### Печень

DOI: 10.16931/1995-5464.2015417-26

# Фотодинамическая терапия при циррозе печени (экспериментальное исследование)

Гарелик П.В.<sup>1</sup>, Могилевец Э.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Кафедра общей хирургии, <sup>2</sup> 1-я кафедра хирургических болезней УО "Гродненский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Беларуси; 230009, г. Гродно, ул. Горького, д. 80, Республика Беларусь

Цель. Изучение эффектов фотодинамической терапии при циррозе печени в эксперименте.

Материал и методы. В эксперименте 44 белым крысам-самцам линии Вистар с помощью CCl<sub>4</sub> индуцировался цирроз печени. На следующий день после последнего введения CCl<sub>4</sub> опытным группам животных внутривенно (в хвостовую вену) вводился фотолон в дозе 3,0 мг/кг. Лазерное излучение проводилось в дозе 10 Дж/см<sup>2</sup> с длиной волны 670 нм через 3 ч после введения препарата. Выполнялись морфологическое исследование ткани печени, электронная микроскопия, биохимическое исследование крови, определение свободных аминокислот плазмы крови.

Результаты. На фоне использования фотодинамической терапии отмечалась редукция соединительной ткани в паренхиме печени. Уменьшалась степень выраженности альтеративных изменений гепатоцитов, была резко уменьшена липидная инфильтрация гепатоцитов и соответствовала <1,0 по Hornboll. Активировался биосинтез белка. Клетки Ито находились в пассивном состоянии, что свидетельствует о положительном влиянии на течение процессов коллагенообразования. Через месяц на фоне применения фотодинамической терапии общий билирубин был меньше в 2,16 раза, активность АлАТ − в 2,96 раза, коэффициент де Ритиса − в 2 раза, активность ЩФ − в 4,4 раза, ЛДГ − в 3,1 раза, ГГТП − в 2,86 раза, чем у животных без воздействия. Суммарное содержание аминокислот после фотодинамической терапии также было меньше в 1,43 раза, протеиногенных − в 1,43 раза, заменимых − в 1,53 раза, ароматических аминокислот − в 1,72 раза, чем у животных с циррозом печени в те же сроки без лечения. Индекс Фишера (АРУЦ/ААК) был больше в 1,24 раза. Содержание пролина и оксипролина при применении предлагаемого способа лечения уменьшалось на 55 и 52% и было статистически значимо меньше, чем в контрольной группе, в 1,77 и 1,63 раза соответственно.

**Заключение.** Проведенное экспериментальное исследование указывает на целесообразность изучения перспектив применения метода в клинических условиях у пациентов с циррозом печени.

**Ключевые слова:** печень, цирроз печени, фотодинамическая терапия, морфология печени, электронная микроскопия, аминокислоты.

## Photodynamic Therapy for Liver Cirrhosis (Experimental Study)

Garelik P.V.1, Mahiliavets E.V.2

<sup>1</sup> Chair of General Surgery, <sup>2</sup> the 1<sup>st</sup> Department of Surgery of Grodno State Medical University, Ministry of Health of the Republic of Belarus; 80, Gorkogo str., Grodno, 230009, Republic of Belarus

**Aim.** To study the effects of photodynamic therapy for liver cirrhosis in experiment.

Material and Methods. Liver cirrhosis was induced in 44 white rats-males Wistar rats using CCl<sub>4</sub> in the experiment. Photolon at a dose of 3.0 mg/kg was intravenously introduced (tail vein) in experimental groups of animals in 1 day after the last injection of CCl<sub>4</sub>. In 3 hours laser irradiation of liver was performed at a dose of 10 j/cm<sup>2</sup> with a wavelength of 670 nm. Morphological examination of liver tissue, electron microscopy, biochemical analysis of blood, determination of free amino acids in blood plasma were carried out.

Results. There was reduction of connective tissue in liver parenchyma after photodynamic therapy. Hepatocytes' alternative changes and their lipid infiltration were drastically reduced. Infiltration corresponded to <1.0 by Hornboll. Protein biosynthesis was activated. Ito cells was in passive state that indicated on positive effect of photodynamic therapy on the processes of collagen formation. Use of photodynamic therapy decressed total bilirubin in 2.16 times, alanine aminotransferase – 2.96 times, De Ritis coefficient – 2 times, alkaline phosphatase – 4.4 times, lactate dehy-drogenase – 3.1 times, gamma glutamyltranspeptidase – 2.86 times. Total level of amino acids decreased in 1.43 times, proteinogenic amino acids – in 1.43 times, non-essential – in 1.53 times, aromatic amino acids – in 1.72 times in experimental animals than in those with liver cirrhosis at the same time without treatment. Level of proline and hydroxyproline was reduced by 55% and 52% and it was significantly lower than in rats without treatment in 1.77 and 1.63 times, respectively.

Conclusion. The experimental study indicates on advisability to study this technique in clinical conditions in liver cirrhosis patients.

Key words: liver, liver cirrhosis, photodynamic therapy, liver morphology, electron microscopy, amino acids.

#### Введение

Вопросы, касающиеся оптимизации регенерации печени при циррозе, обсуждаются в научной печати [1]. Ключевым моментом, играющим роль в патогенезе нарушения регенерации при этом заболевании, является избыточное развитие соединительной ткани. Фиброз печени является стадией раневого процесса в ответ на повреждение печени. Трансдифференциация звездчатых клеток печени в миофибробласты является ключевым событием в процессе фиброгенеза печени. Исследования последних лет выявили ее ключевые медиаторы и молекулярные механизмы [2, 3].

Фотодинамическая терапия (ФДТ) нашла широкое применение в различных областях медицины. Интерес представляют исследования, посвященные ее эффектам на патогенез образования соединительной ткани [4, 5]. Целесообразным в связи с этим является изучение влияния ФДТ на гистологическую и ультраструктурную картину печени, биохимические показатели и аминокислотный спектр плазмы крови при ССІ<sub>4</sub>-индуцированном циррозе печени (ЦП) в эксперименте.

#### • Материал и методы

Экспериментальное исследование выполняли согласно этическим нормам обращения с животными, критериям мирового сообщества и Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986). В модели эксперимента использованы 44 белые крысы-самцы линии Вистар. Животным проводилось моделирование развития ЦП подкожным введением 66% раствора ССІ<sub>4</sub> в растительном масле в дозе 0,3 мл 4 раза в неделю в течение 6 мес. Затем воздействие CCl<sub>4</sub> прекращалось, и крысы были разделены на 6 групп. Группа 1 — 7 интактных крыс для определения референсных значений условной нормы. Группа 2 - 7 крыс с ЦП, которые выводились из эксперимента на следующий день после последнего введения  $CCl_4$ . Группа 3 — 7 крыс с ЦП, которые выводились из эксперимента через 7 дней после окончания затравки. Группа 4 – 7 крыс с ЦП, которым на следующий день после последнего введения CCl<sub>4</sub> применялась разработанная методика ФДТ и которые выводились из эксперимента через 7 дней после окончания затравки. Группа 5-8 крыс с ЦП, которые выводились из эксперимента через 30 дней после окончания затравки. Группа 6-8 крыс с ЦП, которым на следующий день после последнего введения  $CCl_4$  применялась разработанная методика  $\Phi$ ДТ и которые выводились из эксперимента через 30 дней после окончания затравки.

ФДТ проводилась следующим образом. На следующий день после последнего введения ССІ<sub>4</sub> крысам внутривенно (в хвостовую вену) вводился фотолон в дозе 3,0 мг/кг, через 3 ч после введения препарата проводился сеанс облучения печени в дозе 10 Дж/см<sup>2</sup> с использованием лазерного аппарата, генерирующего излучение красного спектрального диапазона с длиной волны 670 нм, совпадающей с максимумом спектрального поглощения препарата фотолон. На данный способ коррекции регенерации печени оформлена заявка на выдачу патента на изобретение Республики Беларусь.

ФДТ — метод сочетанного воздействия на организм светового излучения, потенцируемый применением химических веществ-фотосенсибилизаторов, повышающих чувствительность тканей к излучению, используемый в настоящее время для лечения различных состояний.

Для достижения необходимого эффекта, а именно для уменьшения фиброза печени использовали дозу лазерного излучения, обоснованную имеющимися литературными данными о влиянии ФДТ на состояние соединительной ткани. Показано, что применение ФДТ приводит к изменению плотности коллагена соединительной ткани [4], активирует апоптоз фибробластов, модулирует экспрессию факторов роста и цитокинов, уменьшает синтез коллагена и приводит к дегенерации сформированного коллагена [5], ингибирует пролиферацию и миграцию фибробластов гипертрофированного рубца [6]. ФДТ оказывает ингибирующий эффект на пролиферацию фибробластов келлоидной ткани [7], ФДТ с дозой излучения 10 Дж/см<sup>2</sup> улучшает репарацию и снижает образование соединительной ткани ран, оказывает цитотоксический эффект на келлоидные фибробласты [8]. Доказано также, что ФДТ с применением хлорина Е6 не поражает клетки печени и глиссонову капсулу [9].

**Гарелик Петр Васильевич** — доктор мед. наук, профессор, заведующий кафедрой общей хирургии УО "ГрГМУ". **Могилевец Эдуард Владиславович** — канд. мед. наук, доцент 1-й кафедры хирургии УО "ГрГМУ".

**Для корреспонденции:** Могилевец Эдуард Владиславович — 230028, г. Гродно, ул. Стрелковая, д. 19, кв. 7. Тел.: 8-10-375-29-5861600. E-mail: emogilevec@yandex.ru

**Garelik Petr Vasilievich** — Doct. of Med. Sci., Professor, Head of the Department of General Surgery of Grodno State Medical University. **Mogilevets Eduard Vladislavovich** — Cand. of Med. Sci., Assistent Professor of the Department of General Surgery of Grodno State Medical University.

For correspondence: Mogilevets Eduard Vladislavovich – Apt. 7, 19, Strelkovaja str., Grodno, 230028, Belarus. Phone: 8-10-375-29-5861600. E-mail: emogilevec@yandex.ru

Среди характерных особенностей морфологических изменений в печени на фоне цирроза рассматривается сниженная способность к репаративной регенерации. Полноценному восстановлению структуры паренхимы препятствует синтез коллагенов I, III и IV типов в перисинусоидальном пространстве, что ведет к нарушению микроциркуляции, вызывает дисфункцию органа и способствует развитию портальной гипертензии. Образующиеся фиброзные прослойки являются причиной регенерации гепатоцитов в форме регенераторных гепатом, ложных долек, узлов регенератов [10, 11].

Широко изучается вклад звездчатых клеток печени в прогрессирование фиброза печени. В результате хронических заболеваний печени клетки Ито и постоянно присутствующие в портальных трактах фибробласты и миофибробласты, продуцирующие элементы экстрацеллюлярного матрикса, проходят процесс активации и приобретают фенотип, характеризующийся повышенными пролиферативными, двигательными и сократительными способностями. Фиброз печени является исходом многих хронических заболеваний, включая вирусный и аутоиммунный гепатит, хронический алкоголизм и билиарную обструкцию. Длительное повреждение печени приводит к разрушению гепатоцитов, что в свою очередь активирует звездчатые клетки печени и способствует формированию в паренхиме воспалительной инфильтрации. При этом клетки Ито играют важнейшую роль в фиброгенезе. Они продуцируют коллаген I типа, секретируют профиброгенные цитокины и ингибируют ферменты, разрушающие матрикс (тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы), в результате чего образуются депозиты экстрацеллюлярного матрикса. Многие экспериментальные и клинические исследования свидетельствуют об обратимости процесса за счет апоптоза активированных звездчатых клеток печени. В связи с этим их и выбирают в качестве мишени при разработке терапии фиброза [12–18].

Таким образом, имеются данные о редукции фиброза в тканях при воздействии ФДТ, а также выявлены механизмы реализации данного эффекта. В то же время незавершенность регенераторных процессов при ЦП во многом обусловлена избыточной продукцией соединительной ткани. Исходя из изложенного, перспективным является исследование в эксперименте методов ФДТ в аспекте стимуляции, коррекции и оптимизации механизмов репаративной регенерации в паренхиме печени. Целесообразным также является изучение воздействия метода на клетки Ито и процесс фиброгенеза при ЦП. Учитывая, что положительные результаты ФДТ на процессы формирования соединительной ткани получены в дозе 10 Дж/см<sup>2</sup> с применением различных фотосенсибилизаторов, была выбрана именно эта доза излучения.

Животные групп сравнения (3, 5) без воздействия ФДТ с естественным ходом регенераторных процессов после последнего введения  $CCl_4$  получали эквиобъемную инъекцию физиологического раствора и "облучение" в режиме плацебо — контактное воздействие насадки без включения лазерного излучения.

После выведения животных из эксперимента забирали ткань печени. Кусочки печени фиксировали в 10% нейтральном формалине (для заключения в парафин). Парафиновые срезы толщиной 7—10 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и по Малори для выявления волокнистой соединительной ткани. Изучение и микрофотографирование гистологических препаратов проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия) и цифровой видеокамеры (Leica DFC 320, Германия).

Ультраструктурные изменения в печени изучались при помощи электронной микроскопии (микроскоп JEM-1011 (JEOL, Япония), увеличение в 10000—60000 раз) на ультратонких срезах после фиксации 1% раствором четырехокиси осмия на 0,1 М буфере Миллонига, контрастирование которых выполняли раствором уранилацетата (2%) на 50% метаноле [19] и по методике E.S. Reynolds цитратом свинца [20].

Для биохимического исследования крови забиралась плазма крови животных. В крови определялись содержание альбумина, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), рассчитывался коэффициент де Ритиса. Определение свободных аминокислот (АК) плазмы крови проводили на аминокислотном анализаторе АААЗЗЭТ.

Статистическая обработка выполнена с использованием пакета программ Statistica 7.0 и Microsoft Excel 2010.

#### • Результаты и обсуждение

При выведении животных из эксперимента и заборе проб печени необходимо отметить отсутствие в зоне воздействия признаков кровотечения и желчеистечения, спаечного процесса при применении ФДТ, что является важным положительным моментом в связи с возможностью более безопасного манипулирования в этой зоне в случае необходимости выполнять в перспективе трансплантацию печени.

Через 7 дней после последнего введения  $CCl_4$  без лечения у животных в дольках наблюдалась отчетливая мозаичная картина структурного поражения паренхимы печени в результате некроза, фиброза и стеатоза. Ситуация усугублялась выраженной липидной инфильтрацией гепатоци-

тов, приводящей к гибели клеток по типу жирового перерождения. Липидная инфильтрация печени согласно критерию Hornboll соответствовала 2—3-й степени. При окрасках на выявление волокнистой соединительной ткани наблюдается значительное ее разрастание, характерное для ЦП (рис. 1).

Через 7 дней после применения предложенного способа ФДТ степень выраженности альтеративных изменений гепатоцитов значительно уменьшилась: белковая дистрофия практически не определялась, а жировая дистрофия носила зональный характер, охватывая небольшую часть гепатоцитов, соответствовала 0—1-й степени по Hornboll, в то время как в основной популяции гепатоцитов выявлялись лишь единичные липидные включения. Мезенхимально-клеточная реакция была выражена слабо и являлась мелкоочаговой. Разрастание волокнистой соединительной ткани также было менее выражено, а у некоторых животных снижалось до минимума (рис. 2).

Через 30 дней после последнего введения  $\mathrm{CCl_4}$  без лечения структурные нарушения в печени полностью сохранялись, а в некоторых случаях и несколько усиливались. Ситуация усугублялась еще более выраженной крупнокапельной липидной инфильтрацией гепатоцитов, приводящей к гибели клеток по типу жирового перерождения. Липидная инфильтрация печени согласно критерию Hornboll соответствовала 3-й степени. Разрастание соединительной ткани, характеризующее ЦП, также сохранялось (рис. 3).

ФДТ значительно улучшает структурное состояние печени. Через месяц после проведенного лечения липидные включения определялись лишь в отдельных гепатоцитах, их распределение имело пылевидный характер. Междольковая соединительная ткань представлялась зрелой, мезенхимально-клеточная реакция практически не определялась. Разрастание волокнистой соединительной ткани между печеночными дольками было менее выражено, чем без лечения. Это в совокупности свидетельствовало о стабилизации ЦП, отсутствии активного процесса и некоторого обратного развития, редукции соединительной ткани (рис. 4).

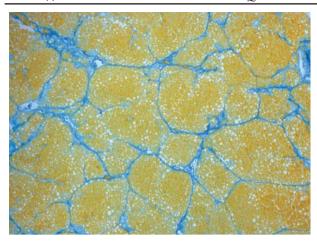
При проведении электронной микроскопии отмечено следующее. Через 7 дней после прекращения затравки ССІ<sub>4</sub> подтверждались фиброз и некроз ткани печени (рис. 5), отмечалась гиперплазия клеток Ито, большинство из которых находились в активном состоянии и претерпевали трансформацию в фибробласты. Количество фибробластов также увеличивалось. Существенно возрастала активность гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС). При этом гранулярная эндоплазматическая сеть (ГрЭС) была развита весьма слабо. Более глубокие деструктивные изменения наблюдались и со стороны митохондрий: набуха-

ние органелл, гомогенизация матрикса, редукция, лизис и дезориентация крист, что приводило к полной потере структурности органелл. Параллельно регистрировалось появление в цитоплазме гепатоцитов миелиноподобных структур. Последнее тесно связано с активацией перекисного окисления липидов мембран, в том числе мембран митохондрий, которое приводит к их разрушению и высвобождению из них фосфолипидов, способствующих образованию подобных структур [21]. Со стороны микроциркуляторного русла отмечалось увеличение числа зрелых макрофагов с высокой фагоцитарной активностью.

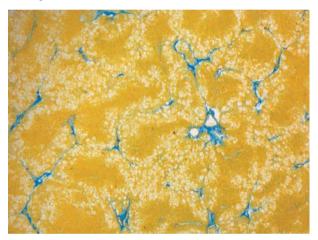
Через 7 дней после окончания затравки на фоне проведения ФДТ у крыс с ЦП степень выраженности альтеративных изменений гепатоцитов значительно уменьшилась. Реже наблюдались фиброзные изменения в дольках печени. При этом клетки Ито отличались различным содержанием липидных включений: одни клетки находились в активном состоянии, другие в пассивном. Характерно, что в гепатоцитах печени значительно увеличивалась активность ГрЭС. Это обстоятельство свидетельствует об активном биосинтезе белка на экспорт и особенно для внутриклеточных нужд (внутриклеточная регенерация). В этой связи в цитоплазме гепатоцитов выявлялось обилие белковых включений. Митохондрии характеризовались преимущественно овальной формой и матриксом умеренной электронной плотности, что соответствует оптимально энергетическому и биосинтетическому состоянию органелл. В целом состояние ядерного и митохондриального аппаратов, активность ГрЭС свидетельствуют об активных биосинтетических процессах в печени.

Через 30 дней после прекращения затравки CCl<sub>4</sub> у крыс с ЦП поражение большей части печеночной ткани было сильно выражено. Во многих участках дольки был выражен фиброз, преимущественно в виде плотных пучков коллагеновых волокон. Митохондрии отличались полиморфизмом, завуалированными кристами. В части гепатоцитов регистрировался локальный цитолиз. Выявлялись немногочисленные гепатоциты со структурными признаками, свойственными нормальной печени. Последнее указывает на репаративные процессы в печени.

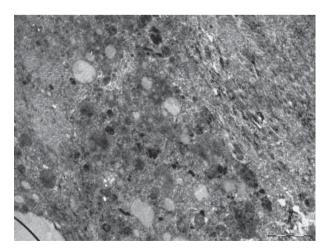
Через 30 дней после окончания затравки на фоне проведения ФДТ у крыс с ЦП регистрировались немногочисленные клетки Ито, преимущественно с обильным содержанием липидных включений (пассивное состояние) (рис. 6). Данные клетки считают одними из основных в патогенезе ЦП. В активном состоянии они секретируют биологически активные вещества, что вызывает распад межклеточного матрикса, активацию синтеза коллагена, изменение синусоидов,



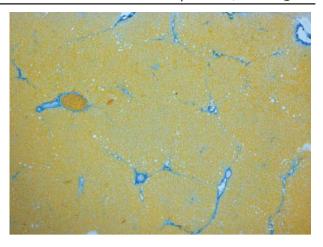
**Рис. 1.** Цифровое микрофото. Волокнистая соединительная ткань печени крысы с индуцированным циррозом через 7 дней после окончания затравки. Значительное разрастание соединительной ткани, характерное для микронодулярного ЦП. Окраска по Малори.  $\times 20$ .



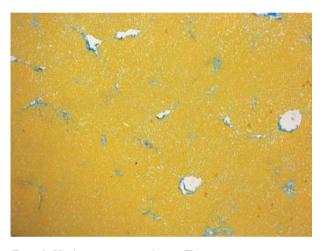
**Рис. 3.** Цифровое микрофото. Печень крысы с индуцированным циррозом через 30 дней после окончания затравки: сохраняются очаговая дистрофия гепатоцитов и разрастание волокнистой соединительной ткани, характерное для ЦП. Окраска по Малори.  $\times 20$ 



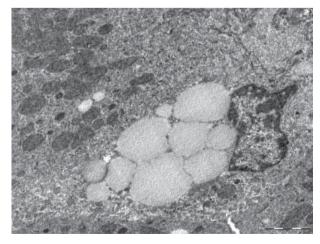
**Рис. 5.** Электронное микрофото. Печень крысы с индуцированным циррозом через 7 дней после окончания затравки. Фиброз и некроз в дольке печени.  $\times 10000$ .



**Рис. 2.** Цифровое микрофото. Волокнистая соединительная ткань печени крысы с индуцированным циррозом через 7 дней после окончания затравки на фоне применения  $\Phi$ ДТ: разрастание соединительной ткани менее выражено. Окраска по Малори.  $\times 20$ 



**Рис. 4.** Цифровое микрофото. Печень крысы с индуцированным циррозом через 30 дней после окончания затравки на фоне применения  $\Phi$ ДТ: исчезает перицентральная дистрофия, уменьшается количество междольковой соединительной ткани. Окраска по Малори.  $\times 20$ 



**Рис. 6.** Электронное микрофото. Печень крысы с индуцированным циррозом через 30 дней после окончания затравки на фоне применения  $\Phi$ ДТ. Клетка Ито с обильным содержанием липидных включений (пассивное состояние).  $\times 10000$ .

**Габлица 1**. Показатели биохимического анализа крови v животных на фоне ШП при применении ФЛТ. Ме (25%: 75%)

П			Группа животных	ИВОТНЫХ		
Показатель	1	2	3	4	5	9
Альбумин, г/л	41 (39; 46)	35 (32; 36)*	35 (34; 36)*	36 (35; 39)*	34 (32; 36)*	34 (32; 35)*
Общий билирубин, мкмоль/л	12,8 (10,4; 15,5)	44,9 (40,4; 47,4)*	33,2 (26,4; 37,2)*x	20,2 (14,8; 22,3) <sup>x+</sup>	27,7 (14,2; 41)**	12,8 (9,8; 14,2) <sup>x+</sup>
АсАТ, Ед/л	196 (191; 200)	245 (194; 285)	187 (175; 251)	207 (187; 216)	190 (155; 234)	169 (152; 178)*x
АлАТ, Ед/л	75 (69; 83)	164 (126; 192)*	74 (70; 80)×	70 (50; 74) <sup>x</sup>	151 (124; 158)*	$51 (40; 59)^{*x+}$
Коэффициент де Ритиса	0,39 (0,35; 0,43)	0,65(0,53;0,82)*	$0,38 (0,31;0,42)^{\times}$	$0,3 (0,26;0,4)^{\times}$	0,68 (0,61; 1,03)*	$0,34 (0,23; 0,4)^{x+}$
$\Pi \Phi$ , $E_{\rm L}/\pi$	200 (165; 218)	438 (375; 468)*	310 (212; 320)*×	$213 (162; 270)^{x+}$	633 (573; 750)*×	$144 (98; 154)^{*x+}$
ЛДГ, Ед/л	1498 (1067; 1648)	2618 (2405; 2700)*	2167 (2122; 2465)*	2268 (2232; 2474)*	2072 (1909; 2387)*	668 (149; 1593)x+
ГГТП, Ед/л	20 (19; 24)	30 (27; 32)*	42 (29; 46)*	$16(14;21)^{x+}$	40 (26; 43)*	$14 (12; 15)^{*x+}$

 $\mathit{Примечаниe.}^*$  — различия с группой 1 (интактные крысы) статистически значимы (p < 0,05); " — различия с группой 2 (ЦП) статистически значимы (p < 0,05); " различия с группой без лечения статистически значимы (p < 0,05] нарушение межклеточного обмена и формирование портальной гипертензии. Находясь в инактивированном состоянии, клетки Ито накапливают липиды, витамин A [22], что в данном случае может указывать на положительное влияние ФДТ.

ГрЭС хорошо развита, на мембранах ее содержалось большое количество связанных рибосом. Этот процесс был менее выражен, чем у животных через 7 дней после лечения. Данное обстоятельство может указывать на снижение интенсивности процесса биосинтеза белка в связи с меньшей степенью поражения печеночной ткани. ГлЭС была также хорошо развита, примерно в одинаковой степени с ГрЭС, что свидетельствует об активности функции детоксикации в гепатоцитах и других функций, связанных с ГлЭС (метаболизм липидов, гликогена, стероидов). В большинстве гепатоцитов регистрировалось умеренное количество митохондрий, отличавшихся овальной формой и матриксом умеренной электронной плотности. В части гепатоцитов наблюдались органеллы, которые отличались полиморфизмом и были гипертрофированы, что указывает на увеличение их функциональной активности. Состояние ядерного и митохондриального аппаратов, активность ГрЭС свидетельствуют об умеренно активных биосинтетических процессах в печени. В печени животных наблюдалась гиперплазия макрофагов с признаками высокой фагоцитарной активности. Это, вероятно, связано с активацией защитных систем клеток.

Изменения биохимических показателей крови животных приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, у крыс с ЦП, которые выводились из эксперимента через 7 дней после окончания затравки (группа 3), сохранялись те же изменения, что и непосредственно после окончания затравки: уровень билирубина был больше в 2,59 раза, активность ЛДГ — в 1,45 раза, ЩФ — в 1,55 раза, ГГТП — в 2,1 раза, уровень альбуминов — в 1,17 раза меньше, чем у интактных животных. В то же время следует отметить снижение активности АлАТ (на 54,9%) и коэффициента де Ритиса (на 41,5%) по сравнению с группой с ЦП, что может свидетельствовать о снижении синдрома цитолиза после отмены ксенобиотика.

В то же время в группе 4 (животные с ЦП, которым применялась разработанная методика ФДТ, выведенные из эксперимента через 7 дней после окончания затравки) повышенной оставалась лишь активность ЛДГ (в 1,51 раза по сравнению с интактными крысами) и был сниженным уровень альбумина (в 1,14 раза). Значения других показателей статистически значимо не отличались от таковых у интактных животных. При этом значение общего билирубина было ниже в 1,64 раза, активности ЩФ — в 1,46 раза, ГГТП —

**Таблица 2.** Интегральные показатели аминокислотного спектра у животных с ЦП через 7 дней после окончания затравки на фоне применения  $\Phi$ ДТ

Показатель, нмоль/л	Группа 1 (интактные крысы)	Группа 2 (ЦП)	Группа 3 (ЦП, через 7 дней после окончания затравки)	Группа 4 (ЦП + ФДТ, через 7 дней после окончания затравки)
Сумма АК	6494 (3800; 8087)	11062 (9920; 11698)*	8812 (8098; 9305)*x	6860 (5574; 6993) <sup>x+</sup>
Протеиногенные АК	5028 (2823; 5586)	7923 (7590; 8631)*	6712 (6074; 6757)*x	4933 (4032; 5219) <sup>x+</sup>
Производные АК	1466 (977; 2079)	2610 (2362; 2921)*	1979 (1932; 2594)	1641 (1543; 1987) <sup>x</sup>
Заменимые АК	2873 (1684; 3069)	4907 (4534; 5015)*	3595 (3274; 3978)*x	2809 (2300; 2924) <sup>x+</sup>
Незаменимые АК	2155 (1024; 2517)	3275 (3056; 3722)*	2797 (2563; 3068)*	2056 (1732; 2432) <sup>x+</sup>
АРУЦ	659,2 (369,3; 771,8)	960,8 (858,7; 1062)*	849,7 (786,6; 1101)*	672,7 (484,5; 816,7) <sup>x</sup>
AAK	305,5 (158,9; 311,6)	517,9 (500,1; 556,6)*	427,5 (358,9; 447,6)*x	285,2 (251,9; 333,9)x+
АРУЦ/ААК	2,47 (2,33; 2,49)	1,88 (1,71; 2,2)*	2,17 (2,08; 2,36)*	2,35 (1,96; 2,36)

Примечание. \* — различия с группой 1 (интактные крысы) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой 2 (ЦП) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой без лечения статистически значимы (p < 0.05).

в 2,65 раза по сравнению с группой животных с ЦП через 7 дней после окончания затравки без применения ФДТ. Все это свидетельствует о положительном влиянии предложенной методики на функциональное состояние гепатоцитов при ЦП уже через 7 дней после лечения.

У крыс с ЦП через 30 дней после окончания затравки, несмотря на отсутствие токсического влияния ССІ<sub>4</sub>, некоторые биохимические показатели крови свидетельствовали об ухудшении функционального состояния печени. Повышенными в сравнении с показателями в группе интактных животных были уровень общего билирубина — в 2,16 раза, активность АлАТ — в 2,01 раза (коэффициент де Ритиса — в 1,74 раза), ЛДГ — в 1,38 раза, ГГТП — в 2 раза, а активность ЩФ — в 3,16 раза. Оставался сниженным уровень альбумина — в 1,2 раза. Таким образом, следует отметить, что биохимические изменения сохраняются через месяц после окончания индукции ЦП.

У животных с ЦП, которым применялась разработанная методика ФДТ и которые были выведены из эксперимента через 30 дней после окончания затравки, отмечена нормализация показателей (исключение составлял лишь уровень альбуминов — он сохранялся сниженным в 1,2 раза), значения активности АсАТ, АлАТ, ЩФ и ГГТП были даже меньше показателей в группе интактных животных. Данные показатели были статистически значимо меньше, чем у животных с ЦП без лечения в те же сроки: общий билирубин — в 2,16 раза, активность АлАТ — в 2,96 раза, коэффициент де Ритиса — в 2 раза, активности ЩФ — в 4,4 раза, ЛДГ — в 3,1 раза, ГГТП — в 2,86 раза.

Вышеописанные изменения свидетельствуют об оптимизирующем воздействии разработанного метода ФДТ на биохимические показатели крови. Это указывает на улучшение функционального состояния гепатоцитов при ЦП под влиянием предложенной методики. Положи-

тельные сдвиги отмечены уже через 7 дней, а наибольшая эффективность выявлялась через месяц после окончания воздействия.

При анализе аминокислотного спектра крови у экспериментальных животных получены следующие данные. Через неделю после прекращения введения  ${\rm CCl_4}$  происходили изменения аминокислотного пула плазмы крови экспериментальных животных (табл. 2).

В группе животных с ЦП, не получавших лечения, через 7 дней после окончания затравки отмечалось некоторое улучшение показателей в сравнении со значениями у крыс с ЦП непосредственно после окончания затравки: снижалось суммарное содержание АК (на 20%), преимущественно за счет протеиногенных (на 15%). Несколько уменьшалось также количество ароматических АК (ААК) – на 17%. Однако данные показатели все же были выше, чем в группе интактных животных (в 1,36; 1,33 и 1,4 раза соответственно). Более высоким (в 1,14 раза) в сравнении с интактными животными было соотношение АРУЦ/ААК (АРУЦ – аминокислоты с разветвленной углеводородной цепью), свидетельствующее о нарушении функционального состояния печени.

Высокие уровни суммы АК, как заменимых, так и незаменимых, АРУЦ явились следствием не только нарушенной функции печени в результате 6-месячного введения ССL<sub>4</sub>, но и тяжелой катаболической перестройки метаболизма, в результате чего происходили интенсификация протеолиза и высвобождение значительного количества свободных АК, которые пополняли и увеличивали пул АК в плазме крови. Эти АК, особенно АРУЦ, использовались в качестве источников энергии, поскольку известно, что при интенсивном катаболизме они могут обеспечивать до 40% энергетических затрат.

На фоне применения ФДТ выявлялась нормализация описанных ранее изменений интеграль-

**Таблица 3.** Интегральные показатели аминокислотного спектра у животных с ЦП через 30 дней после окончания затравки на фоне применения  $\Phi$ ДТ

Показатель, нмоль/л	Группа 2 (ЦП)	Группа 5 (ЦП, через 30 дней после окончания затравки)	Группа 6 (ЦП + ФДТ, через 30 дней после окончания затравки)
Сумма АК	11062 (9920; 11698)*	8877 (6389; 9748) <sup>x</sup>	6217 (4388; 6884) <sup>x+</sup>
Протеиногенные АК	7923 (7590; 8631)*	6720 (4891; 7658) <sup>x</sup>	4708 (3390; 4866) <sup>x+</sup>
Производные АК	2610 (2362; 2921)*	2008 (1773; 2357) <sup>x</sup>	1510 (1208; 2006) <sup>x</sup>
Заменимые АК	4907 (4534; 5015)*	4042 (2749; 4441) <sup>x</sup>	2641 (2168; 2743) <sup>x+</sup>
Незаменимые АК	3275 (3056; 3722)*	2677 (2144; 3218) <sup>x</sup>	1921 (1420; 2123) <sup>x</sup>
АРУЦ	960,8 (858,7; 1062)*	885,5 (703,6; 1055)	580,8 (480,1; 719) <sup>x</sup>
AAK	517,9 (500,1; 556,6)*	432,6 (370,3; 467,6)*	251,1 (185,1; 302,7) <sup>x+</sup>
АРУЦ/ААК	1,88 (1,71; 2,2)*	1,91 (1,83; 2,27)*	2,37 (2,27; 2,8) <sup>x+</sup>

Примечание. \* — различия с группой 1 (интактные крысы) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой 2 (ЦП) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой без лечения статистически значимы (p < 0.05).

**Таблица 4.** Содержание АК в плазме крови экспериментальных животных с ЦП через 30 дней после окончания затравки на фоне применения ФДТ, нмоль/мл

Показатель, нмоль/л	Группа 1 (интактные крысы)	Группа 2 (ЦП)	Группа 5 (ЦП, через 30 дней после окончания затравки)	Группа 6 (ЦП + ФДТ, через 30 дней после окончания затравки)
Оксипролин	10,5 (9,4; 15,9)	31 (29,8; 36,4)*	24,1 (21,2; 27,1)*x	14,8 (10,5; 16,4) <sup>x+</sup>
Пролин	118,9 (69,9; 188,4)	253,6 (221,8; 303,8)*	201,8 (123,6; 245,3)	113,8 (103,3; 164,6) <sup>x+</sup>

Примечание. \* — различия с группой 1 (интактные крысы) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой 2 (ЦП) статистически значимы (p < 0.05); \* — различия с группой без лечения статистически значимы (p < 0.05).

ных показателей аминокислотного пула. Общее количество АК снизилось на 38%, протеиногенных — на 38%, производных — на 37%, заменимых аминокислот — на 43%, незаменимых — на 37%, АРУЦ — на 30%, ААК — на 45% в сравнении с группой с ЦП непосредственно после окончания затравки. При этом значения ряда данных показателей были статистически значимо ниже, чем в группе с ЦП через 7 дней после окончания затравки без лечения (p < 0.05). Это может указывать на активацию синтетических процессов в ткани печени и снижение катаболизма белков под воздействием проведенного сеанса ФДТ [23, 24].

Наиболее выраженные изменения в содержании АК в плазме крови отмечены через месяц после отмены введения ксенобиотика (табл. 3).

Как видно из табл. 3, основные показатели, повышенные у крыс с ЦП, в обеих группах через 30 дней после окончания затравки снижались. При этом в группе животных с ЦП через 30 дней после окончания затравки на фоне применения ФДТ это снижение было более выражено, в результате чего значения изучаемых показателей были статистически значимо ниже, чем в группе без применения ФДТ: суммарное содержание АК — в 1,43 раза, содержание протеиногенных АК — в 1,43 раза, заменимых — в 1,53 раза (p < 0.05). Особое внимание следует обратить на отсутствие динамики в содержании ААК у живот-

ных, не получавших ФДТ, в результате чего и коэффициент АРУЦ/ААК статистически значимо не отличался от группы животных с ЦП непосредственно после окончания затравки. Это свидетельствует о сохраняющемся нарушении функционального состояния гепатоцитов, несмотря на прекращение введения ССІ<sub>4</sub>. В группе животных с ЦП через 30 дней после окончания затравки на фоне применения ФДТ отмечалось снижение суммарного содержания ААК на 51,5% (p < 0.05), увеличение индекса АРУЦ/ААК на 26,1% (p < 0.05), при этом суммарная концентрация ААК была статистически значимо ниже, чем в группе без лечения на те же сроки, а индекс АРУЦ/ААК — выше (в 1,72 и 1,24 раза соответственно; p < 0.05). Таким образом, применение ФДТ способствует нормализации белковосинтетической функции печени, оказывает положительное влияние на функциональное состояние ее клеток.

Индикаторные для состояния соединительной ткани AK — пролин и оксипролин (табл. 4) при применении предлагаемого способа лечения снижались на 55 и 52% (p < 0,05) соответственно по сравнению с показателями у животных с ЦП (группа 2). Они были статистически значимо ниже, чем в группе крыс с ЦП через 30 дней после окончания затравки (группа 5), в 1,77 и 1,63 раза соответственно, что подтверждает стабилизирующее влияние  $\Phi$ ДТ на течение метабо-

лических процессов в соединительной ткани при ЦП [25, 26].

#### Заключение

На фоне использования ФДТ характерные для ЦП значительные разрастания соединительной ткани были менее выражены, а в ряде наблюдений отсутствовали. Разработанный метод приводил к значительному уменьшению степени выраженности альтеративных изменений гепатоцитов. У всех животных липидная инфильтрация гепатоцитов была резко снижена и соответствовала <1,0 по Hornboll. Ультраструктурное состояние цитоплазматических органелл свидетельствовало об активном биосинтезе белка. Важно отметить, что клетки Ито находились преимущественно в пассивном состоянии, что свидетельствует о положительном влиянии на течение процессов коллагенообразования.

Под влиянием ФДТ отмечалась оптимизация биохимических показателей крови, что свидетельствует об улучшении функционального состояния гепатоцитов. Выявлялась нормализация интегральных показателей аминокислотного пула, что может указывать на положительное влияние метода на течение метаболических процессов. При этом динамика содержания пролина и оксипролина подтверждает оптимизирующее влияние ФДТ на течение метаболических процессов в соединительной ткани при ЦП.

Положительное влияние метода на процессы регенерации и функционирования печени связываем с улучшением ангиоархитектоники паренхимы вследствие редукции фиброза, вызванного снижением активности клеток Ито. Незавершенность регенераторных процессов при ЦП во многом обусловлена избыточной продукцией соединительной ткани.

Проведенное экспериментальное исследование указывает на целесообразность исследования перспектив применения ФДТ в клинических условиях у пациентов с ЦП.

#### Список литературы / References

- 1. Kumar M., Sarin S.K. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J. Pediatr.* 2007; 74 (4): 393–399. PMID: 17476087.
- Miao C.G., Yang Y.Y., He X., Huang C., Huang Y., Zhang L., Lv X.W., Jin Y., Li J. Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie*. 2013; 95 (12): 2326–2335. doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.003. PMID: 24036368.
- 3. Elpek G.O. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20 (23): 7260–7276. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7260. PMID: 24966597.
- Lv T., Huang Z.F., Wang H.W., Lin J.Q., Chen G.N., Chen X.W., Chen R., Huang Z., Wang X.L. Evaluation of collagen alteration after topical photodynamic therapy (PDT) using second harmonic generation (SHG) microscopy – in vivo study in a mouse model. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2012; 9 (2): 164– 169. doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.12.006. PMID: 22594987.

- Nie Z. Is photodynamic therapy a solution for keloid? G. Ital. Dermatol. Venereol. 2011; 146 (6): 463–472. PMID: 22095178.
- 6. Cai H., Gu Y., Sun Q., Zeng J., Li S.L. Effect of photodynamic therapy on the proliferation and cell distribution of hypertrophic scar fibroblast. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2010; 26 (3): 212–215. PMID: 20737952.
- Zhong J.B., Cen Y., Liu Q. Study on the inhibitory effect of ALA-PDT on the proliferation of fibroblasts from keloid. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2010; 41 (2): 222–225. PMID: 20506639.
- Sebastian A., Allan E., Allan D., Colthurst J., Bayat A. Addition of novel degenerate electrical waveform stimulation with photodynamic therapy significantly enhances its cytotoxic effect in keloid fibroblasts: first report of a potential combination therapy. *J. Dermatol Sci.* 2011; 64 (3): 174–184. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.08.012. PMID: 22015050.
- Kasuya K., Shimazu M., Suzuki M., Kuroiwa Y., Usuda J., Itoi T., Tsuchida A., Aoki T. Novel photodynamic therapy against biliary tract carcinoma using mono-L: -aspartyl chlorine e6: basic evaluation for its feasibility and efficacy. *J. Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2010; 17 (3): 313–321. doi: 10.1007/s00534-009-0246-8. PMID: 20464561.
- Xu B., Broome U., Uzunel M., Nava S., Ge X., Kumagai-Braesch M., Hultenby K., Christensson B., Ericzon B.G., Holgersson J., Sumitran-Holgersson S. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am. J. Pathol.* 2003; 163 (4): 1275–1289. PMID: 14507637.
- Chijiiwa K., Nakano K., Kameoka N., Nagai E., Tanaka M. Proliferating cell nuclear antigen, plasma fibronecting and liver regeneration rate after seventy percent hepatectomy in normal and cirrhotic rat. *Surgery*. 1994; 116 (3): 544–549. PMID: 7915857.
- Kisseleva T., Brenner D.A. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; 21 (Suppl. 3): S84–87. PMID: 16958681.
- 13. Svegliati-Baroni G., De Minicis S., Marzioni M. Hepatic fibrogenesis in response to chronic liver injury: novel insights on the role of cell-to-cell interaction and transition. *Liver Int.* 2008; 28 (8): 1052–1064. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01825.x. PMID: 18783548.
- 14. Thompson A.J., Patel K. Antifibrotic therapies: will we ever get there? *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2010; 12 (1): 23–29. doi: 10.1007/s11894-009-0080-9. PMID: 20425481.
- 15. Henderson N.C., Forbes S.J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. *Toxicology*. 2008; 254 (3): 130–135. doi: 10.1016/j.tox.2008.08.017. PMID: 18824072.
- 16. Rockey D.C. Translating an understanding of the pathogenesis of hepatic fibrosis to novel therapies. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 11 (3): 224–231. doi: 10.1016/j.cgh.2013.01.005. PMID: 23305825.
- 17. Могилевец Э.В., Гарелик П.В., Батвинков Н.И. Методы стимуляции регенерации при циррозе печени. Новости хирургии. 2013; 21 (3): 103–109.

  Mogilevets E.V., Garelik P.V., Batvinkov N.I. Methods of liver regeneration stimulation in liver cirrhosis. *Novosti hirurgii*. 2013; 21 (3): 103–109. (In Russian)
- 18. Лукашик С.П., Цыркунов В.М., Андреев В.П., Кравчук Р.И., Абакарова В.А. Патогенетическая роль звездчатых клеток Ито и клеточных коопераций в формировании фиброза при хроническом гепатите С. Инфекционные болезни. 2010; 8 (2): 7–12.

- Lukashik S.P., Tsyrkunov V.M., Andreev V.P., Kravchuk R.I., Abakarova V.A. Pathogenetic role of Ito stellate cells and cells cooperation in the formation of fibrosis in chronic hepatitis C. *Infekcionnye bolezni.* 2010; 8 (2): 7–12. (In Russian)
- 19. Watson M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cyt.* 1958; 4 (4): 475–478. PMID: 13563554.
- 20. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 1963; 17: 208–212. PMID: 13986422.
- 21. Авцын А.П., Шахламов В.А. Ультраструктурные основы патологии клетки. М.: Медицина, 1979. 320 с. Avtsyn A.P., Shakhlamov V.A. *Ul'trastrukturnye osnovy patologii kletki* [Ultrastructural foundations of cells pathology]. Moscow: Medicina, 1979. 320 р. (In Russian)
- 22. Яковенко А.В. Цирроз печени: вопросы терапии. Consilium medicum. 2006; 2 (7): 8–13.

- Yakovenko A.V. Liver cirrhosis: questions of therapy. *Consilium medicum*. 2006; 2 (7): 8–13. (In Russian)
- 23. Charlton M.R. Protein metabolism and liver disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 10 (4): 617–635. PMID: 9022955.
- 24. Lubec C. Amino Acids (Chemistry, Biology, Medicine). N.Y.: Escom, 1990. 1196 p.
- Кадурина Т.И. Наследственные коллагенопатии. Клиника, диагностика, лечение, диспансеризация. СПб.: Невский диалект, 2000. 270 с.
  - Kadurina T.I. *Nasledstvennye kollagenopatii. Klinika, diagnostika, lechenie, dispanserizacija* [Hereditary collagenoses. The clinic, diagnosis, treatment, prophylactic medical examination]. St. Petersburg: Nevsky dialect, 2000. 270 p. (In Russian)
- 26. Bolarin D.M., Azinge E.C. Biochemical markers, extracellular components in liver fibrosis and cirrhosis. *Nig. Q. J. Hosp. Med.* 2007; 17 (1): 42–52. PMID: 17688172.

Статья поступила в редакцию журнала 29.01.2015. Received 29 January 2015.