади окраски на коллагены I и III типов, а также к нормализации показателей TGF- $\beta$  и ТИМП-1.

## **СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Tan L., Liu X., Dou H., Hou Y. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment — specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* 2022, Vol. 9, pp. 296–309. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.10.006.
2. Grebnev D.J., Slautin V.N., Maklakova I.J., Beresneva O.Y., Konyshv K.Y. Mechanisms of antifibrotic action of placental multipotent mesenchymal stromal cells. *J. Ural Med. Acad. Sci.* 2022, Vol. 19, pp. 355–364. DOI: 10.22138/2500-0918-2022-19-4-355-364.
3. Kim M.B., Bae M., Hu S., et al. Fucoxanthin exerts anti-fibrogenic effects in hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019, Vol. 513, pp. 657–662. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.052.
4. Pakshir P., Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biology*, 2018, Vol. 68–69, pp. 81–93. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.01.019.
5. Puche J.E., Spurpousean Y., Friedman S.L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 2013, Vol. 3, pp. 1473–1492. DOI: 10.1002/cphy.c120035.
6. Tan Z., Sun H., Xue T., et al. Liver Fibrosis: Therapeutic Targets and Advances in

Drug Therapy. Front. Cell Dev. Biol. 2021, Vol. 9, pp. 1–18. DOI: 10.3389/fcell.2021.730176.

### **Сведения об авторах**

В.Н. Слаутин\* – аспирант кафедры

Д.М. Коновалова – ординатор

Д.Ю. Гребнев – доктор медицинских наук, доцент

### **Information about the authors**

V.N. Slautin\* – Postgraduate student

D.M. Konovalova - Postgraduate student

D.Yu. Grebnev – Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor

**\*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

vas-slautin@yandex.ru

**УДК 57.017.32**

## **РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСА ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ ЛЯМБЛИОЗА СРЕДИ ДЕТЕЙ ДОШКОЛЬНОГО ВОЗРАСТА**

Елизавета Егоровна Солякова, Марина Валентиновна Чеснокова, Елена

Александровна Шорикова

Кафедра медицинской биологии и генетики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

Екатеринбург, Россия

### **Аннотация**

**Введение.** В наше время паразитарные кишечные инфекции продолжают занимать одну из лидирующих позиций. **Цель исследования** – выявить наиболее подверженную лямблиозу возрастную группу пациентов в Невьянском городском округе, и, обозначив её как целевую аудиторию, разработать комплекс профилактических мероприятий. **Материал и методы.** Статистическая обработка выполнена в Microsoft Excel, проанализированы данные по лабораторным исследованиям на лямблиоз, собранных на базе лаборатории ГАУЗ СО "Невьянская центральная районная больница НГО", определение возрастной целевой группы и разработка для неё комплекса профилактических мероприятий, направленных на минимизирование случаев заражения лямблиями. **Результаты.** Ранжирование результатов диагностики лямблиоза методом ИФА по возрастным группам показало, что более подвержены лямблиозу дети. Это и есть целевая аудитория, для которой были разработаны профилактические мероприятия в виде игры. **Выводы.** Выявлена возрастная группа пациентов, среди которых зараженность лямблиозом составляет 15-20%- это дети от 1 года до 5 лет. Анализ результатов анкетирования среди родителей детей этого возраста позволил определить актуальные проблемы, связанные с предотвращением заражения лямблиозом детей. Определена целевая группа, для которой разработаны и проведены профилактические мероприятия по профилактике лямблиоза в виде игр.

**Ключевые слова:** лямблиоз, профилактика, статистика, дети, ИФА.