

Изменения индекса резистентности общей печёночной артерии при лечении цирроза печени аутологическими стволовыми клетками

Р.Э. Джафарли

*Азербайджанский медицинский университет, Баку, Азербайджан;
Международный центр биотехнологий «Biostem» Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака, Донецк, Украина*

В работе обобщены результаты экспериментальных исследований и обоснованы преимущества использования аутологических мезенхимальных стволовых клеток на морфофункциональное состояние печени при цирротическом её поражении. Эксперименты были проведены на крысах (Wistar, экспериментальная модель цирроза печени). Для изучения эффективности использования стволовых клеток в лечении цирроза печени и портальной гипертензии, мы в сравнительном порядке провели исследования функционального состояния печени. Результаты исследования показали значимые преимущества использования стволовых клеток на репаративную способность печени, что было доказано ультразвуковыми исследованиями.

Ключевые слова: цирроз печени, портальная гипертензия, стволовые клетки, трансплантация

Увеличение в последние годы числа факторов, способствующих повреждению печени с последующим её цирротическим поражением, показывает социальную и медицинскую важность патологии [1,2].

При лечении цирроза печени (ЦП), в зависимости от степени тяжести и причины, вызвавшей болезнь, используются консервативные и хирургические способы коррекции [3]. Однако, несмотря на достигнутые достижения, исходы лечения зачастую омрачаются неудовлетворительными результатами, связанными, в основном, с прогрессированием заболевания, осложнениями и высокой летальностью [1].

Достижения клеточной биологии последних десятилетий и проведённые экспериментальные исследования показали возможность клеточной трансплантации для восстановления и активации регенераторных функций паренхимы печени при различных её поражениях [2]. Авторы в своих исследованиях показали, что применение стволовых клеток (СК) при различных диффузных повреждениях паренхимы печени сопровождается улучшением её морфофункционального состояния и повышением качества жизни пациентов [3,4].

Как известно, изменения печёночной гемодинамики имеют важное значение в развитии цирроза печени [5,6]. Применение на этапах лечения цирроза печени с наличием портальной гипертензии методом ульт-

развукового доплеровского исследования может быть информативным для изучения эффективности трансплантации СК [7,8].

Многие авторы в своих работах показывают диагностическую важность при ультразвуковом доплеровском исследовании сосудов печени (в области ворот и непосредственно в паренхиме) индекса резистентности в общей печёночной артерии [7].

Приведённые выше данные побудили нас провести экспериментальные исследования по изучению эффективности трансплантации стволовых клеток в динамике лечения цирроза печени по данным ультразвуковых доплеровских показателей.

Цель исследования: изучение эффективности трансплантации стволовых клеток при лечении цирроза печени с синдромом портальной гипертензии на индекс резистентности общей печёночной артерии по данным ультразвукового доплеровского исследования.

Материал и методы. Исследования были выполнены на базе Международного центра клеточного культивирования Донецкого института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака (НАМН Украины) и Научно-исследовательским центром Азербайджанского медицинского университета.



В экспериментах использовали 28 белых крыс-самцов (Wistar) массой 150-180 г, возраст которых составлял не менее 3 месяцев.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях». ЦП моделировали путём подкожного введения СС14 из расчёта 0,3 мл/100 г массы тела животного в виде 50% масляного раствора, дважды в неделю в течение 12 недель. Животных содержали в условиях вивария при свободном доступе к пище и воде, на рационе питания, соответствующем нормативам. Момент формирования ЦП определяли по биохимическим (сывороточные АЛТ, АСТ, ЛДГ, альбумин), морфологическим (фиброз с формированием соединительнотканых септ и ложных долек, дистрофия и некроз гепатоцитов) и инструментальным (УЗИ) критериям.

Забор стволовых клеток. Аутологические мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из костного мозга получали по стандартной методике [1]. Для идентификации и характеристики клеточных линий МСК учитывали основные критерии, рекомендованные Международным обществом клеточных технологий (ISCT) в 2006 году [1]. Среди них: а) способность стволовых клеток к адгезии к пластику в стандартных условиях культивирования; б) наличие более чем у 95% клеточных элементов позитивных маркёров CD105 (эндоглин), CD73 (экто-5'-нуклеотидаза) и CD90 (антиген тимоцитов-1); в) наличие не более чем у 2% клеток негативных маркёров CD45, CD34, CD14 или CD11b, CD79 или CD19, HLA-DR; г) способность клеточной линии к *in vitro*, дифференцировке остеобластов и адипоцитов.

Полученные стволовые клетки культивировали *in vitro* в среде IMDM с 10% ЭТС (Sigma, США), 2 mM L-глутамина и 10⁻⁴ М 2-меркаптоэтанола в течение 42 дней. Обязательным было исследование биоматериала на стерильность по отношению к возможной бактериальной, либо вирусной контаминации.

Этап трансплантации стволовых клеток: на современном этапе исследователи предлагают использовать различные пути введения полученных стволовых клеток, обосновывая их преимущества.

Мы в своих наблюдениях сочли целесообразным в сравнительном порядке изучить эффективность внутрипортального введения полученных СК.

Внутрисосудистые манипуляции осуществлялись интраоперационно. В качестве анестезии мы использовали Ketamin в дозе 90 mg/kg и Ksilazin в дозе 90 mg/kg веса животного.

Введение аутогенных СК в портальную вену осуществляли лапаротомией однократно, путём введения

1 мл взвеси клеток из расчёта 2,0x10⁶ на 100 г от массы животного.

В качестве объективной оценки эффективности внутрипортального введения СК мы на этапах лечения осуществляли УЗИ органов брюшной полости в А и В-режиме, импульсно-волновую доплерографию (ИВДГ) на ультразвуковых аппаратах «SonoRex-4800» фирмы Medison (Ю.Корея) и «Ultramark-9» фирмы «Ultrasoundssystem» (США). При УЗИ печени оценивали контуры, размеры органа, состояние паренхимы, определялось наличие свободной жидкости в брюшной полости.

Методом ИВДГ изучался кровоток в общей печёночной артерии (оПА), воротной вене (ВВ). Состояние кровотока оценивалось по качественным и количественным характеристикам. Количественные параметры спектра доплеровского сдвига частот сосудов портальной системы включали следующие показатели: V_{max}, см/с – максимальная линейная скорость кровотока, V_{min}, см/с – конечно-диастолическая скорость, TAMX, см/с – максимальная линейная скорость кровотока, усреднённая по времени, Q, мл/мин – объёмная скорость кровотока, RI – индекс циркуляторного сопротивления, резистентности, PI – индекс пульсации.

Индекс резистентности в печёночной артерии определялся с помощью программного обеспечения ультразвукового сканера по формуле $RI = \frac{V_{ms} - V_{ed}}{V_{ms}}$, где V_{ms} – максимальная систолическая скорость кровотока, V_{ed} – конечная диастолическая скорость кровотока. Данный параметр количественно отражает величину периферического сопротивления в сосудах артериального русла.

Животные исследовались в утренние часы, натощак, в спокойном функциональном состоянии. При статистическом анализе полученных данных использовались следующие показатели: среднее значение показателя и среднеквадратическое отклонение. Достоверность различий между сравниваемыми величинами оценивалась по критерию Стьюдента. Рассчитывались общепринятые критерии оценки информативности метода: чувствительность, специфичность, точность, положительный и отрицательный предсказательные тесты. Обработка данных выполнялась на ПК с помощью программы Statistika 5.5.

Результаты и их обсуждение. Представленные выше параметры доплерографии были использованы для оценки в эксперименте эффективности лечения ЦП аутологическими стволовыми клетками.

В момент формирования экспериментальной модели у всех наблюдаемых животных были выявлены специфичные ультразвуковые признаки цирроза печени и портальной гипертензии. Ультразвуковая картина печени отличалась наличием выраженной

бугристости, структура печени гиперэхогенная, выявлялись множественные фиброзные узлы. Наличие спленомегалии выявляли в 28,6% наблюдений.

Отсутствие литературных данных в отношении сведений о нормативных ультразвуковых доплеровских показателях побудили нас провести указанные исследования у наблюдаемых животных ещё до формирования экспериментальной модели цирроза печени.

Лабораторные и ультразвуковые доплеровские показатели в наблюдаемых группах обследованных животных приведены в таблице.

Как показали наши исследования, диаметр общей печёночной артерии и линейная скорость кровотока в последней у наблюдаемых животных оказались выше, в сравнении с результатами, полученными при сформированной модели цирроза печени на

8,2±2,1% ($p<0,001$) и на 10,9±3,3% ($p<0,01$), соответственно. Кроме того, в нашем исследовании индекс резистентности общей печёночной артерии у животных при сформированной модели цирроза печени также был выше нормы. Это согласуется с мнением большинства исследователей [12], но противоречит данным отдельных авторов [14], отметивших снижение значения индекса резистентности печёночной артерии при наличии цирроза печени.

Как показали наши исследования, индекс резистентности печёночной артерии при сформированной модели цирроза печени составил $0,73\pm0,01$. Указанное изменение, по литературным данным, характерно для цирротического поражения печени.

У животных на 8 неделе лечения цирроза печени СК сохранялись лабораторные признаки умеренного цитолиза, (который отражался в показателях АСТ и АЛТ), гепатомегалия.

ТАБЛИЦА. УЛЬТРАЗВУКОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ ГЕМОДИНАМИКИ ПЕЧЕНИ У НАБЛЮДАЕМЫХ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛЬЮ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Параметры	Результаты, полученные до начала моделирования ЦП	Печёночная гемодинамика при сформированной модели ЦП	Печёночная гемодинамика на 8 неделе после трансплантации СК
D оПА, мм	3,3±0,2	4,9±0,3*	4,5±0,2**
V max оПА, см/с	28,54±11,23	46,71±10,05	41,62±9,17*
RI оПА	0,61±0,02	0,73±0,01*	0,69±0,03**
D BB, мм	5,1±0,3	8,2±0,2*	7,3±0,4
V max BB, см/с	19,13±2,54	13,64±2,11	15,13±2,63

Примечание: * - $p<0,001$; ** $p<0,01$

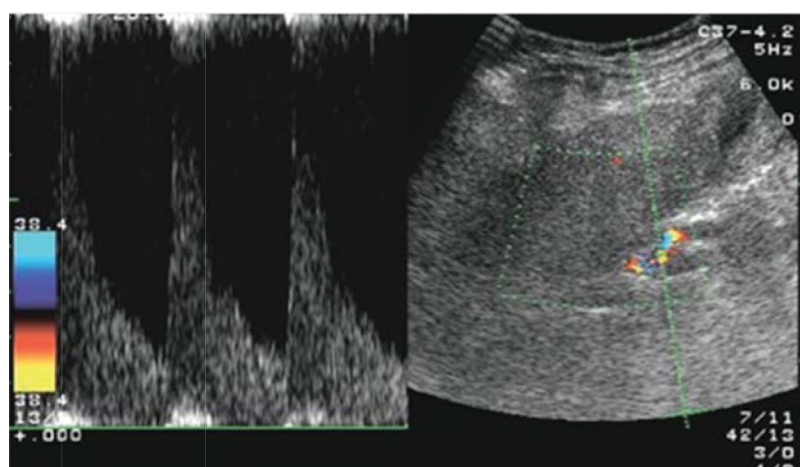
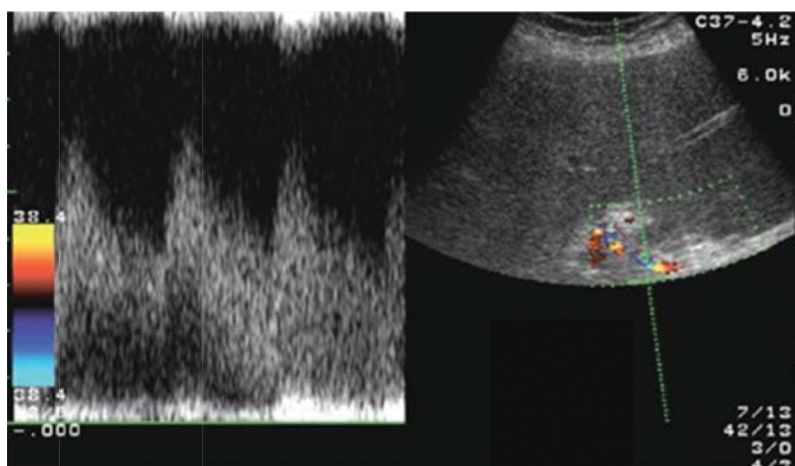


РИС. 1. ЭХОГРАММА: СПЕКТР КРОВОТОКА В ПЕЧЁНОЧНОЙ АРТЕРИИ У ЖИВОТНОГО СО СФОРМИРОВАННОЙ МОДЕЛЬЮ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ (IR=0,73±0,01)



**РИС. 2. ЭХОГРАММА: СПЕКТР КРОВОТОКА В ПЕЧЁНОЧНОЙ АРТЕРИИ НА 8 НЕДЕЛЕ ПОСЛЕ
ВНУТРИПОРТАЛЬНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОГЕННЫХ СК ($IR=0,69\pm0,03$)**

У наблюдаемых нами животных на 8 неделе лечения аутологическими стволовыми клетками отмечалась тенденция к стабилизации изучаемого показателя. Как показано в таблице 1, на 8 неделе после внутрипортальной трансплантации СК индекс резистентности в общей печёночной артерии составил $0,69\pm0,03$ (рис. 1 и 2). В указанные сроки данный показатель, если и превышал средний показатель нормы на 13,1%, был ниже показателя при сформированной модели цирроза печени на 5,5% ($p<0,01$).

Наши исследования совпали с литературными данными в плане изучения гемодинамики печени при цирротическом её поражении. Кроме воротного кровотока, при циррозе печени существенно изменяется артериальный печёночный кровоток. В ряде исследований отмечено повышение резистентного индекса печёночной артерии у больных циррозом печени [9], в других работах такая особенность не выявлена [10]. В одних работах [1] обнаружена зависимость между степенью повышения резистентных индексов и функциональным классом по классификации Чайлд-Пью, в других работах – такая зависимость не отмечалась [12]. В отдельных исследованиях резистивные индексы коррелировали с уровнем печёночного венозного градиента давления [13], в других – такая корреляция отсутствовала [14].

В некоторых работах отмечена зависимость величины изменения резистивных индексов от степени варикозного расширения вен пищевода [14].

Таким образом, в настоящее время не существует единого мнения об особенностях изменения артериального печёночного кровотока у больных циррозом печени. Наши исследования показали, что выявление при ультразвуковом исследовании у больных циррозом печени низкого индекса резистентности в печёночной артерии является дополнительным диагностическим показателем цирроза печени.

Чувствительность данного признака составила 78 %, специфичность – 100%, точность – 88%. Менее специфичным ультразвуковым признаком цирроза печени является повышение скорости кровотока по общей печёночной артерии.

До конца не определены факторы, влияющие в наибольшей степени на регионарную циркуляцию печени у таких больных. Однако, как показали наши исследования, стимуляция регенерации периваскулярной зоны паренхимы печени на фоне лечения аутологическими СК приводила к уменьшению резистентности общей печёночной артерии на фоне увеличения объёма кровотока по воротной вене.

ЛИТЕРАТУРА

1. Terai S. Improved liver function in liver cirrhosis patients after autologous bone marrow cell infusion therapy / S.Terai, T.Ishikawa, K.Omori // Stem Cells. – 2006; 24: 2292-2298.
2. Salama H. Efficacy of autologous hematopoietic stem cell transplantation in 57 patients with end stage chronic liver disease / H.Salama, A.Zekri, M.Zern // Cell Transplant. – 2010; 19: 1475-1486.
3. Smets F. Cell transplantation in the treatment of liver diseases / F.Smets, M.Najimi, E.M.Smokal // Pediatr. Transplant. – 2008. - Vol. 12, №1. - P.6-13
4. Егоров В.В. Стволовые клетки человека / В.В.Егоров, А.А.Иванов, М.А.Пальцев // Молекулярная медицина. – 2003. - № 2. - С. 3-14.
5. Wolf C. Temporary extracorporeal replacement using isolated hepatocytes / C.Wolf, B.Munkelt // Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs. – 2005. - Vol. 21. - P. 16-27



6. Iwao T. Value of Doppler ultrasound parameters of portal vein and hepatic artery in the diagnosis of cirrhosis and portal hypertension / T.Iwao [et al.] // Am. J. Gastroenterol. -1997. - Vol.92(6). - P. 1012-1017.
7. Schneider A.W. Hepatic arterial pulsatility index in cirrhosis: correlation with portal pressure / A.W.Schneider, J.F.Kalk, Ch.P.Klein // J. of Hepatol. - 1999. - Vol.30. - P. 876-881.
8. Sacerdoti D. Hepatic arterial resistance in cirrhosis with and without portal vein thrombosis: relationships with portal hemodynamics / D.Sacerdoti [et al.] // Gastroenterology. - 1995. -Vol. 108. - P. 1152-1158.
9. Piscaglia P. Influence of liver fibrosis on hepatic artery Doppler resistance index in chronic hepatitis of viral origin / P.Piscaglia [et al.] // Scand J. Gastroenterol. -2001. - Vol.36(6). - P.647-652.
10. Sacerdoti D. Interobserver and interequipment variability of hepatic, splenic, and renal arterial Doppler resistance indices in normal subjects and patients with cirrhosis / D.Sacerdoti [et al.] // J. Hepatol. -1997. - Vol.27. - P.986-992.
11. Han S.-H.B. Duplex Doppler ultrasound of the hepatic artery in patients with acute alcoholic hepatitis / S.-H.B.Han [et al.] // J. Clin Gastroenterol. -2002. - Vol.34(5). - P.573-577.
12. Bernatik T. Doppler measurements: a surrogate marker of liver fibrosis? / T. Bernatik [et al.] //Eur J. Gastroenterol Hepatol. - 2002. - Vol.14(4). - P.383-387.
13. Tasu J.P. Hepatic venous pressure gradients measured by duplex ultrasound / J.P. Tasu [et al.] // Clinical Radiology. - 2002. -Vol.57. - P.746-752.
14. Numata K. Hemodynamic changes in hepatic artery after glucose ingestion in healthy subjects and patients with cirrhosis / K.Numata [et al.] // J. Clin Ultrasound. - 1998; 26 (3): 137-142

Summary

Changes of index resistance of common hepatic artery in treatment of liver cirrhosis by autologous stem cell

R.E. Jafarli

Azerbaijan Medical University, Baku, Azerbaijan;

International Center for Biotechnology «Biostem» Institute of Urgent and Recovery Surgery named after V.K. Gusak, Donetsk, Ukraine

The paper summarizes the results of experimental studies and proved the advantages of using autologous mesenchymal stem cells on the morphological and functional condition of the cirrhotic liver lesion. Experiments were carried out on rats (Wistar, an experimental model of liver cirrhosis). To study the effectiveness of using stem cells in the treatment of liver cirrhosis and portal hypertension, in a comparative manner, we conducted a study of the functional state of liver. The results showed significant benefits of using stem cells on liver's repair ability, which has been proven by ultrasound.

Key words: liver cirrhosis, portal hypertension, stem cell, transplantation

АДРЕС ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Джафарли Расим Эльхам – старший научный сотрудник отделения хирургии печени Научного центра хирургии им М.А. Топчубашева;
Азербайджан, г.Баку, ул. Шариф-заде, 196
E-mail: dr-jafarli@mail.ru