

На правах рукописи

Клочин Виталий Дмитриевич

**СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОЦЕССЫ ФИБРОЗИРОВАНИЯ
ПЕЧЕНИ С ТОКСИЧЕСКИМИ ГЕПАТОЗАМИ И ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ
И ПРИ КОРРЕКЦИИ ОКИСЛЕННЫМ ДЕКСТРАНОМ В
ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

1.5.22. Клеточная биология

3.3.2. Патологическая анатомия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

г. Новосибирск – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Новосибирск)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
академик РАН

Шкурूपий Вячеслав Алексеевич

кандидат медицинских наук, доцент

Карпов Михаил Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор **Морозов Виталий Валерьевич**
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория технологий управления здоровьем, заведующий, г. Новосибирск)

доктор медицинских наук, доцент

Пурлик Игорь Леонидович

(Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической анатомии, профессор, г. Томск)

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А. П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2023 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.046.05, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 222-68-35; <http://ngmu.ru/dissertation/539>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. По данным ВОЗ, около 2 миллиардов людей по всему миру употребляют спиртные напитки в разных дозировках, при этом около 76 миллионов страдают заболеваниями, связанными с их потреблением (Global status report on alcohol, 2004; Халимова Ю. С., 2022). Помимо потребления алкоголя в современном мире все люди в той или иной степени подвержены воздействию промышленных токсинов. Постоянное воздействие большого количества различных промышленных токсинов в сочетании с высоким уровнем потребления алкогольной продукции приводит к увеличению частоты острых и хронических токсических поражений печени (Альтшулер В. Б., 2010). Смертность от заболеваний печени достигает 59 % и ежегодно растет (Воропаева А. Е., 2022). Длительные, повторяющиеся воздействия ксенобиотиков в 20 % случаев приводят к хроническому течению патологических процессов в печени, разрастанию соединительной ткани и формированию цирроза печени (Азжаргал Б., Батбаатар Г., Бира Н., 2013). По данным литературы, до 70 % заболеваний приходится на хронические заболевания печени (Токтогулова Н. А., 2022). Хронические заболевания печени встречаются во всем мире независимо от возраста, пола, региона или расы. Цирроз является исходом различных заболеваний печени, которые характеризуются фиброзом и структурной перестройкой печени с образованием «ложных долек» (Sarin S. K. et al., 2017; Саранская Я. Е., 2022). По данным ВОЗ, цирроз печени (ЦП) как причина смерти в России с 2002 по 2020 г. занимает 10-е место, в мире – 6-е место (Билалова А. Р. и др., 2015). В России ежегодная смертность от алкогольной болезни, включая алкогольный цирроз печени, составила 16,3 %, что в 3,5 раза выше, чем в США и других экономически развитых странах (Винницкая Е. В., Киселева А. В., 2014). Частота цирроза печени алкогольной этиологии, по результатам аутопсии за 2010–2013 гг., в 2 раза выше, чем ЦП другой этиологии. По данным, представленным в работе Е. Н. Травенко и др. (2020), в Краснодарском крае в период с 2014 по 2018 год заболевания печени, включая ЦП, среди болезней желудочно-кишечного тракта составляли 50 %. При этом с каждым годом смертность от заболеваний печени растет (Большакова Н. О., 2022). Так, в период с 2015 по 2018 год смертность от заболевания «цирроз печени» увеличивалась в России и составляла в 2015 году – 67,12 %, в 2016 году – 74,59 %, в 2017 году – 89,58 %, в 2018 году – 85,12 % от общего числа заболеваний печени. Цирроз алкогольной этиологии входит в тройку ведущих причин болезней печени, занимая с 2017 года второе место (Травенко Е. Н., Породенко В. А., Носкова У. А. и др., 2020). По данным ВОЗ, частота цирроза печени в США

составляет 3,5 %, в Италии – 9,5 %. В Беларуси показатель смертности от цирроза печени за 10 лет вырос с 7,4 до 22,2 на 100 тысяч населения (Зубрицкий М. Г., Недзьведь М. К., 2010). Причиной фиброза печени может стать любое заболевание этого органа (Шкурупий В. А., Ким Л. Б., Ковнер А. В. и др. 2017). Фиброз печени (ФП) долгое время считался необратимым, но есть работы, которые опровергают это (Буко В., Лукивская О., Белоновская Е., 2013). Однако в настоящее время эффективные методы профилактики и лечения цирроза печени отсутствует (Шкурупий В. А., Ким Л. Б., Ковнер А. В. и др. 2017; Muir A. J., 2015).

Степень разработанности темы диссертации. Анализ большого числа публикаций, посвященных проблемам профилактики, лечения фиброза и цирроза печени демонстрирует невысокую эффективность используемых в настоящее время методов лечения, а механизмы данного патологического процесса мало изучены, что обуславливает необходимость дальнейших экспериментальных исследований фиброза и цирроза в печени. В предыдущих экспериментах на базах ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России на различных моделях при различных условиях было показано, что введение окисленного декстрана с профилактическими и лечебными целями демонстрирует антифибротический эффект, свидетельствуя о возможности регуляции процесса фиброобразования.

Объект исследования. Печень крыс при хроническом и остром гепатозах смешанной токсической этиологии, посттоксическом циррозе печени.

Предмет исследования. Морфологические изменения в печени при посттоксических острых, хронических гепатозах, циррозе печени алкогольной, тетрахлорметановой этиологии при введении окисленного декстрана.

Цель исследования. Исследовать структурную организацию и процессы фиброобразования в печени для оценки эффективности коррекции и профилактики окисленным декстраном посттоксических острого, хронического гепатозов и цирроза печени.

Задачи исследования

1. Исследовать морфологические особенности деструктивных изменений и репаративного процесса в паренхиме печени крыс при токсических гепатозах, циррозе печени и в условиях введения окисленного декстрана.

2. Изучить морфологические проявления фиброза печени у крыс с токсическими гепатозами и циррозом после введения окисленного декстрана.

3. Изучить структурные изменения печени в разные периоды развития токсического цирроза и частоту его осложнений у крыс в условиях коррекции окисленным декстраном.

4. Провести цитоморфометрические и корреляционные исследования структурных изменений печени при использовании окисленного декстрана в целях профилактики развития токсического острого, хронического гепатозов и цирроза печени.

Научная новизна

1. Впервые показано, что окисленный декстран, являясь лизосомотропным и медленно биodeградируемым веществом, уменьшает деструктивные изменения и стимулирует репаративные процессы в гепатоцитах при токсическом остром и хроническом гепатозах, циррозе печени.

2. Впервые показана высокая противофибротическая эффективность окисленного декстрана при токсическом остром и хроническом гепатозах, циррозе печени у крыс.

3. Впервые показано, что применение окисленного декстрана препятствует синтезу и формированию коллагеновых, ретикулярных волокон в печени у крыс при токсическом остром и хроническом гепатозах, циррозе печени.

4. Впервые показано, что введение окисленного декстрана препятствует развитию осложнений (гидроторакс, асцит, геморрагический синдром) при токсическом остром и хроническом гепатозах и циррозе печени у крыс.

5. Впервые показана слабая корреляционная связь процессов фиброобразования с процессами изменения количества, «фибробластической активности» и апоптоза фибробластов при токсическом остром и хроническом гепатозах и циррозе печени у крыс.

Теоретическая и практическая значимость исследования

1. Проведенное исследование может способствовать дальнейшей разработке лекарственного средства, препятствующего развитию фиброза, цирроза печени и их осложнений.

2. Результаты исследования механизмов развития фиброза и цирроза печени могут быть внедрены в учебный процесс в медицинских вузах в соответствующих темах.

Практическая значимость результатов диссертационной работы подтверждается заявкой на изобретение № 2021138298 (080290) «Способ временного гемостаза при лапароскопических резекциях печени и устройство для его осуществления» (дата приоритета 21.12.2021, уведомление о начале проведения экспертизы по существу от 24.05.2022).

Методология и методы диссертационного исследования. В основу методологии диссертационной работы положены принципы системного анализа полученных морфологических изменений, основанных на изучении печени крыс породы Wistar с токсическими гепатозами и циррозом печени при введении ОД и без него. Полученные в результате проведенного исследования данные были проанализированы и обработаны корректными статистическими методами. Дизайн выполненного исследования (модели эксперимента) в полной мере согласуется с принципами проведения современных работ и с полным соблюдением правил биоэтики.

Положения, выносимые на защиту

1. У крыс с токсическим острым, хроническим гепатозами и циррозом печени введение окисленного декстрана снижает деструктивные процессы и стимулирует процессы репаративной регенерации в печени.
2. У крыс с токсическим острым, хроническим гепатозами и циррозом печени введение окисленного декстрана приводит к снижению фибропластических процессов в печени, препятствует формированию ложных долек и развитию осложнений.
3. Раннее включение окисленного декстрана в схему коррекции токсического острого, хронического гепатозов у крыс является эффективной профилактикой развития цирроза печени.

Степень достоверности. Используемые в работе методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, что позволило получить репрезентативные результаты. Диссертация выполнена на достаточном по объему морфологического материала с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов морфологического исследования (световая микроскопия с использованием гистохимического и иммуногистохимического метода окраски, морфометрия) и системного анализа полученных результатов корректными статистическими методами.

Апробация работы. Основные положения работы были обсуждены на 12-й Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Авиценна-2021» (Новосибирск, 2021), на 13-й Российской (итоговой) научно-практической конференции студентов и молодых учёных «Авиценна-2022» (Новосибирск, 2022), на 5-й Международной морфологической конференции студентов и молодых ученых (Новосибирск, 2020), на 6-й Международной морфологической конференции студентов и молодых ученых (Новосибирск, 2021), на

21-й ежегодной итоговой Международной научно-практической конференции молодых учёных и студентов медицинского факультета Кыргызско-Российского Славянского университета им. первого Президента Российской Федерации Б. Н. Ельцина (Бишкек, 2022), на 6-м съезде Российского общества патологоанатомов (Москва, 2022).

Диссертационная работа апробирована на заседании государственной экзаменационной комиссии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (Новосибирск, 2022) и на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2022).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по теме: «Структурная организация и процессы фиброзирования печени с токсическими гепатозами и циррозом печени и при коррекции окисленным декстраном в эксперименте», номер государственной регистрации 1025403653538, и в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России по теме: «Изучение закономерностей развития нормальных и патологических процессов в организме при действии факторов экзо- и эндогенной природы: межклеточные и межсистемные взаимодействия при остром и хроническом воспалении, репаративной регенерации, онкогенезе, фиброзировании, дисплазии соединительной ткани; возможности диагностики, профилактики, лечения», номер государственной регистрации 121061500014-3.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из них 1 статья в журнале, входящем в международные реферативные базы данных и систем цитирования (Scopus, Web of Science).

Объем и структура диссертации Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3-х глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и списка иллюстративного материала. Список литературы представлен 332 источниками, из которых 164 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 35 таблиц и 38 рисунков.

Личный вклад автора. Автором проведено планирование и подбор модели исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающий современное состояние по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнены все этапы работы, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы результаты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель эксперимента. Эксперимент выполнен на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» и на базе ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Исследование проводили на 150 крысах-самцах породы Wistar средней массой 300 граммов. Животные были получены из вивария Центральной научно-исследовательской лаборатории Новосибирского государственного медицинского университета.

Эксперимент проводили в соответствии с приказом Министерства здравоохранения СССР № 755 от 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» и Межгосударственным стандартом «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (ГОСТ 33215-2014, 7-е переиздание, 2019 г.). Эксперимент проводили в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики и принципами гуманного обращения с лабораторными животными. Крыс содержали в хорошо проветриваемом помещении, при оптимальном температурном режиме. Животные имели свободный доступ к воде и пище.

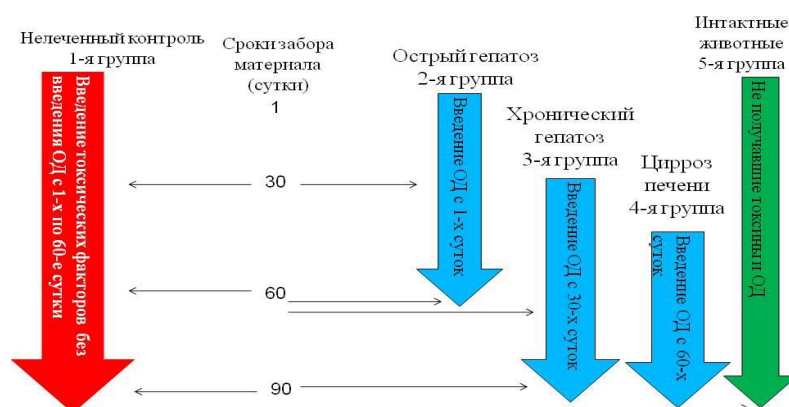
Токсический гепатоз и цирроз печени моделировали по методике, описанной А. Г. Скуратовым и др. (2011 г.), В. С. Волчековой и др. (2018 г.), В. А. Козвониной и др. (2019 г.). Вышеуказанные методы моделирования были нами модифицированы с

целью снижения числа летальных исходов у крыс в ходе постановки эксперимента, для этого изменили кратность введения и дозировки четыреххлористого углерода (CCl_4), водного раствора этилового спирта.

Токсический гепатоз с исходом в цирроз смешанной этиологии (тетрахлорметановой и алкогольной) моделировали путем интраперитонеального введения 50 % масляного раствора тетрахлорметана в соотношении 1 объём CCl_4 и 1 объём оливкового масла, с дозировкой 1 мл/кг на одну особь, кратность введения 1 раз в 4 суток. Водный 6,5 % раствор этилового спирта в объеме 40 мл на особь, расчет спиртового раствора проводился с помощью специализированного калькулятора, измерение «крепости раствора» с помощью ареометра. Кратность введения спиртового раствора 3 раза в 4 суток.

Лечение проводилось 5 % водным раствором окисленного декстрана (ОД) с молекулярной массой 40 кДа, в котором присутствует до 10 % свободных альдегидных связей. Раствор окисленного декстрана по условиям эксперимента вводился в брюшную полость в дозировке 2 мл на одну особь, кратность введения 1 раз в 4 суток. Раствор ОД с целью уменьшения смертности среди животных не вводили в дни введения 50 % масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl_4) и в день введения 6,5 % водного раствора этилового спирта.

Крысы были разделены на 5 групп, в каждой группе по 10 особей на каждый период эксперимента: нами было выделено 3 временных периода эксперимента, острый гепатоз с 1-х до 30-х суток, хронический гепатоз с 30-х до 60-х суток, цирроз печени с 60-х до 90-х суток. Схема проведения эксперимента дана на рисунке 1.



Примечание – Черными стрелками указаны сроки забора экспериментального материала.

Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента

1-я группа (30 крыс, нелеченные животные, получавшие токсические факторы в течение 90 суток, но не получавшие ОД): крысам породы Wistar в 1-е сутки в брюшную полость был введен 50 % масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4). На 3-и, 4-е сутки энтерально вводили 6,5 % водно-спиртовой раствор через поилку. Цикл введения четыреххлористого углерода (CCl_4) и водного раствора этилового спирта повторяли до 60 суток, когда формировался цирроз печени с типичными проявлениями в виде ложных долек. С 61-х по 91-е сутки эксперимента токсические факторы не вводили. Животных выводили из эксперимента на 31-е, 61-е, 91-е сутки (см. Рисунок 1).

2-я группа животных (20 крыс, получавших ОД с первых суток): крысам породы Wistar в 1-е сутки в брюшную полость был введен 50 % масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4). На 2-е сутки интраперитонеально вводили 5 % водный раствор окисленного декстрана. На 3-и и 4-е сутки энтерально вводили 6,5 % водный раствор этилового спирта через поилку. Цикл и последовательность введения ранее упомянутых растворов повторяли до 60-х суток. Животных выводили из эксперимента на 31-е, 61-е сутки (см. Рисунок 1).

3-я группа (20 крыс, получавших ОД с 30-х суток): крысам породы Wistar в 1-е сутки в брюшную полость был введен 50 % масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4). На 3-и и 4-е сутки энтерально вводили 6,5 % водный раствор этилового спирта через поилку. Цикл и последовательность введения четыреххлористого углерода (CCl_4) и водного раствора этилового спирта повторялись до 30-х суток. Начиная с 30-х суток после очередного введения 50 % масляного раствора CCl_4 , на следующий день в брюшную полость вводили 5 % водный раствор ОД, после чего начинали энтерально вводить 6,5 % водный раствор этилового спирта. Данный цикл повторялся с 30-х по 60-е сутки. На 60-е сутки токсический фактор отменяли, далее крысам вводили только 5 % водный раствор ОД через каждые 4 суток. Забор материала производили на 61-е, 91-е сутки (см. Рисунок 1).

4-я группа (10 крыс, получавших ОД с 60-х суток): крысам породы Wistar в 1-е сутки в брюшную полость был введен 50 % масляный раствор четыреххлористого углерода (CCl_4). На 3-и, 4-е сутки энтерально вводили 6,5 % водный раствор этилового спирта через поилку. Вышеизложенный цикл и последовательность введения 50 % масляного раствора CCl_4 и 6,5 % водного раствора этилового спирта повторяли до 60-х суток. После 60-х суток в связи с формированием цирроза печени токсические факторы отменяли. Начиная интраперитонеальное введение 5 % водного раствора ОД при сформированном циррозе. Раствор ОД вводили один раз в

4 суток до 90-х суток, после чего животных выводили из эксперимента на 91-е сутки (см. Рисунок 1).

5-я группа (интактные крысы, которым не вводили токсические факторы и раствор ОД) (см. Рисунок 1).

Методика забора аутопсийного материала. Перед получением образцов печени животных вводили в состояние наркоза путём внутримышечного введения смеси растворов (50 мг тилетамина и 50 мг золазепама, разведенных в 10 мл воды для инъекций) из расчета 0,1 мл раствора на 100 г массы тела животного. После введения крыс в состояние наркоза им производили декапитацию.

Методика изготовления гистологических препаратов с использованием гистохимического метода окраски. Образцы печени фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации и заключали в парафин. Из каждого образца на микротоме марки Microm HM 355S (Thermo Scientific, США) готовили по 4-6 срезов толщиной 5–6 мкм (Автандилов Г. Г., 2004; Гурова С. В., 2020). Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином, методом импрегнации серноокислым серебром, пикрофуксином по методу Ван-Гизона.

Методика иммуногистохимического изготовления гистологических препаратов. Перед началом проведения иммуногистохимического окрашивания фрагментов печени с парафиновых блоков на ротационном микротоме изготавливали срезы толщиной 3–4 мкм. Полученные срезы депарафинизировали и производили демаскировку антигенов тканей в цитратном буфере (pH 6,0) при температуре 95 °C в течение 60 минут. Производили блокировку эндогенной пероксидазой 3 % раствором H_2O_2 . Полученные срезы инкубировали с антителами (Abcam, Великобритания) к MMP-2, MMP-9, TIMP-1, p-53. Разведение антител производили согласно рекомендациям производителя антител. Далее использовали систему детекции с пероксидазой меткой для иммуногистохимического окрашивания. После иммуногистохимического окрашивания производили окраску ядер клеток с использованием гематоксилина.

Морфометрическое исследование. Морфологическое исследование и морфометрию печени проводили с использованием светового микроскопа фирмы «AxioStar Carl Zeiss», Германия, с помощью закрытой тестовой системы из 25 точек, 16 квадратов, с тестовой площадью 1 600 мкм² при увеличении в 400 раз и площадью 2 400 мкм² при увеличении в 200 раз, в соответствии с рекомендациями, изложенными в работах, посвященных методам теоретического обоснования и их

применению в практике (Христолюбова Н. Б., 1974; Христолюбова Н. Б., 1990; Weibel E. L., 1979).

Подсчитывали численные плотности (N_{ai}) двухъядерных гепатоцитов, клеток Ито, клеток Купфера, фибробластов в перипортальных и междольковых пространствах (пространства между истинными и ложными дольками), кровеносных сосудов в междольковых и перипортальных пространствах.

При увеличении светового микроскопа в 100 раз подсчитывали количество ($4\,000\,000\text{ мкм}^2$) ложных долек, измеряли их максимальный и минимальный размер (диаметр) при помощи окуляр-микрометра (мкм), вычисляли их площадь с использованием программы TourTek TourView.

Вычисляли объемные плотности (V_v) неизмененных, некротизированных, дистрофически измененных гепатоцитов, кровеносных сосудов, сунусоидов, коллагена в междольковых и перипортальных пространствах, в толще печеночных и ложных долек.

Измерение объема жидкости в брюшной и плевральных полостях у крыс производили при помощи стандартных медицинских шприцев и выражали в миллилитрах (мл).

Измерение массы крыс и печени производилось с помощью медицинских весов (Seca 334, Россия), массу выражали в граммах (г).

Производили подсчет численных плотностей (N_{ai}) двухъядерных гепатоцитов, фибробластов в перипортальных и междольковых, внутридольковых пространствах печени, фибробластов, экспрессирующих p53, фибробластов в перипортальных и междольковых, внутридольковых пространствах печени, клеток Купфера, экспрессирующих MMP-2, MMP-9, TIMP-1, учитывали экспрессию вне зависимости от интенсивности окраски.

Статистическое исследование. Проверяли нормальность распределения ряда величин по методам Колмагорова – Смирнова, Шапиро – Уилка. Проводили корреляционный анализ морфометрических величин ряда исследованных параметров печени, при помощи коэффициента корреляции Пирсона, Спирмена. Вычисляли индекс достоверности по методу Стьюдента.

Статистическую обработку данных проводили в соответствии с принципами вариационной статистики (Лакина Г. Ф., 1980; Автандилов Г. Г., 1990, 1994, 1996). Для статистической обработки данных использовали ноутбук марки Dell inspiron n5110, с процессором Intel (R) Core (TM) i7-2630QM CPU @ 2.00GHz 2.00 GHz, ОЗУ 8Гб. с пакетом программ Microsoft office 2007. Статистические расчеты проводились с помощью программы STATISTICA 10. Вероятность достоверности различий

сравниваемых средних величин определяли при помощи критерия Стьюдента при условии нормального распределения величин исследуемых параметров. Различия между сравниваемыми средними величинами считали достоверными при $p < 0,05$. Полученные результаты представлены в виде графиков, диаграмм и таблиц, составленных с помощью программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведения эксперимента нами было обнаружено, что у нелеченых животных масса крыс была ниже на 20 % по сравнению с животными, получавшими ОД при хроническом гепатозе и циррозе печени (Таблица 1).

Таблица 1 – Масса крыс при токсических остром и хроническом гепатозах, циррозе печени, получавших окисленный декстран ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Масса крыс (грамм)	30	1-я группа	297,3 ± 10,1
		2-я группа	302,1 ± 5,7
	60	1-я группа	298,1 ± 8,0
		2-я группа	(328,2 ± 9,87)*
		3-я группа	293,4 ± 5,09
	90	1-я группа	283,4 ± 6,17
		3-я группа	(356,1 ± 9,2)*
		4-я группа	(343,6 ± 7,09)*
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величины показателя у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

Выявили, что при применении ОД отсутствуют проявления отёчного синдрома (асцита, гидроторакса), геморрагического синдрома при острых и хронических гепатозах смешанной токсической этиологии, посттоксическом циррозе печени в связи с уменьшением числа ложных долек в сравнении с таковым в печени нелеченых животных 1-й группы (Таблица 2). Так, у животных 1-й группы (нелеченые) численная плотность ложных долек увеличилась в 8 раз к 60-м суткам и не изменялась до 90-х суток (см. Таблицу 2). При этом у крыс 2-й группы (острый гепатоз), получавших ОД, с 1-х суток формирования ложных долек не происходило (см. Таблицу 2). У крыс 3-й группы (хронический гепатоз) за время введения ОД количество ложных долек уменьшилось в 2,5 раза, а при сформированном циррозе у

крыс 4-й группы – на 30 % в сравнении с величиной аналогичного показателя у крыс 1-й группы (нелеченные) к 90-м суткам эксперимента (см. Таблицу 2). Применение ОД при токсических гепатозах (остром и хроническом), очевидно, препятствует цирротической трансформации, а также профилактирует формирование ложных долек при сформированном циррозе печени.

Таблица 2 – Численная плотность (N_{ai}) и площадь ложных долек в печени у крыс породы Wistar, подвергавшихся многократному поочередному воздействию этанола, тетрахлорметана, окисленного декстрана ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
NaI ложных долек	30	1-я группа	1,4 ± 0,25
	60	1-я группа	11,7 ± 0,42
		3-я группа	(9,1 ± 0,34)*
	90	1-я группа	11,8 ± 0,31
		3-я группа	(4,8 ± 0,32)*
		4-я группа	(8,3 ± 0,30)*
Площадь ложных долек (µm ²)	30	1-я группа	17 259,6 ± 11 725,70
	60	1-я группа	72 284,9 ± 9 282,61
		3-я группа	(59 687,1 ± 5 614,35)*
	90	1-я группа	140 199,8 ± 19 300,79
		3-я группа	(159 202,07 ± 13 638,7)*
		4-я группа	(235 823,49 ± 17 701,31)*
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

У животных, получавших токсиканты, наблюдали гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии. Однако гепатоциты в состоянии вакуольной дистрофии были крупнее у животных, получавших ОД, при этом объемная плотность гепатоцитов в состоянии дистрофии была больше до 33 % во все периоды эксперимента в сравнении с животными 1-й группы (нелеченные) (Таблица 3). Такая морфологическая картина у животных, получавших ОД, по-видимому, связана с пиноцитозом большого количества ОД, обладающего лизосомотропными свойствами (Шкурупий В. А., 1989; Шкурупий В. А., Курунов Ю. Н., Яковченко Н. Н., 1999).

Таблица 3 – Объемные плотности (Vv) гепатоцитов в состояниях дистрофии и некроза, корреляционная связь объёмных плотностей (Vv) некрозов и коллагеновых волокон в печени у крыс породы Wistar, подвергавшихся многократному поочередному воздействию этанола, тетрахлорметана, окисленного декстрана ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Гепатоциты в состоянии дистрофии (%)	30	1-я группа	42,2 ± 0,41
		2-я группа	(58,3 ± 1,64)*
	60	1-я группа	42,3 ± 1,15
		2-я группа	(62,9 ± 1,37)*
		3-я группа	(60,4 ± 1,32)*
	90	1-я группа	47,4 ± 1,38
		3-я группа	(60,4 ± 1,32)*
		4-я группа	(57,9 ± 1,51)*
Гепатоциты в состоянии некроза (%)	30	1-я группа	36,9 ± 1,51
		2-я группа	(12,9 ± 1,14)*
	60	1-я группа	27,2 ± 1,31
		2-я группа	(13,7 ± 0,96)*
		3-я группа	(9,6 ± 0,65)*
	90	1-я группа	28,2 ± 1,17
		3-я группа	(7,3 ± 0,67)*
		4-я группа	(10,4 ± 1,05)*
Корреляционная связь объёмных плотностей (Vv) некрозов и коллагеновых волокон	60	1-я группа	–0,21
		2-я группа	–0,01
	90	1-я группа	0,16
		3-я группа	0,20
		4-я группа	–0,10
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

У крыс 1-й группы (нелеченые) объемная плотность некрозов гепатоцитов была от 28 % до 37 % в разные периоды эксперимента с 30-х по 90-е сутки (см. Таблицу 3). При этом объемная плотность гепатоцитов в состоянии некроза у животных, получавших с ОД, была до 3,9 раза меньше (у крыс 2-й, 3-й и 4-й групп) в сравнении с таковой у крыс, которым ОД не вводили (1-я группа) (см. Таблицу 3). При этом объемные плотности неизмененных

гепатоцитов у крыс, получавших ОД, была до 4 раз большей в сравнении с аналогичными показателями у крыс 1-й группы (нелеченые) (см. Таблицу 3).

При проведении корреляционного анализа между объемными плотностями некрозов и коллагеновых волокон было обнаружено отсутствие либо слабая отрицательная корреляционная связь между исследуемыми показателями в печени у крыс всех групп (см. Таблицу 3).

Из приведенных данных представляется очевидным, что ОД обладает выраженными гепатопротекторными свойствами. Полученные результаты, вероятно, обусловлены способностью ОД стимулировать пластические процессы в гепатоцитах и внутриклеточную репарацию ультраструктур. Это подтверждает увеличение численной плотности двухъядерных гепатоцитов у крыс, получавших ОД при хроническом гепатозе 40 %, циррозе печени 63 % в сравнении с животными 1-й группы (нелеченые) (Таблица 4).

Таблица 4 – Численные плотности (Nai) двухъядерных гепатоцитов и гепатоцитов, экспрессирующих p53, в печени у крыс породы Wistar при токсических гепатозах и циррозе печени смешанной этиологии ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Двухъядерные гепатоциты	30	1-я группа	0,5 ± 0,07
		2-я группа	0,6 ± 0,07
	60	1-я группа	0,6 ± 0,08
		2-я группа	0,4 ± 0,05
		3-я группа	(1,0 ± 0,12)*
	90	1-я группа	0,3 ± 0,06
		3-я группа	0,6 ± 0,08
		4-я группа	(0,8 ± 0,14)*
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

У крыс 1-й группы (нелеченые) объемные плотности коллагена росли к концу эксперимента с 30-х по 90-е сутки (Таблица 5). При этом объемные плотности коллагеновых волокон в перипортальных пространствах у крыс, получавших ОД, были в 2 и более раза меньшими в сравнении нелечеными животными 1-й группы.

Таблица 5 – Объемные плотности (V_v) коллагеновых волокон в печени у крыс в печени у крыс породы Wistar при токсических гепатозах и циррозе печени смешанной этиологии

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Vv коллагеновых волокон в перепортальных пространствах (%)	30	1-я группа	26,3 ± 1,25
		2-я группа	(19,1 ± 0,85)*
	60	1-я группа	56,7 ± 1,74
		2-я группа	(29,2 ± 1,20)*
		3-я группа	(30,6 ± 1,21)*
	90	1-я группа	54,4 ± 1,58
		3-я группа	(23,7 ± 0,95)*
		4-я группа	(21,0 ± 0,80)*
Vv коллагеновых волокон междольковых пространствах (%)	30	1-я группа	14,1 ± 0,64
		2-я группа	(5,9 ± 0,54)*
	60	1-я группа	22,2 ± 0,76
		2-я группа	(7,5 ± 0,47)*
		3-я группа	(12,6 ± 0,69)*
	90	1-я группа	26,5 ± 0,86
		3-я группа	(6,4 ± 0,45)*
		4-я группа	(5,0 ± 0,50)*
Vv ретикулярных волокон в перепортальных пространствах (%)	30	1-я группа	4,3 ± 0,64
		2-я группа	(13,3 ± 0,74)*
	60	1-я группа	4,3 ± 0,67
		2-я группа	3,6 ± 0,68
		3-я группа	5,6 ± 0,56
	90	1-я группа	3,8 ± 0,63
		3-я группа	2,6 ± 0,44
		4-я группа	2,3 ± 0,42
Vv ретикулярных волокон в междольковых пространствах (%)	30	1-я группа	5,2 ± 0,78
		2-я группа	(16,1 ± 0,64)*
	60	1-я группа	3,6 ± 0,62
		2-я группа	3,0 ± 0,56
		3-я группа	3,7 ± 0,63
	90	1-я группа	3,0 ± 0,55
		3-я группа	2,6 ± 0,48
		4-я группа	(1,5 ± 0,46)*
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

В междольковых пространствах у животных, получавших ОД, объемная плотность коллагена была до 5 раз меньше в сравнении с величиной аналогичного показателя у животных 1-й группы (нелеченые) в связи с большей биодоступностью ОД в междольковых пространствах печени и толще долек.

С учетом ранее полученных данных очевидно, что антифибротический эффект ОД дозозависим, поскольку более длительный прием ОД (в течение 60 суток) оказывает более выраженный противofiбротический и гепатопротективный эффект в сравнении с 30-дневным периодом введения ОД, что согласуется с данными литературы: наиболее эффективными по антифибротическому эффекту были максимальные дозы ОД, при которых выявили снижение фиброзирования органов у мышей (в 4 раза в печени и более, чем в 8 раз, в легких) (Shkurupiy V. A., 2019; Karpov M. A., Shkurupy V.A., Troitskii A. V., 2021).

При микроскопическом исследовании печени было обнаружено, что у животных в начале введения ОД объемная плотность ретикулярных волокон была большей до 3 раз в междольковых и перипортальных пространствах у крыс во всех группах, получавших ОД, уменьшаясь к 60-м и 90-м суткам в сравнении с таковой в печени животных 1-й группы (нелеченые) (см. Таблицу 5), где объемная плотность ретикулярных волокон была высокой и не изменялась на протяжении эксперимента. Полученные данные, вероятно, указывают на нарушение сборки ретикулярных волокон.

При исследовании печени обнаружили, что численная плотность (N_{ai}) фибробластов в печени у крыс, получавших ОД, была меньше до 2,5 раза в перипортальной области и до 3,5 раза в междольковой области в сравнении с таковыми показателями в печени крыс 1-й группы (нелеченые) в разные периоды эксперимента (Таблица 6).

При этом убыль фибробластов из печени при токсических остром и хроническом гепатозах была связана с их апоптозом, на что указывает экспрессия p53 в фибробластах печени крыс, получавших ОД при остром и хроническом гепатозах, циррозе печени (Таблица 7).

Однако коллаген-синтетическая активность фибробластов возрастала (см. Таблицу 6). Противofiбротическая эффективность ОД не имела связи с уменьшением количества фибробластов в связи с отсутствием корреляционной связи между объёмными плотностями коллагена и численными плотностями фибробластов (Таблица 8). Вероятно, окисленный декстран, имея в строении альдегидные группы,

может вступать в альдегид-альдегидные взаимодействия с тропоколлагеном, блокируя его дальнейшую сборку. (Shkurupiy V. A., Troickij A. V., Luzgina N. G., 2009).

Таблица 6 – Численные плотности (Nai), фибробластов и их коллаген-синтетическая активность в печени у крыс породы Wistar при токсических гепатозах и циррозе печени смешанной этиологии ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Nai фибробластов в перипортальных пространствах	30	1-я группа	18,8 ± 0,60
		2-я группа	(19,6 ± 0,56)*
	60	1-я группа	29,7 ± 0,58
		2-я группа	(12,2 ± 0,37)*
		3-я группа	(28,8 ± 0,67)*
	90	1-я группа	28,4 ± 0,77
		3-я группа	(15,4 ± 0,49)*
		4-я группа	(19,3 ± 0,45)*
Nai фибробластов в междольковых пространствах	30	1-я группа	16,0 ± 0,55
		2-я группа	(10,3 ± 0,37)*
	60	1-я группа	23,6 ± 0,52
		2-я группа	(6,9 ± 0,27)*
		3-я группа	(12,5 ± 0,39)*
	90	1-я группа	16,5 ± 0,51
		3-я группа	(6,5 ± 0,24)*
		4-я группа	(8,1 ± 0,32)*
Коллаген-синтетическая «активность» фибробластов	30	1-я группа	1,16 ± 0,05
		2-я группа	(0,83 ± 0,04)*
	60	1-я группа	1,48 ± 0,04
		2-я группа	(1,92 ± 0,08)*
		3-я группа	(1,04 ± 0,04)*
	90	1-я группа	1,80 ± 0,05
		3-я группа	(1,37 ± 0,06)*
		4-я группа	(0,95 ± 0,04)*
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

Таблица 7 – Численные плотности (Nai) фибробластов, экспрессирующих p53, в печени у крыс породы Wistar, при токсических гепатозах и циррозе печени смешанной этиологии ($M \pm m$)

Исследуемый показатель	Период после начала токсического воздействия (сутки)	Исследуемые группы	Величины исследуемых показателей
Nai фибробластов, экспрессирующих p53	60	1-я группа	4,0 ± 0,33
		2-я группа	4,0 ± 0,29
		3-я группа	4,0 ± 0,29
	90	1-я группа	2,5 ± 0,26
		3-я группа	1,7 ± 0,24
		4-я группа	2,2 ± 0,24
Примечание – * достоверные отличия при сравнении величин показателей у крыс 1-й группы (не получавших ОД) в сравнении с таковым у животных, получавших ОД, p ≤ 0,05.			

Таблица 8 – Корреляционная взаимосвязь численной плотности (Nai) фибробластов и объемных плотностей (Vv) коллагеновых волокон

Группы	Сутки	Коэффициент корреляции
1-я группа (нелеченые)	60-е	0,13
2-я группа (острый гепатоз, леченный ОД с 1-х суток по 60-е сутки)	60-е	0,03

Согласно проведенным иммуногистохимическим и морфометрическим исследованиям, интраперитонеальное введения ОД при сформированном посттоксическом циррозе печени имеет очевидные позитивные эффекты: стимулирует процессы внутриклеточной репаративной регенерации в гепатоцитах и профилактирует развитие фибротических изменений, формирование цирроза печени и его осложнений у крыс.

ВЫВОДЫ

1. Окисленный декстран обладает гепатопротективными свойствами: снижает некротические изменения (при остром гепатозе – на 50 %; при хроническом гепатозе – в 3,9 раза; при циррозе – в 2,8 раза в сравнении с нелечеными животными, $p \leq 0,05$) в паренхиме печени и стимулирует процессы внутриклеточной репаративной регенерации гепатоцитов при токсическом гепатозе (увеличение количества двухъядерных гепатоцитов при хроническом гепатозе до 40 % в сравнении с нелечеными животными, $p \leq 0,05$) и циррозе печени (увеличение количества

двухъядерных гепатоцитов при циррозе до 63 % в сравнении с нелечеными животными, $p \leq 0,05$).

2. Окисленный декстран является эффективным антифибротическим средством для профилактики фиброза печени при токсическом хроническом гепатозе, коррекции сформированного цирроза печени: препятствуя формированию ложных долек в печени у животных, снижает выраженность фибропластических процессов в междольковых и внутريدольковых пространствах печени.

А. Фиброзирование печени при токсических острых и хронических гепатозах имеет слабую корреляционную связь с процессами некроза в паренхиме печени ($r = -0,21$, $p \leq 0,05$).

Б. Раннее включение (с 1-х суток токсического воздействия) окисленного декстрана в схему коррекции острого гепатоза является эффективной профилактикой цирроза печени, предотвращает его формирование.

3. Коррекция окисленным декстраном токсических острых и хронических гепатозов, цирроза печени сопровождается снижением уровня пластических процессов в фибробластах, что проявляется в меньшей «фибропластической активности» фибробластов (при остром гепатозе – на 28 %, при хроническом гепатозе – на 24 %, при циррозе печени – на 50 % в сравнении с животными, получавшими только токсины, $p \leq 0,05$) и в уменьшении их количества (при остром гепатозе – в 3,4 раза, при хроническом гепатозе – в 2,5 раза, при циррозе печени в 2 раза в сравнении с животными, получавшими только токсины, $p \leq 0,05$), в том числе механизмом апоптоза.

4. Применение окисленного декстрана профилактирует осложнения (отёчный (асцит, гидроторакс) и геморрагический синдромы) у животных при токсических острых и хронических гепатозах, циррозе печени.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шкурупий, В. А. Влияние окисленного декстрана на гепатоциты крыс при токсическом гепатозе смешанной этиологии / В. А. Шкурупий, М. А. Карпов, **В. Д. Клочин** // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2021. – Т. 41, № 5. – С. 25–30.

2. Шкурупий, В. А. Исследование влияния окисленного декстрана на процессы фиброирования в печени крыс при токсических гепатозах и циррозе печени / В. А. Шкурупий, М. А. Карпов, **В. Д. Клочин** // **Сибирский научный медицинский журнал**. – 2022 – Т. 42, № 1. – С. 49–55.

3. Структурные изменения в печени при посттоксическом циррозе и его лечении окисленным декстраном. Иммуногистохимическое исследование / М. А. Карпов,

В. Д. Клочин, А. П. Надеев, И. О. Маринкин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 174, № 9. – С. 392–395.

4. **Клочин, В. Д.** Способы моделирования цирроза печени / **В. Д. Клочин, А. П. Надеев** // Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов : материалы 5-й Международной морфологической конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2020. – С. 70–71.

5. **Клочин, В. Д.** Структурные изменения печени при применении окисленного декстрана в условиях гепатоза смешанной токсической этиологии у крыс / **В. Д. Клочин, В. С. Булышева, Д. С. Войнич** // Авиценна–2021 : материалы 12-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. Т. 1. – Новосибирск, 2022. – С. 402.

6. **Клочин, В. Д.** Исследование фиброза печени при интраперитонеальном введении окисленного декстрана крысам с гепатозом смешанной токсической (алкогольной и тетрахлорметановой) этиологии / **В. Д. Клочин, А. А. Абышев** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 6-й Международной морфологической конференции студентов и молодых ученых. – Новосибирск, 2021. – С. 117.

7. Формирование ложных долек в исходе гепатоза смешанной этиологии у крыс при влиянии окисленного декстрана / **В. Д. Клочин, А. А. Абышев, Д. С. Войнич, В. С. Булышева** // Авиценна-2022 : материалы 13-й Российской (итоговой) научно-практической конкурс-конференции с международным участием студентов и молодых ученых. Т.1. – Новосибирск, 2022. – С. 382.

8. Морфологические изменения в печени у крыс, получавших окисленный декстран при посттоксическом циррозе печени / **В. Д. Клочин, А. А. Абышев, Д. С. Войнич, В. С. Булышева** // 21-я ежегодная итоговая Международная научно-практическая конференция молодых учёных и студентов медицинского факультета Кыргызско-Российского Славянского университета им. первого Президента Российской Федерации Б. Н. Ельцина : тезисы докладов. Выпуск 21. – Бишкек, 2022. – С. 7–9.

9. Противофибротическая эффективность окисленного декстрана при формировании цирроза печени в исходе хронического гепатоза / **М. А. Карпов, В. Д. Клочин, А. П. Надеев, В. А. Шкурупий** // 6-й съезд Российского общества патологоанатомов : материалы съезда. – Москва, 2022. – С. 67–68.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ОД	– окисленный декстран
CCl ₄	– четыреххлористый углерод
MMPs	– матриксные металлопротеинов
Nai	– численная плотность
TIMP	– тканевые ингибиторы металлопротеиназ
Vv	– объемная плотность