

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Абышев Александр Андреевич

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ ПРИ
ГРАНУЛЕМАТОЗНОМ ВОСПАЛЕНИИ И КОРРЕКЦИИ ОКИСЛЕННЫМ
ДЕКСТРАНОМ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.2. Патологическая анатомия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Надеев Александр Петрович

Новосибирск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.	15
1.1 Проблема туберкулёза в России и мире.	15
1.1.1 Эпидемиологические особенности туберкулёза у детей.	16
1.2 Туберкулёзное гранулематозное воспаление.	17
1.2.1 Морфогенез гранулём.	18
1.2.2 Особенности гранулематозного воспаления, ассоциированного с введением вакцины БЦЖ.	20
1.2.3 Морфофункциональные особенности мононуклеарных фагоцитов.	21
1.2.4 Морфофункциональные особенности эпителиоидных клеток.	26
1.3 Морфологические особенности печени новорожденных мышей и особенности изменения гистоархитектоники ткани печени в возрастном аспекте.	29
1.3.1 Морфогенез и динамические изменения экстрамедуллярных островков кроветворения в печени.	32
1.3.2 Функциональные особенности и происхождение клеток Купфера.	34
1.4.1 Механизмы репаративной функции гепатоцитов.	36
1.4.2 Механизмы и особенности фибропластических процессов в печени мышей в условиях гранулематозного воспаления.	37
1.5 Особенности гранулематозного воспалительного процесса у детей и новорожденных.	39
1.6 Способы коррекции и лечения туберкулёза.	40
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.	41
2.1 Экспериментальные животные.	41
2.2 Дизайн экспериментальных исследований.	41
2.3 Методы оценки и оборудование.	42
2.3.1 Электронная микроскопия клетки Купфера.	43
2.3.2 Методы статистической обработки результатов.	44

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.	45
3.1 Морфологические и морфометрические изменения у новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза.	45
3.1.1 Динамика изменения массы новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза.	45
3.1.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 с 3-х по 10-е сутки эксперимента. ...	46
3.1.3 Деструктивные изменения в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза.	49
3.1.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени новорожденных мышей линии C57Bl/6.	51
3.1.5 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 3-х по 10-е сутки эксперимента.	55
3.1.6 Особенности фибропластических процессов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза.	58
3.2 Морфологические и морфометрические изменения у половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза.	60
3.2.1 Динамика изменения массы половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза.	60
3.2.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени взрослых мышей линии C57Bl/6 с 28-х по 56-е сутки эксперимента.	61
3.2.3 Деструктивные изменения в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза.	63
3.2.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени взрослых мышей линии C57Bl/6.	65
3.2.5 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов взрослых мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 28-х по 56-е сутки эксперимента.	65

3.2.6 Особенности фибропластических процессов в печени взрослых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза с 28-х по 56-е сутки эксперимента.	67
3.3 Морфологические и морфометрические изменения у новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном.	71
3.3.1 Динамика изменения массы новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном.	71
3.3.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном с 3-х по 10-е сутки эксперимента.	72
3.3.3 Деструктивные изменения в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном.	72
3.3.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном.	75
3.3.5 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 3-х по 10-е сутки эксперимента.	76
3.3.6 Особенности фибропластических процессов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном.	78
3.4 Морфологические и морфометрические изменения у половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном.	79
3.4.1 Динамика изменения массы взрослых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном.	79
3.4.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени взрослых мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном с	

28-х по 56-е сутки эксперимента.	80
3.4.3 Деструктивные изменения в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном.	83
3.4.4 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 28-х по 56-е сутки эксперимента.	84
3.3.5 Особенности фибропластических процессов в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном.	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	90
ВЫВОДЫ.	95
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.	96
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.	98
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.	120

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

По данным из глобального отчёта ВОЗ по туберкулёзу, по меньшей мере 1,3 млн человек в мире умерли в 2020 году от туберкулёза с ВИЧ отрицательным статусом, из них 10 % детей до 15 лет. В России заболеваемость туберкулёзом детей 0–14 лет – 9,7 на 100 тыс. детей. Наиболее высокие показатели заболеваемости туберкулёзом в Дальневосточном, Сибирском и Уральском регионах [93].

Несмотря на общую тенденцию к снижению как заболеваемости, так и смертности от туберкулёза в Российской Федерации и мире в целом, он продолжает занимать ведущее место в структуре заболеваемости и смертности. В 2020 г. зарегистрировано 47 063 новых случаев заболевания на всей территории Российской Федерации, показатель заболеваемости составил 32,07 на 100 тыс. населения. В 2020 г., как и в течение 13-летнего периода, наиболее высокая заболеваемость активным туберкулёзом на территории Российской Федерации продолжает регистрироваться в Сибирском, Дальневосточном и Уральском федеральных округах: 57,58, 53,47 и 43,56 на 100 тыс. населения, соответственно, хотя в них также отмечается уменьшение показателя заболеваемости на 22,25 %, 19,34 % и 22,3 %, соответственно, по сравнению с 2019 годом. Заболеваемость детей от 0 до 17 лет впервые выявленным активным туберкулёзом в период с 2009 по 2020 гг. также имеет общую тенденцию к снижению. Медленнее всего снижение наблюдается в возрастной категории детей от 0 до 1 года [20].

Туберкулёз у новорожденных и детей встречается значительно реже, чем у взрослых, и в особенности его висцеральные формы, в том числе поражение печени. Частым осложнением гранулематозного процесса является фиброз, развивающийся в исходе хронического воспаления и приводящий к органосклерозу и необратимым нарушениям функции органов [38].

Одной из причин развития гепатита у детей является туберкулёзная инфекция. Перинатальный туберкулёз является редкой инфекцией и ее

распространенность трудно определить. На сегодняшний день в научной литературе описано около 300 зарегистрированных случаев перинатального туберкулёза. Новорожденные чрезвычайно уязвимы к туберкулёзу из-за незрелости иммунной системы. Существует 3 пути инфицирования: гематогенный путь через пупочную вену, приводящий к первичному поражению печени или легких; внутриутробно при аспирации инфицированных околоплодных вод с первичными поражениями в легких или пищеварительном тракте и после родов при контакте с инфицированным.

Также одной из важных проблем, связанных с туберкулёзом, является лекарственная устойчивость микобактерий к стандартным и распространённым противомикробным препаратам. В настоящее время одним из основных препаратов для лечения туберкулёза является изониазид, который обладает выраженной гепатотоксичностью [32].

В этой связи поиск и разработка новых эффективных противотуберкулёзных лекарственных препаратов является приоритетной задачей современной медицины. Ранее показано, что окисленный декстран обладает лизосомотропизмом и избирательно захватывается клетками Купфера и активирует их фагоцитарную активность путём формирования фаголизосом. Пролонгированные формы изониазида (конъюгированный с окисленным декстраном) являются эффективным противотуберкулёзным средством [26].

При введении окисленного декстрана в брюшную полость его концентрация в крови снижается на 90 % в течение первых 6 часов, а через 24 часа ОД не определяется в крови. Также было продемонстрировано, что окисленные декстраны обладают слабо выраженными прямыми антиоксидантными свойствами, но при этом являются индукторами внутриклеточного окислительного стресса, проявляющегося усилением продукции кислородных радикалов. Это свойство исследованных веществ усиливает цитотоксический и бактерицидный потенциал фагоцитов, тем самым способствует и усиливает процесс фаголизосомного слияния и способствует элиминации возбудителя и тем

самым приводит к снижению гранулематозного процесса, что в итоге приводит к менее выраженной альтерации гепатоцитов [24].

Таким образом, можно утверждать, что в условиях абдоминальной формы туберкулёза механизмы формирования гранулём и фибропластических процессов имеют свои особенности из-за клеточного состава гепатоцитов в перинатальный период.

Мыши инбредной линии C57Bl/6 являются широко используемым объектом для изучения роли генетических факторов в патологических процессах, в том числе и для экспериментального моделирования туберкулёзной инфекции [18]. Моделирование гранулематозного гепатита, инициированного введением вакцины БЦЖ на животных, позволяет оценить динамику формирования гранулём, а также экспериментально оценить эффективность применения новых лекарственных препаратов.

Печень плода и новорожденного выполняет важную иммунологическую роль. Так, внутриутробно печень является барьерным органом, который сталкивается с субстратами, а также с различными микроорганизмами, поступающими с кровью от матери к плоду [66]. У новорожденных в печени сохраняется большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения, тем самым продолжая занимать важную долю в формировании иммунной системы [104, 106, 138].

Клетки Купфера, которые являются резидентными макрофагами печени, выполняют функцию фагоцитоза, инактивации и элиминации экзо- и эндотоксинов, микроорганизмов. Помимо этих функций клетки Купфера осуществляют взаимодействие с гепатоцитами и прочими иммунными клетками путём секреции различных провоспалительных и противовоспалительных медиаторов [83]. При некоторых инфекционных заболеваниях, в которых невозможен завершённый фагоцитоз в силу особенности микроорганизма или иммунодефицита, развивается хроническое гранулематозное воспаление. При таких условиях в печени первыми гранулёмаобразующими клетками становятся клетки Купфера [118].

Степень разработанности темы диссертации

К настоящему времени большая часть данных в научной литературе, в которой освещается проблема туберкулёзного гранулематоза в печени, получена в эксперименте на моделях взрослых половозрелых мышей [8, 13, 46, 162]. Особенности паренхиматозного гепатита и динамика морфологических изменений гранулематоза в возрастном аспекте освещены недостаточно.

В связи с этим необходимо уточнение влияния туберкулёзной инфекции на печень новорожденных и изучение динамики гранулематозного процесса, а также изучение возможных осложнений.

Цель исследования

Изучить морфологические изменения и особенности фиброза в печени мышей от периода новорожденности до взрослого возраста при введении вакцины БЦЖ и применении окисленного декстрана.

Задачи исследования

1. Исследовать динамику формирования гранулём, их количество и размеры в печени мышей при введении вакцины БЦЖ и коррекции окисленным декстраном в возрастном аспекте.
2. Исследовать особенности деструктивных и репаративных процессов в паренхиме печени мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и при коррекции окисленным декстраном в различные возрастные периоды жизни.
3. Изучить динамику изменений очагов экстрамедуллярного кроветворения в печени новорожденных мышей при введении БЦЖ и коррекции окисленным декстраном.
4. Исследовать динамику формирования фиброза печени в условиях БЦЖ-гранулематоза и при коррекции окисленным декстраном.

Научная новизна

Впервые установлено, что при введении вакцины БЦЖ новорожденным мышам линии C57Bl/6 гранулематозное воспаление в печени наблюдается с 10-х суток жизни, а при применении окисленного декстрана гранулёмы в печени появляются на 28-е сутки эксперимента.

Впервые показано, что в условиях БЦЖ-гранулематоза в печени мышей линии C57Bl/6 и при применении окисленного декстрана наблюдаются менее выраженные дистрофические и некротические изменения и активизируются репаративные процессы в паренхиме печени по сравнению с контрольными группами от периода новорожденности до взрослого возраста.

Впервые показано, что в печени мышей линии C57Bl/6 как в условиях БЦЖ-гранулематоза, так и при его коррекции окисленным декстраном, наблюдается большее количество островков экстрамедуллярного кроветворения и их более длительное существование.

Впервые показана меньшая выраженность фибропластических процессов в печени мышей линии C57Bl/6 при БЦЖ-гранулематозе и в условиях коррекции окисленным декстраном.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получены представления о морфологических особенностях БЦЖ-гранулематоза в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в возрастном аспекте и при его коррекции окисленным декстраном.

Полученные данные об патологических изменениях в печени новорожденных мышей могут быть полезны для понимания особенностей патогенеза гранулематозных воспалительных заболеваний у плодов, новорожденных и детей раннего возраста. Также эффективность окисленного декстрана позволяет продолжить разработку эффективных способов лечения туберкулёза даже с учётом морфологических особенностей в органах новорожденных.

Методология и методы диссертационного исследования

Методологическая работа построена на принципах системного анализа комплекса данных, включавших результаты морфометрического исследования гепатоцитов, гранулём, иммуногистохимического исследования образцов печени, полученного от 200 мышей линии C57Bl/6 на 3-и, 5-е, 10-е, 28-е и 56-е сутки эксперимента после введения интраперитонеально вакцины БЦЖ на 1-е сутки после рождения и введения интраперитонеально раствора окисленного декстрана на 2-е сутки после рождения. В работе использовались современные иммуногистохимические, морфометрические методы исследования, применены адекватные методы статистического анализа. Дизайн исследования согласуется с принципами проведения экспериментов на лабораторных животных. Работа проводилась с соблюдением правил научных исследований и основывалась на принципах биоэтики.

Положения, выносимые на защиту

1. При введении вакцины БЦЖ новорожденным мышам линии C57Bl/6 наблюдается отсроченное развитие гранулём и развиваются деструктивные изменения в паренхиме печени у взрослых мышей.
2. Применение окисленного декстрана в условиях введения вакцины БЦЖ новорожденным мышам линии C57Bl/6 приводит к позднему формированию гранулём у взрослых мышей, менее выраженным дистрофическим, некротическим изменениям и фиброзу с активизацией репаративных процессов в паренхиме печени.

Степень достоверности

Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным целям и задачам, позволяют получить доступные и достоверные анализу результаты. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале с использованием сертифицированного оборудования, современных высокоинформативных методов

морфологического исследования (световая микроскопия, морфометрия, иммуногистохимическое исследование) и анализа результатов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на: 5-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых учёных «Морфологические науки – фундаментальная основа медицины», посвящённой 80-летию со дня рождения и 50-летию научно-педагогической деятельности Заслуженного деятеля науки РФ, академика РАН, профессора В. А. Шкурупия (Новосибирск, 2020); 2-м Дальневосточном международном медицинском конгрессе, конференции «Фундаментальные медицинские и биологические науки» (Хабаровск, 2021); 6-м съезде российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022); 2-й Международной научно-практической конференции «Бородинские чтения», посвященной 85-летию Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, 2020); 4-м съезде патологоанатомов Республики Беларусь с международным участием: Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития (Минск, 2020); Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека имени академика А. П. Авцына) (Москва, 2021); 14-й международной научно-практической конференции памяти академика Ю. И. Бородина (Новосибирск, 2021); 3-й Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию академика РАН Юрия Ивановича Бородина (Новосибирск, 2022).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Морфологические основы компенсаторно-приспособительных реакций» ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (Новосибирск, 2022).

Диссертация выполнена в соответствии с утвержденным направлением научно-исследовательской работы Новосибирского государственного медицинского университета 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 диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России в темах «Перинатальная патология», «Гранулематозное воспаление», «Регенерация».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, включенных 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 2 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, раздела результаты и обсуждения собственных данных, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, списка иллюстративного материала. Список литературы представлен

205 источниками, из которых 163 в зарубежных изданиях. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 17 таблиц и 17 рисунков.

Личный вклад автора

Все исследования проводились при непосредственном участии автора: анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационного исследования, разработка дизайна и постановка экспериментов, сбор и систематизация первичного материала, морфометрия и анализ статистической обработки полученного материала. Подготовка научных докладов, написание статей и диссертации выполнены лично автором.

Вся работа с животными и гистологическое исследование тканей печени проводилось на базе кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблема туберкулёза в России и мире

Туберкулёз на сегодняшний день остаётся одним из самых смертоносных заболеваний, которое занимает 10 место по причинам летального исхода. Во всём мире примерно четверть населения инфицирована микобактериями туберкулёза. Подавляющее большинство людей, заболевших туберкулёзом, проживают в странах с низким уровнем жизни, дохода и системой здравоохранения. Около 80 % случаев туберкулёза регистрируются в 22 странах, таких как Индия, Китай и Россия.

Несмотря на общую тенденцию к снижению как заболеваемости, так и смертности от туберкулёза в Российской Федерации и мире в целом, он продолжает занимать ведущее место в структуре заболеваемости и смертности. По данным из глобального отчёта ВОЗ по туберкулёзу, по меньшей мере 1,3 млн человек в мире умерли в 2020 году от туберкулёза с ВИЧ отрицательным статусом, из них 10 % детей до 15 лет. В России заболеваемость туберкулёзом детей 0–14 лет – 9,7 на 100 тыс. детей. Наиболее высокие показатели заболеваемости туберкулёзом в Дальневосточном, Сибирском и Уральском регионах [93].

В 2020 г. зарегистрировано 47 063 новых случая заболевания на всей территории Российской Федерации, показатель заболеваемости составил 32,07 на 100 тыс. населения. В 2020 г., как и в течение 13-летнего периода, наиболее высокая заболеваемость активным туберкулёзом на территории Российской Федерации продолжает регистрироваться в Сибирском, Дальневосточном и Уральском федеральных округах: 57,58, 53,47 и 43,56 на 100 тыс. населения, соответственно, хотя в них также отмечается уменьшение показателя заболеваемости на 22,25 %, 19,34 % и 22,3 %, соответственно, по сравнению с 2019 годом. Заболеваемость детей от 0 до 17 лет впервые выявленным активным туберкулёзом в период с 2009 по 2020 гг. также имеет общую тенденцию к

снижению. Медленнее всего снижение наблюдается в возрастной категории детей от 0 до 1 года [20].

1.1.1 Эпидемиологические особенности туберкулёза у детей

Туберкулёз у новорожденных и детей встречается значительно реже, чем у взрослых и в особенности его висцеральные формы, в том числе поражение печени с развитием тяжёлых осложнений в виде фиброза и цирроза, а также к летальным исходам.

Перинатальный туберкулёз является редкой инфекцией и ее распространенность трудно определить. На сегодняшний день в научной литературе описано около 400 зарегистрированных случаев перинатального туберкулёза [151, 175]. Новорожденные чрезвычайно уязвимы к туберкулёзу из-за незрелости иммунной системы. Существует 3 пути инфицирования: гематогенный путь через пупочную вену, приводящий к первичному поражению печени или легких; внутриутробно при аспирации инфицированных околоплодных вод с первичными поражениями в легких или пищеварительном тракте и после родов при контакте с больным активной формой туберкулёза.

Легочная форма туберкулёза у беременных встречается намного чаще, чем внелегочный туберкулёз. Однако, внелегочная форма становится все более распространенной, особенно у пациентов с ассоциированной ВИЧ-инфекцией. Диагностика туберкулёза может быть осложнена во время беременности из-за крайне неспецифичных клинических проявлений, и обычно туберкулёз устанавливается постфактум при выявлении этиологической причины дыхательной недостаточности и лихорадки у новорожденных [72, 167]. Клиническое подозрение на неонатальный туберкулёз обычно возникает только в том случае, если состояние новорожденного с подозрением на «обычную» бактериальную инфекцию не улучшается с помощью антибиотиков широкого спектра действия. Кроме того, задержка с началом соответствующей противотуберкулёзной терапии часто приводит к необходимости значительной

сердечно-сосудистой и респираторной поддержки и летальному исходу [175].

1.2 Туберкулёзное гранулематозное воспаление

Характерной особенностью туберкулёза человека является хроническое воспаление с формированием специфичных гранулём, которые представляют собой плотное ограниченное скопление иммунных клеток с целью ограничения микобактерий. Помимо классической казеозной гранулёмы, в гранулёмах могут отсутствовать некротические массы, присутствовать большое количество нейтрофилов, а также полное замещение волокнистой соединительной тканью с участками обезызвращения. В большинстве этих типов в гранулёмах встречаются следующие структуры: в центре определяются массы казеозного некроза, окруженные разнообразной популяцией макрофагов, которые сами по себе ограничены лимфоцитарной манжетой из CD4 и CD8 Т-клеток и В-клеток [61]. В гранулёмах чётко прослеживаются различные зоны воспалительной активности медиаторов: в частности, провоспалительные, антибактериальные липидные медиаторы сосредоточены в центре гранулём, а противовоспалительные медиаторы находятся на периферии [111, 144].

В динамике *M. tuberculosis* первоначально инфицируют резидентные макрофаги легких, печени или других органов, в зависимости от механизма заражения, что приводит к развитию воспалительного ответа и миграции лейкоцитов из просветов сосудов в патогенный очаг. Инфекция макрофагов вызывает локализованную провоспалительную реакцию, что приводит к набору активированных врожденных иммунных компонентов, включая нейтрофилы и дендритные клетки. Это приводит к секреции антимикробных пептидов (например, кателицидина), цитокинов (включая IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-12), хемокинов и дополнительных макрофагов, которые объединяются в туберкулёзную гранулёму – многоклеточную структуру, которая ограничивает микобактерии туберкулёза от окружающих тканей. В течение первых недель гранулёма представляет собой следующую структуру: в центре гранулёмы

находятся инфицированные макрофаги, которые окружены плотным валом из рекрутированных неинфицированных резидентных и рекрутированных макрофагов, а также других иммунных клеток. Со временем гранулёма созревает, в результате чего в центре образуется очаг казеозного некроза из погибших макрофагов и большого количества микобактерий. А макрофаги, находящиеся на периферии гранулёмы, трансформируются в эпителиоидные клетки и в гигантские клетки Пирогова – Лангханса [54, 144].

Микобактерии определяются в гранулёмах до 4-х недель после заражения. После 4-й недели хронического инфекционного процесса наблюдается активное бактериальное уничтожение в большинстве гранулём, и примерно 10 % гранулём стерилизуются к 11 неделе [158].

1.2.1 Морфогенез гранулём

Гранулёмы представляют собой компактные сферические массы агрегированных мононуклеарных лейкоцитов размером от 50 до 300 мкм, которые накапливаются после хронического воздействия антигенов. Основным триггером может послужить воздействие агентов, которые не могут быть полностью фагоцитированы или элиминированы, а также в исходе врождённой или приобретённой иммунной дисфункции. Конечным результатом является высвобождение различных цитокинов, которые стимулируют мононуклеарные клетки, которые сливаются с образованием многоядерных гигантских клеток

Группа гранулематозных заболеваний объединяет множество заболеваний инфекционной и неинфекционной природы, основным отличием которых является преимущественно развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа и формирование гранулём в различных органах. К гранулематозным заболеваниям относят порядка 80 болезней, в числе которых туберкулёз с высокой заболеваемостью и летальностью [40]. В основе развития гранулематозного воспаления лежит формирование гранулём, которые представляют плотное скопление мононуклеарных клеток, способных к

фагоцитозу. Однако, у плодов и недоношенных новорожденных гранулематозное воспаление является особенностью воспалительной реакции, отражающей незрелость органов и тканей (например, при листериозе), в то же время у детей в поздний постнатальный период гранулематозные заболевания встречаются редко.

Существуют различные критерии классификации гранулём. Выделяют инфекционные, неинфекционные и идиопатические гранулёмы. Инфекционные гранулёмы развиваются при персистенции некоторых бактерий, грибов, простейших и гельминтов, например при туберкулёзе или шистоматозе. Неинфекционные гранулёмы возникают при попадании экзогенных органических и неорганических соединений, например при лекарственном поражении печени. Идиопатические гранулёмы развиваются при заболеваниях с неустановленной этиологией, например саркоидоз или идиопатический гранулематоз печени.

Также гранулёмы разделяются по клеточному составу. Выделяют макрофагальные гранулёмы, эпителиоидноклеточные и гигантоклеточные гранулёмы.

Защитные механизмы хозяина против микобактерий обычно иницируются фагоцитозом через макрофаги, вызывая воспаление и впоследствии клеточно-опосредованный иммунитет, включающий иммунные реакции типа Th1. Эти скоординированные механизмы приводят к образованию гранулём.

Тип иммунного ответа зависит от того, являются ли чужеродные частицы внутри- или внеклеточными по происхождению. Ответ Th1 обычно нацелен на внутриклеточные патогены, что приводит к секреции различных цитокинов, таких как интерферон гамма, интерлейкин IL-2 и IL-12. Внеклеточные патогены вызывают ответ Th2 с секрецией IL-4, 5, 6 и 10. Обе реакции вызывают положительный ответ обратной связи на Т-клетки, увековеченные цитокинами. Образование и поддержание гранулём в печени основано на высвобождении цитокинов. В иммунологически активном типе образование гранулём начинается с фагоцитоза иммунологически активных веществ обычными макрофагами. Затем макрофаги перерабатывают агент-нарушитель в простые антигенные пептиды, которые затем представляются Т-лимфоцитам. Это

вызывает активацию Т-лимфоцитов, стимулируя их к продуцированию различных цитокинов, что приводит к активации других Т-клеток и превращению обычных гистиоцитов и макрофагов в эпителиоидные клетки. Эти эпителиоидные клетки объединяются в гранулёму и могут сливаться с образованием гигантских клеток. Кроме того, эта гранулематозная реакция обычно окружена манжетой лимфоцитов, несколькими плазматическими клетками и эозинофилами. Состав этой манжеты в некоторой степени определяется возбудителем. Эпителиоидные клетки способны вызывать некроз тканей, приводящий к так называемым «некротическим» гранулёмам, как это характерно для инфекционных агентов.

Доказано, что своего «расцвета» БЦЖ-гранулёма у мышей достигает на 2–4 неделе после заражения. В этот период наблюдается наиболее выраженная клеточная инфильтрация, кроме того, количество и диаметры гранулём – наибольшие [30]. Начиная с 2–4 недель снижается количество макрофагов в гранулёмах. При этом обнаруживали уменьшение количества макрофагов, содержащих микобактерию туберкулёза [75]. Общепринято мнение о том, что способность микобактерии туберкулёза препятствовать слиянию фагосомы и лизосомы обуславливает её персистенцию в макрофаге [181].

1.2.2 Особенности гранулематозного воспаления, ассоциированного с введением вакцины БЦЖ

Бацилла Кальмета – Герена (БЦЖ) представляет собой живую аттенуированную *Mycobacterium bovis*, которая в настоящее время используется в качестве вакцины против инфекционного заболевания, вызываемого *Mycobacterium tuberculosis*. Вакцинация БЦЖ обеспечивает неспецифическую защиту от микобактериальных инфекций. Также вакцинация БЦЖ способствует формированию иммунитета и от некоторых вирусных инфекций, путём изменения уровня секреции IL-1 β в макрофагах в эксперименте [55]. Однако в исходе вакцинации БЦЖ могут наблюдаться и неблагоприятные исходы. Так у детей с первичным иммунодефицитом может развиваться Генерализованный

БЦЖит, проявляющийся лимфаденопатией, а также формированием абсцессов в печени и костях [56], хронической гранулематозной болезнью (ХГД), дефицитом супероксид-продуцирующей фагоцита NADPH оксидазы, является первичным иммунодефицитом и одним из наиболее частых врожденных дефектов фагоцитов у человека.

При инфицировании вакциной БЦЖ у мышей с мутацией в гене *Ncf1* и дефицитом NADPH оксидазы наблюдался тяжёлый воспалительный процесс в легких: клеточный экссудат представлял собой преимущественно очаговое скопление нейтрофилов с формированием абсцессов с выраженной геморрагической экссудацией, внутрисосудистым тромбозом, уменьшением альвеолярных пространств и гиперплазией клеток плевры [54].

1.2.3 Морфофункциональные особенности мононуклеарных фагоцитов

Мононуклеарные фагоциты являются одной из самых важных популяций клеток иммунной системы, так как они выполняют не только фагоцитарную роль, но также могут координировать целиком воспалительную реакцию, путём выделения различных медиаторов воспаления и регулировать такие процессы регенерации, как пролиферация клеток и фиброз.

Моноциты определяются как циркулирующие клетки крови, которые составляют ~10 % периферических лейкоцитов у человека и ~4 % у мышей. Считается, что моноциты крови развиваются в красном костном мозге из миелоидного предшественника, разделяемого с эритроцитами, тромбоцитами и гранулоцитами. После их генерации моноциты высвобождаются в периферическое кровообращение. Моноциты являются относительно долгоживущими клетками, которые могут дифференцироваться дальше в макрофаги или дендритные клетки (ДК) по мере их миграции в ткань.

Печень может содержать переменное количество рекрутированных макрофагов, полученных из моноцитов крови. Действительно, при некоторых воспалительных состояниях и, в частности, когда происходит истощение КС,

может наблюдаться замещение макрофагами, полученными из моноцитов. Некоторые из вновь рекрутированных клеток приобретут аналогичную транскриптомную картину со временем и разрешением воспаления и установят обитание в печени, принимая на себя аналогичные функции.

В условиях воспаления происходит активация и мобилизация моноклеарных фагоцитов в ответ на действие провоспалительных медиаторов и патогенных веществ. Эти изменения позволяют с большой эффективностью фагоцитировать и переваривать микроорганизмы. В дальнейшем на поверхность макрофагов и дендритных клеток выставляются фрагменты бактерий для антигенпрезентации через МНС рецепторы I и II класса для стимуляции CD4 и CD8 T-клеток [99].

Моноциты делятся на три субпопуляции: классические, неклассические и промежуточные, которые отличаются друг от друга как по экспрессии рецепторов CD 14 и CD 16, так и по функциям [91]. Так классические моноциты более способны к переходу в ткани с трансформацией в ДК, в то время как неклассические моноциты не проникают в ткани и являются основным источником провоспалительных медиаторов (IL1b и TNFa), инициируя хемотаксис нейтрофилов, некроз эндотелия. В условиях длительно текущего хронического воспаления неклассические моноциты секретируют большое количество IL-10 и тем самым выступают как противовоспалительные клетки [68].

Также как и моноциты крови, все макрофаги, которые принимают участие в воспалительном процессе, обладают феноменальной пластичностью и способны изменять свою «физиологию» в зависимости от поступающих эндогенных сигналов в клетку. Самым важным сигналом для активации моноклеарных фагоцитов является IFN γ , который в начале воспаления секретируется клетками врождённого неспецифического иммунитета, но при продолжительном иммунном ответе основным источником IFN γ становятся Th1-клетки [202].

Большинство микроорганизмов имеют разнообразные патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), которые обнаруживаются макрофагами с

помощью Toll-подобных рецепторов. В ответ на передачу сигнала через данный рецептор запускается каскад передачи сигнала, который в итоге приводит к секреции большого числа разнообразных провосполительных цитокинов и молекул адгезии и хемотаксиса, инициируя воспалительный ответ [203], к которым относится и TNF. Комбинация TNF и IFN γ приводит к оптимальной активации макрофагов. Эти классически активированные макрофаги становятся сильно микробицидными, и они являются важными иммунными эффекторными клетками.

Макрофаги способны, как запустить воспалительный процесс, так и являться инициатором разрешения и окончания воспалительного процесса. Одним из значимых механизмов в уменьшении воспалительного инфильтрата является фагоцитоз клеток, в которых был запущен апоптоз. Помимо такого прямого уменьшения количества клеток при фагоцитозе апоптотических телец индуцируется секреция цитокина TGF β -1, который ингибирует воспаление и способствует выработке комплексов внеклеточного матрикса [105].

Также было показано, что мышинные зрелые перитонеальные макрофаги могут быстро вторгаться в печень после травмы [44]. Используя модель воспаления, индуцированного термическим повреждением печени, авторы показали, что перитонеальные макрофаги GATA6 мигрировали в место повреждения. Это внесосудистое рекрутирование было опосредовано АТФ, высвобождаемой из мертвых клеток, действующих как молекулярный паттерн, связанный с повреждением. Различные популяции макрофагов печени находятся в разных печеночных нишах и, следовательно, подвергаются воздействию различной микросреды.

Долгое время считалось, что клетки Купфера являются единственными резидентными макрофагами в печени. Недавно была описана еще одна популяция макрофагов, расположенная в капсуле печени. Эти капсульные макрофаги печени фенотипически и с точки зрения развития отличаются от клеток Купфера. Капсульные макрофаги хоть и экспрессируют типичные маркеры макрофагов, такие как CD64 и F4/80, но они не экспрессируют характерные для клеток

Купфера маркеры Tim4 и Clec4E и экспрессируют скорее маркеры, традиционно экспрессируемые дендритными клетками, такие как MHCII и CD11c. Кроме того, капсульные макрофаги не происходят из эмбриональных предшественников, а возникают из взрослых циркулирующих моноцитов.

Капсульные макрофаги практически отсутствуют в течение первых дней после рождения; их накопление ускори́лось после рождения на 3–5 неделе, и численность оставалась относительно стабильной у взрослых животных. Также было показано, что микробиота оказывает схожее влияние на формирование популяции и дозревание как кишечных макрофагов, так и капсульных макрофагов [174].

Капсульные макрофаги имеют длинные цитоплазматические отростки, «обернутые» вокруг коллагеновых волокон и проникающие как в нижерасположенные печёночные синусоиды, так и за пределы капсулы в брюшную полость. Их пограничное расположение наводило на мысль о специфической роли на границе между брюшинной полостью и печеночной паренхимой.

Капсула печени как барьерная ткань между паренхимой печени и содержимым брюшной полости часто контактирует с такими патогенами, как *M. tuberculosis* и *L. monocytogenes*. Заражение микобактериями внутриперитонеальным путем является физиологической моделью туберкулёза брюшной полости [163].

Было продемонстрировано, что при интраперитонеальном введении БЦЖ у мышей с истощённой популяцией капсульных макрофагов, количество клеток Купфера, содержащих микобактерии, было в 10 раз больше, чем в контрольной группе, а количество нейтрофилов в капсуле печени было снижено. Полученные данные указывают на то, что капсульные макрофаги активно выполняют роль как ингибиторов распространения патогена, так и хемоаттрактантов. В совокупности эти наблюдения показывают, что, вероятно, путем рекрутирования нейтрофилов, играют важную роль в предотвращении распространения перитонеальных патогенов, повреждающих капсулу печени.

Недавнее исследование показало, что при повреждении печени перитонеальные макрофаги, экспрессирующие GATA-6, могут мигрировать через капсулу печени для восстановления поврежденной ткани печени, что повышает вероятность того, что капсульные макрофаги также могут быть получены из перитонеальных макрофагов. Однако несколько аргументов предполагают, что это маловероятно, по крайней мере, в стационарном состоянии. Во-первых, капсульные макрофаги не экспрессируют GATA-6 и другие гены, экспрессируемые перитонеальными макрофагами. Во-вторых, в отличие от переноса моноцитов, перенос перитонеальных макрофагов в тех же условиях не приводил к возникновению капсульных макрофагов. Хотя наши результаты показывают, что перитонеальные макрофаги не дифференцируются в капсульные макрофаги в невоспаленной печени, возможно предположить, что они потенциально используют капсульные макрофаги для облегченной миграции через капсулу печени для восстановления поврежденной ткани печени [198].

Хотя инфекция через брюшину повлияет на другие органы, неясно, предотвращают ли клетки, подобные описанным в печени, бактериальную диссеминацию в эти другие ткани. Также неизвестно, взаимодействуют ли капсульные макрофаги или сотрудничают с перитонеальными макрофагами для устранения перитонеальных патогенов.

В заключение, капсульные макрофаги представляют собой уникальное подмножество макрофагов, полученных из моноцитов, которое онтогенетически и фенотипически отличается от KCs, образуя капсульную сеть в нормальной печени взрослого человека, которая не обнаруживается в капсуле других органов. Это подмножество макрофагов, по-видимому, играет роль в иммунном надзоре на границе раздела между брюшинной полостью и печенью, опосредуя рекрутирование нейтрофилов в присутствии перитонеальных бактерий с ассоциированным контролем внутрипеченочных бактериальных нагрузок.

1.2.4 Морфофункциональные особенности эпителиоидных клеток

Эпителиоидные клетки – это клетки мононуклеарной фагоцитарной системы, обнаруженные в некоторых гранулёмах, в основном связанные с интенсивной иммунологической активностью. Эти клетки проявляют небольшую фагоцитарную активность [75].

Многочисленные исследования с применением различных методов позволили установить клеточное строение эпителиоидных клеток [159, 192]. Эпителиоидные клетки имеют полигональную или овальную форму, овальное ядро с дисперсным хроматином, двумя и более ядрышками, а также большим количеством ядерных пор. При этом ядро расположено эксцентрично на одном полюсе, тогда как наибольшая часть органелл – на противоположном. В цитоплазме содержится большое количество митохондрий, расположенных вдоль пучков актиновых филаментов, лизосом, вакуолей, а также гладких и окаймленных везикул, локализованных преимущественно в области пластинчатого комплекса Гольджи. Для плазмалеммы характерны парусовидные выросты, соединяющие между собой эпителиоидные клетки. В таких выростах выявляют большое количество везикул. Эпителиоидные клетки приобретают характерный уплощенный вид, характеризующийся по диффузному цитоплазматическому окрашиванию и удлинённым ядрам. Ультраструктурный анализ показывает, что они образуют плотно переплетённые клеточные мембраны в виде застёжек-молний. Эпителиоидная трансформация может произойти в течение нескольких дней после образования гранулёмы [135, 168].

Различают ЭК двух типов – плазмоцитоподобные (тип А) и везикулированные (тип В). Наиболее часто в гранулёмах на ранних стадиях встречаются клетки типа А. Так по данным Т. Г. Черновой (1993), доля ЭК типа А в БЦЖ-гранулёмах составляет 90 % к 3-му месяцу гранулематозного воспаления. На более поздних сроках БЦЖ-гранулематоза преобладают ЭК типа В.

Оба типа эпителиоидных клеток наблюдаются в хронических гранулёмах, предполагается, что эпителиоидные клетки представляют различные этапы

дифференцировки одного и того же предшественника макрофагов или являются параллельными предшественниками двух различных линий клеток. Хотя гранулёмы в целом со временем становятся более эпителиоидно-клеточными, даже на самых хронических стадиях обнаруживаются высокоактивные макрофаги рядом с эпителиоидными клетками. Поскольку происходит постоянное привлечение макрофагов к гранулёмам, это наблюдение согласуется со сценарием, в котором вновь рекрутированные макрофаги со временем претерпевают эпителиоидную трансформацию.

Макрофаги туберкулёзных гранулём (как инфицированные, так и неинфицированные) способны к экспрессии эпителиальных детерминант и структур, например, E-кадгерин, образующий плотные межклеточные соединения [135]. Эпителиоидная трансформация, которая защищает окружающие ткани, отгораживая патогенные микроорганизмы. Активные макрофаги способны разрушать E-кадгерин, что приводит к дезорганизации гранулём и усиленной инфильтрации нейтрофилов, коррелирующей с повышенным уничтожением бактерий.

Макрофаги играют центральную роль в патогенезе микобактериальной инфекции, поскольку они являются основной клеточной нишей для микобактерии туберкулёза (*Mtb*) как при ранней, так и при хронической инфекции [140].

Толл-подобные рецепторы (TLR) являются детекторами для чужеродных частиц, но они не функционируют как фагоцитарные рецепторы. Тем не менее, TLR часто сотрудничают с другими неопсоническими рецепторами, чтобы стимулировать прием внутрь [116, 117]. Опсонические рецепторы распознают опсоины, полученные от хозяина, которые связываются с чужеродными частицами и нацелены на их прием внутрь. Опсоины включают антитела, комплемент, фибронектин, маннозсвязывающий лектин и глобулин молочного жира [85].

После распознавания частицы-мишени фагоцитарные рецепторы инициируют сигнальные каскады, которые ремоделируют липиды в клеточной мембране и регулируют актиновый цитоскелет с целью расширения клеточной

мембраны вокруг частицы. Во время этой части процесса фагоцитарные рецепторы также участвуют в последовательном порядке и сотрудничают для завершения формирования фагосомы [87, 156]. Как только частица интернализуется внутри ранней фагосомы, эта вакуоль может сливаться с везикулами, поступающими из эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи, образуя промежуточную фагосому. Образование промежуточной фагосомы представляет собой динамический процесс, включающий слияние эндоцитарных пузырьков и деление секреторных везикул, в результате чего происходит ремоделирование мембраны и прогрессирующее закисление фагосомы. Позже эта промежуточная фагосома превращается в микробицидную вакуоль, фаголизосому, сливаясь с лизосомами и изменяя свои мембранные и внутренние характеристики посредством процесса, называемого созреванием фаголизосом [129].

Макрофаги могут устранять *Mtb* с помощью нескольких механизмов, включая производство кислородных и азотных компонентов и цитокинов, подкисление фагосом и аутофагию внутриклеточного *Mtb* [62]. Распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) из *Mtb* (таких как гликолипиды, липопротеины и углеводы) макрофагами PRR (таких как TLR, NLR и CLR) вызывает сеть скоординированных сигнальных путей, что приводит к различным профилям экспрессии генов в макрофагах на разных стадиях инфекции [169].

Микобактерии поглощаются макрофагами с использованием некоторых или всех рецепторов комплемента, например, CR3, CR4 (оба интегрин) и CR1 (CD35) [58]. Бактерии распознают цепь CD11b гетеродимерной молекулы интегрин и связываются с ее лектинсвязывающим доменом в отсутствие белков комплемента. При этом микобактерии обходят эффективный окислительный всплеск в мембране макрофагов, избегая многих токсичных продуктов макрофагов.

1.3 Морфологические особенности печени новорожденных мышей и особенности изменения гистоархитектоники ткани печени в возрастном аспекте

Известно, что печень новорожденных мышей является функционально и морфологически незрелым органом и в процессе развития взросления претерпевает ряд изменений. При микроскопическом исследовании в первую очередь бросается отсутствие дольчатого строения. Сами гепатоциты располагаются рыхло и обособленно друг от друга. А отсутствие соединительнотканых волокон, большое количество экстрамедуллярных островков кроветворения и мегакариоцитов, также способствуют стиранию нормального дольчатого рисунка ткани. Сами гепатоциты имеют полигональную форму и имеют относительно большие размеры.

При переходе от внутриутробного существования к жизни во внешней среде у новорожденных появляется активное самостоятельное дыхание, и увеличение давления в портальной вене приводит к созданию разности давления, при котором кровь начинает двигаться от портальных трактов к центральным венам по более короткому пути и, тем самым, формируя «радиарный Рисунок» [29].

С возрастом при отсутствии патологии печени или любом другом системном заболевании островки экстрамедуллярного кроветворения и мегакариоциты прогрессивно уменьшаются в размере и исчезают. Начинают наблюдаться тонкие аргирофильные волокна в стенках сосудов и по ходу синусоидальных капилляров, а у более взрослых особей начинают появляться ретикулярные волокна. Сами гепатоциты под воздействием вышеперечисленных факторов, а также в результате внутриклеточного созревания, увеличиваются в размере, начинают располагаться плотнее, формируя тем самым клеточные тяжи.

Одной из главных особенностей гепатоцитов является их способность к полиплоидии, при которой в гепатоцитах появляется два и более ядра с полным набором хромосом. Данный биологический процесс является физиологическим и наблюдается у всех млекопитающих, в том числе у мышей и людей. Доля

многоядерных гепатоцитов в ткани печени увеличивается от постнатального периода на весь период жизни. Также полиплоидизация является явным признаком старения гепатоцита.

Основным механизмом формирования дву- и многоядерных гепатоцитов является угнетение цитокинеза во время деления клетки. Основным медиатором для остановки цитокинеза и образования двуядерного гепатоцита является инсулин, который передаёт сигнал через PI3K-Akt путь, приводящий к сбою формирования сократительного кольца. Помимо действия инсулина на формирование многоядерных гепатоцитов, также доказана роль белка p53, MicroRNA-122 противодействует экспрессии проcitoкинезных эффекторов Cux1, Rhoa, Mapre1, Iqgap1, Nedd4l и Slc25a34, TGFbeta. Факторы транскрипции E2F имеют решающее значение в полиплоидизации печени во время постнатального развития. Дефицит E2F8 индуцирует экспрессию генов-мишеней E2F, способствуя цитокинезу и предотвращая полиплоидизацию печени. Напротив, дефицит E2F1 ингибирует цитокинез и усиливает полиплоидизацию печени [81].

Предполагается, что полиплоидия способна защищать гепатоциты от токсического повреждения путем увеличения числа копий функциональных генов; это может быть особенно важно для печени, которая имеет основную функцию в метаболизме и устранении токсичных соединений. Также такой способ пролиферации является более энергоэффективным. Наконец, в полиплоидных клетках печени отмечается изменение спектра и объёма экспрессии некоторых генов [49].

Печень участвует в широком спектре деятельности, связанной с синтезом/секрецией белка, метаболизмом и детоксикацией. Полиплоидия может позволить в два или четыре раза увеличить экспрессию некоторых генов/белков и тем самым усилить определенные метаболические функции [66]. Экспрессия генов, активированных полиплоидией, влияет на все основные специфические функции печени, включая азотистый метаболизм, синтез белков крови, поддержание окислительно-восстановительного состояния, метаболизм ксенобиотиков. Также характерна тенденция при полиплоидии гепатоцитов к

увеличению получения АТФ из углеводов, а не из жирных кислот, тем самым переводя гепатоцит в условный режим энергетической экономии.

В условиях хронических воспалительных заболеваний печени, при которых наблюдаются дистрофия и некрозы гепатоцитов, происходит компенсаторная реакция в тканях в виде деления и увеличения количества ядер в гепатоцитах. И если учесть вышеизложенную информацию, то можно предположить, что такой процесс как полиплоидия позволяет защитить ещё неповреждённые гепатоциты от окислительного стресса и повреждения ДНК, а также взять на себя функцию некротизированных клеток, для сохранения функции печени.

В полностью сформированной печени выделяется функциональная единица, которая называется ацинус и представляет собой радиарные тяжи гепатоцитов, ограниченные двумя портальными трактами и портальной веной. В таком сформированном треугольнике выделяют 3 зоны: перипортальная, средняя и центральная. Учитывая направление тока и состав крови, гепатоциты и прочие клетки печени значительно различаются по функциональной нагрузке и морфологии.

Гепатоциты из перипортальной зоны получают кровь с большей концентрацией кислорода и, следовательно, их метаболическая и синтетическая нагрузка значительно выше, чем у гепатоцитов в центральной зоне. Так в перипортальных гепатоцитах наблюдается большее количество пероксисом, более выраженная активность цикла метаболизма мочевины, глюкозо-6-фосфатазы, содержание глутатиона и синтез гликогена. Глютаминсинтетаза синтезируется исключительно в центрлобулярных гепатоцитах, в то время как такие ферменты, как глюкокиназа, карбоксилэстераза синтезируются в перипортальных гепатоцитах [52].

Печень является самым крупным паренхиматозным органом, отвечающим за такие функции как метаболизм различных органических соединений, синтез и секрецию желчи, синтез белков крови и факторов свёртывания крови, а также учитывая, что в печени находится самый большой пул резидентных макрофагов и учитывая, что из-за особенностей кровоснабжения данного органа, печень

является ещё и барьерным иммунным органом [96].

1.3.1 Морфогенез и динамические изменения экстрамедуллярных островков кроветворения в печени

Во время внутриутробного развития плода печень является основным кроветворным органом и в основном участвует в эритропоэзе. Ранее было уточнили, что с точки зрения трехмерных поверхностных структур центральных макрофагов эритробластных островков в печени плода и взрослой селезеночной красной пульпы макрофаги играют важную роль как в формировании кроветворной ниши, так и в дифференцировке эритроида. Кроме того, макрофаги изменяли не только морфологию поверхности, но и антиген клеточной мембраны в ответ на изменения эритропоэтической активности.

В печени зародыша собственные предшественники кроветворных клеток не образуются. Кроветворение в ней начинается и поддерживается только за счет миграции клеток, приходящих из желточного мешка, АГМ и плаценты. В печени СКК не только самоподдерживаются и размножаются, но и впервые в эмбриогенезе образуют все типы кроветворных клеток красного и белого рядов. Таким образом, печень является основным кроветворным органом развивающегося плода и обеспечивает его потребность как в стволовых, так и в зрелых клетках крови, что становится особенно важным на тех стадиях развития, когда желточный мешок уже прекращает выполнять кроветворную функцию. В конце внутриутробного периода печень переключается на выполнение специфических функций, свойственных ей во взрослой жизни, а кроветворная активность в ней угасает. СКК при этом покидают печень и перемещаются в костный мозг, где к тому моменту уже складываются условия для их существования и самообновления. Попад в костный мозг, СКК прекращают интенсивно делиться и переходят в состояние покоя [59].

Очаги кроветворения в основном содержат многочисленные эритробласты и небольшое количество макрофагов. Мегакариоциты и несколько гранулоидных

кроветворных клеток также наблюдаются в очагах кроветворения. Печень плода содержит два вида макрофагов: синусоидальные макрофаги и центральные макрофаги эритробластных островов. Эти макрофаги демонстрируют схожий потенциал захвата патогенных микроорганизмов. Однако фетальные гепатоциты, по-видимому, не участвуют в активном фагоцитозе. В постнатальном периоде у мышей происходит заметное уменьшение количества эритробластных островков. Эритробласты покидают центральные макрофаги, а впоследствии эти макрофаги подвергаются дегенерации. Эритробластные острова окончательно исчезают в конце активного гемопоэза печени, а дегенерированные центральные макрофаги подвергаются фагоцитозу макрофагами-поглотителями в перизинусоидальном пространстве [172]. Макрофаги находятся в тесном контакте с эритробластами и образуют трехмерную сеть. На каждом эритробластном острове 2–3 лимфоцита также контактируют с макрофагами. Эритробласты, лимфоциты и макрофаги образуют тесные, прочные связи через свои цитоплазматические мембраны. Макрофаги экспрессируют JAG-1, который является основным лигандом пути передачи сигналов Notch в гемопоэзе [65]. В недавнем исследовании было доказано прямое влияние клеток Купфера на стволовые и недифференцированные кроветворные клетки в печени мышей путём секреции гемопоэтических факторов роста (SCF, IL-6 и IL-3). У мышей с активным воспалительным процессом кроветворные клетки устойчивы к апоптозу, что позволяет этим клеткам расти в органах, которые обычно не способствуют росту и дифференцировке гемопоэтических стволовых и прогениторных клеток. Кроме того, иммунные клетки значительно пролиферируют у этих мышей, производя большие объемы цитокинов, которые могут поддерживать рост кроветворных клеток-предшественников на периферии [124].

Микробные компоненты, такие как лиганды TLR, могут влиять на кроветворение как в костном мозге, так и в селезенке. Лиганды TLR, такие как липополисахариды (LPS, лиганд TLR2) и Pam3CSK4 (лиганд TLR4), могут непосредственно активировать кроветворные клетки-предшественники через свои рецепторы. Следовательно, дифференцировка предшественников в миелоидные

клетки, такие как макрофаги и дендритные клетки, значительно усиливается. Лиганды TLR могут превращать даже лимфоидных предшественников в миелоидные клетки. Таким образом, лиганды TLR являются эффективными регуляторами экстрамедуллярного кроветворения. Это говорит о том, что инфекция может существенно повлиять на кроветворение в костном мозге и периферических органах, таких как печень [178].

Функция лигандов TLR в регуляции кроветворения предполагает, что инфекция является важным элементом для возникновения экстрамедуллярных очагов кроветворения. В качестве примера было определено, что хронические гранулематозные инфекции увеличивают колониеобразующие единичные клетки или миелоидные предшественники в селезенке [110]. Воспалительная реакция у мышей BALB/c была выше, чем у мышей C57BL/6. Это может быть связано с меньшей способностью мышей BALB/c элиминировать патогены. Одним из механизмов повышения миелопоэтической активности, по-видимому, является производство GM-CSF и TNF- α ,³⁹, которые могут синергетически поддерживать рост и созревание миелоидных предшественников [73].

1.3.2 Функциональные особенности и происхождение клеток Купфера

Клетки Купфера являются резидентными макрофагами печени и располагаются по ходу синусоидных капилляров. Сами клетки имеют звёздчатую форму с нечёткой клеточной мембраной и множественными псевдоподиями, с помощью которых клетка улавливает инородные частицы в токе крови, а также удерживается, прикрепляясь к эндотелиоцитам [199]. При электронной микроскопии в этих клетках определяется большое количество лизосом и фаголизосом, а также хорошо развитый эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи и секреторные везикулы [16].

Долгое время считалось, что моноциты являются лишь промежуточным звеном в дифференцировке от промоноцитов в лимфоидных органах к макрофагам и дендритным клеткам в тканях при переходе из сосудистого русла в

ткани как при воспалении, так и для поддержания тканевого гомеостаза [196]. Однако современные исследования показывают и доказывают, что многие резидентные макрофаги, в особенности, такие как клетки Купфера, расположенные в печени, имеют своих собственных эмбриональных предшественников, а также способны к пролиферации, как во время воспалительного процесса, так и для поддержания популяции в ткани [188]. Своё развитие и появление у млекопитающих, в том числе у грызунов и людей, тканевые макрофаги берут ещё из желточного мешка в эмбриональный период и могут выполнять свою функцию ещё до появления островков кроветворения в печени и костном мозге [43]. Так при образовании фетальных макрофагов в желточном мешке, они попадают в системный кровоток и распределяются по внутренним органам плода на 9 дне эмбриогенеза, где в дальнейшем происходит их созревание и полная дифференцировка в резидентные макрофаги [149].

В полностью сформированной и зрелой печени клетки Купфера, как и сами гепатоциты функционально и морфологически различаются в зависимости, от локализации в зоне ацинуса. Так в перипортальной зоне количество резидентных макрофагов значительно больше, чем в остальных. Сами клетки имеют большие размеры, большее количество лизосом. Следовательно перипортальные клетки Купфера активнее совершают захват инородных тел и способны к более полному фагоцитозу [89].

Как и моноциты в крови, клетки Купфера на самом деле представляют собой гетерогенную группу клеток – CD68 и CD11b. В работе Kinoshita M. et al (2010) было показано, что у взрослых мышей линии C57Bl/6 в печени присутствовало 3 линии клеток Купфера – CD11b(–) CD68(+), CD11b(+) CD68(–) и CD11b(+) CD68(+). При количественном анализе CD68(+) были представлены в подавляющем большинстве и показали выраженную фагоцитарную активность, в то время как клеток CD11b(+) было примерно в половину меньше, и они показали менее выраженную фагоцитарную активность, но, напротив, показали более выраженную способность к секреции цитокинов, в особенности TNF и IL-12. Позже была выделена ещё одна группа резидентных

макрофагов печени – CD32(+), морфологически они были идентичны клеткам CD68(+), более чем у половины данных клеток наблюдалась коэксперсия CD68, и в эксперименте было показано, что они обладали практически идентичной фагоцитарной способностью, но значительно хуже осуществляли бактерицидный эффект. А факт, что при начале острого инфекционного процесса количество клеток CD68(+) увеличивалось, а количество клеток CD32(+) уменьшалось, указывает на то, что популяция клеток CD32 являются предшественниками клеток CD68 [78].

1.4.1 Механизмы репаративной функции гепатоцитов

Процесс регенерации нормальной, здоровой печени зависит в основном от пролиферации, роста и запрограммированной гибели клеток гепатоцитов. Проллиферация и рост клеток регулируются главным образом IL-6/Jak/STAT3 и PI3-K/PDK1/Akt путями. Путь IL-6/Jak/STAT3 регулирует пролиферацию гепатоцитов и защищает от гибели клеток и окислительного стресса. Путь PI3-K/PDK1/Akt в первую очередь отвечает за регуляцию размера клеток, посылая митотические сигналы в дополнение к «выживанию», антиапоптотическим и антиоксидантным сигналам [142, 157].

Клетки Купфера принимают активное участие в регулировании процесса регенерации ткани печени. Так, высвобождение TNF- α клетками Купфера может увеличить экспрессию IL-6, дополнительно индуцируя переход клеток печени из фазы G0 в фазу G1 и способствуя пролиферации гепатоцитов. Также во многих экспериментах было показано, что при нокаутировании клеток Купфера и повреждении гепатоцитов, скорость восстановления ткани печени существенно замедлялась [88].

Процесс регенерации печени можно разделить на три стадии: инициация, пролиферация и завершение, при этом различные молекулы участвуют в различных стадиях. IL-6 может не только защитить функцию печени, но и способствовать регенерации печени. Во время повреждения гепатоцитов

стимулируются клетки Купфера, которые активируют сигнальный путь ядерного фактора каппа-В (NF- κ B) и переносят его из цитоплазмы в ядро. Активированный NF- κ B затем заставляет клетки Купфера секретировать больше IL-6 и TNF- α . IL-6 путем связывания с рецептором IL-6 (IL-6R) образует комплекс IL-6/IL-6R, и комплекс активирует рецепторный белок, называемый гликопротеином 130 кДа, который активирует два пути: JAK/STAT и путь MEK/Erk. Известно, что JAK/STAT является жизненно важным преобразующим сигналом, связанным с регуляцией роста, выживаемостью, дифференцировкой и устойчивостью к патогенам [53].

1.4.2 Механизмы и особенности фибропластических процессов в печени мышей в условиях гранулематозного воспаления

По мере созревания гранулём могут происходить такие структурные изменения в тканях, как фиброз. Фиброз в результате нерегулируемого воспаления может привести к выраженной хронической недостаточности органов [82].

Фибробласты синтезируют компоненты внеклеточного матрикса преимущественно в ответ на экспрессию таких цитокинов как TGF- β 1 или IL-4/IL-13. Каждый из этих цитокинов может продуцироваться отдельными составляющими гранулём и прочими иммунными клетками: моноцитами, резидентными макрофагами, CD4⁺, CD8⁺ Т-клетками. IL-13 является основным цитокином, отвечающим за фиброз, тогда как IL-4 играет вспомогательную роль [107, 201]. IL-13 напрямую сигнализирует фибробластам синтезировать коллаген [113]. Th2-клетки являются основным источником IL-13. Наивные лимфоидные клетки 2-го типа и, возможно, эозинофилы являются дополнительными источниками IL-13 [108, 201]. В то время как макрофаги непосредственно сигнализируют фибробластам в реакциях, окружающих инородные тела и инфекционные патогены. Имеются данные о том, что они специфически рекрутируют Th2-клетки, продуцирующие IL-13 [70]. IL-13 способствует синтезу

коллагена в фибробластах, индуцируя экспрессию аргиназы, которая помогает превращать L-аргинин в пролин, строительный блок коллагена [77, 82]. IL-13 также индуцирует аргиназу в макрофагах, а аргиназа макрофагов фактически подавляет развитие фиброза, возможно, путем регуляции антиген-специфического Т-клеточного ответа [51]. Более того, IL-13 может рекрутировать популяции макрофагов, которые ослабляют патологические Th2-ответы, в том числе вызывающие фиброз.

Звездчатые клетки располагаются в пространстве Диссе – занимают пространство между эндотелиальными клетками гепатоцитами, составляют примерно 5–8 % от всех клеток печени и их наибольшая концентрация наблюдается рядом с центральной веной [101].

Клетки Ито имеют звёздчатую форму с множественными расширенными цитоплазматическими отростками и овальным или эллипсоидным ядром, умеренно развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум, редуцированный перинуклеарный комплекс Гольджи и вариабельные цитоплазматические отложения витамина А. Субэндотелиальные цитоплазматические расширения располагаются в перисинусоидальном пространстве, между эндотелием и гепатоцитами [63]. На поверхности из этих клеточных выступов имеются многочисленные шипики, участвующие в рецепции сигналов, способные индуцировать стимуляцию сократительной системы. Тесный контакт с эндотелием, с одной стороны, и гепатоцитами, с другой стороны, поддерживают теоретическую роль в облегчении транспорта медиаторов или цитокинов [141].

Способность микобактерий индуцировать экспрессию MMP9 имеет особое значение для образования гранулёмы. Было показано, что микобактерии повышают экспрессию MMP9 в эпителиоидных клетках, окружающих гранулёму, через ESAT6 [194]. Это повышение регуляции является критическим сигналом для рекрутирования моноцитов к местам инфекции из кровеносных сосудов и, следовательно, для поддержания микобактериальной инфекции.

1.5 Особенности гранулематозного воспалительного процесса у детей и новорожденных

У недоношенных детей иммунная регуляция значительно отличается от таковой при сравнении с доношенными детьми и взрослыми. Для иммунной защиты недоношенный ребенок полагается на неспецифический врожденный иммунитет, в то время как Т-клеточные реакции, включая те Т-хелперы, которые противопоставляют воспаление, например, регуляторные Т-клетки, может быть менее функциональным. Следовательно, провоспалительные цитокиновые реакции (например, интерлейкин (IL)-1, IL-6, IL-8, фактор некроза опухоли (TNF)-α) и другие связанные с воспалением белки (например, С-реактивный белок (CRP), межклеточная молекула клеточной адгезии (ICAM)-1, эритропоэтин, ферритин) чрезмерно экспрессируются и недостаточно сбалансированы иммуносупрессивными элементами (например, IL-10, S100 A8/9, миелоидными супрессорными клетками, Т-клетками-субпрессивами, Т-образными и недостаточно сбалансированными иммуносупрессивными элементами (например, IL-10, S100 A8/9, миелоидными супрессорными клетками, Т-клетками-супрессорами [166].

Гранулематозный гепатит у детей, больных саркоидозом наблюдается крайне редко, а в самих гранулёмах отсутствуют фокусы некроза. Макрофаги, несущие повышенную экспрессию основных молекул класса гистосовместимости (МНС) II, скорее всего, инициируют воспалительную реакцию саркоидоза, представляя неидентифицированный антиген к CD4 + Th (хелпер-индуктор) лимфоцитам. Стойкий, плохо разлагаемый антигеном клеточный опосредованный иммунный ответ приводит к цитокиновому каскаду, образованию гранулёмы и, в конечном итоге, к фиброзу [176].

У новорожденных и детей гранулематозные заболевания встречаются редко, а при некоторых инфекционных заболеваниях, для которых характерно гранулематозное воспаление, в том числе и при туберкулёзе, нет достаточно убедительных литературных данных, описывающих отличительные морфологические особенности гранулём в сравнении с взрослыми [71, 72, 98].

В литературе подробно описаны иммунологические механизмы, которые обуславливают особенности развития гранулематозных заболеваний у новорожденных [128, 151]. Однако, практически отсутствуют данные, касающиеся изучения морфологических особенностей, формирующихся при инфицировании микобактериями туберкулёза в печени новорожденных, и его осложнений.

1.6 Способы коррекции и лечения туберкулёза

Туберкулёз легких у беременных и новорожденных лечат четырьмя препаратами (изониазид, рифампицин, пиразинамид и этамбутол) перорально ежедневно в течение 2 месяцев с последующим приемом трех препаратов (изониазид, рифампицин и этамбутол) перорально ежедневно в течение 4 месяцев. Лекарственно-устойчивый туберкулёз лечится препаратами второй линии с осторожностью, так как некоторые из этих препаратов являются тератогенными. Оптимальный дородовой уход и диетотерапия наряду с противотуберкулёзными препаратами обеспечивают оптимальный материнский и перинатальный исход.

Состояние гранулёмы также влияет на активность и концентрацию различных антибиотиков независимо от бактериального состояния. Это было впервые признано для антибиотика первой линии пиразинамида, который является решающим агентом для сокращения продолжительности лечения туберкулёза до 6 месяцев. Различные препараты не имеют одинакового доступа ко всем гранулёмам туберкулёза. Пиразинамид активен только в кислых условиях и, таким образом, считается особенно полезным против бактерий в очагах дистрофии и некроза тканей. Моксифлоксацин плохо диффундирует в массы казеозного некроза, тогда как другие препараты, такие как рифампицин, эффективно проникает во все гранулёмы. Таким образом, различия в судьбе и анатомии гранулёмы могут привести к неравномерной доставке лекарств и, как минимум, обеспечить основу для построения схем лечения, которые являются более эффективными и лучше защищены от возникновения лекарственной устойчивости [185].

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

Эксперимент проводился на 200 новорожденных мышах линии C57Bl/6 массой $(0,86 \pm 0,07)$ г. Половозрелые самцы и самки были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск).

Содержание животных осуществлялось в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях».

Эксперимент выполнен на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

В пластмассовых клетках содержали по 5 особей: 1 самец и 4 самки при свободном доступе к корму и воде. Длительность светового дня составляла 12 часов. Ежедневно определяли начало беременности. Со дня обнаружения во влагалище копулятивной пробки, после чего мыши-самки перемещались в отдельные клетки. Все манипуляции с инфицированными животными, органами, тканями проводились в боксе с активной вентиляцией.

2.2 Дизайн экспериментальных исследований

Мышей разделили на 4 группы: мышам из 1-й (интактной) группы интраперитонеально вводили 0,02 мл/кг 0,9 % раствор натрия хлорида в первые сутки после рождения. Мышам из 2-й (ОД) группы вводили на 2-е сутки после рождения интраперитонеально раствор окисленного декстрана молекулярной массой 40 кДа (Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск). Мышам из 3-й (БЦЖ) группы в первые сутки жизни интраперитонеально вводили раствор вакцины БЦЖ 0,02 мл/кг. Мышам 4-й (БЦЖ + ОД) группы вводили интраперитонеально раствор вакцины

БЦЖ 0,02 мг/кг, на вторые сутки с момента рождения вводили интраперитонеально раствор ОД 40 кДа.

Для получения образцов печени осуществлялась эвтаназия мышей линии С57Bl/6 путем дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Образцы печени забирали на 3-и, 5-е, 10-е, 28-е и 56-е сутки от начала эксперимента, фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина, подвергали стандартной проводке через спирты с повышением концентрации, после чего материал заливали парафином. Серийные срезы толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином методом по Ван-Гизону и методом импрегнации серебром.

2.3 Методы оценки и оборудование

При морфологическом исследовании измерялась масса (г) мышей линии С57Bl/6 на 1-е сутки рождения и в каждую точку эксперимента: 3-и, 5-е, 10-е, 28-е и 56-е сутки после рождения.

Морфологические и морфометрические исследования проводили на микроскопе ZEISS Primo Star (Германия).

Морфометрию гранулём выполняли в соответствии с ранее разработанными морфометрическими методами и критериями. При помощи окуляр-микрометра измеряли диаметры гранулём (мкм). При помощи морфометрической сетки, вставленной в окуляр, подсчитывали численную плотность (N_{ai}) гранулём в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²).

Для оценки фибропластического процесса в условиях гранулематозного гепатита в возрастном аспекте подсчитывалась плотность (V_v) ретикулярных и коллагеновых соединительнотканых волокон в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²).

Для оценки дистрофии и некрозов гепатоцитов подсчитывали объёмную плотность (V_v) паренхимы печени, дистрофически измененных гепатоцитов, очагов некрозов гепатоцитов. Также при применении иммуногистохимического метода исследования подсчитывалась численная плотность (N_{ai}) позитивно

окрашенных ядер гепатоцитов при окраске антителом р53.

С целью оценки внутриклеточной регенерации ткани печени подсчитывали численную плотность (N_{ai}) митозов в гепатоцитах, двуюдерных гепатоцитов в тестовой площади. При применении иммуногистохимического метода исследования подсчитывалась численная плотность (N_{ai}) позитивно окрашенных ядер гепатоцитов при окраске антителом Ki-67.

В печени подсчитывали численную плотность (N_{ai}) очагов экстрамедуллярного кроветворения и мегакариоцитов для оценки реактивных изменений в ткани в условиях введения вакцины БЦЖ и коррекции состояния введением окисленного декстрана.

Величины исследуемых параметров рассчитывали по формулам, приведенным ниже, используя данные, полученные в процессе морфометрического исследования препаратов печени.

Объемная плотность структур:

$$V_{Vi} = P_i / P_t$$

где P_i – количество точек тестовой системы, попавших на профиль исследуемой структуры;

P_t – общее количество точек открытой тестовой системы, попавших на профиль среза всего исследуемого объекта.

Численная плотность профилей структур в тестовой площади:

$$N_{ai} = N_{ti} / A_t$$

где N_{ti} – количество исследуемых структур, попавших в тестовую площадь A_t .

2.3.1 Электронная микроскопия клетки Купфера

Подготовка материала к изучению методами электронной микроскопии.

Для электронномикроскопического исследования образцы печени объёмом 1 мм³ в количестве 2-3 от одного животного фиксировали в растворе параформа при температуре 4 °С, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в эпоксидные смолы с использованием компонентов из набора SPI-PON 812 KIT (фирма «SIGMA chemical company», Швеция). Полученные с готовых блоков эпоксидные срезы толщиной 1 мкм окрашивали (при нагревании) 1 % раствором метиленового голубого в 1 % растворе тетрабората натрия. Изучали под световым микроскопом и выбирали необходимые участки для исследования под электронным микроскопом. Из отобранного материала получали ультратонкие срезы толщиной 35–45 нм, изготовленные на ультрамикротоме (LKB-Nova, Швеция), последовательно контрастировали в насыщенных водных растворах ацетата уранила и цитрата свинца.

2.3.2 Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку данных морфометрического исследования проводили с использованием лицензионного пакета программ прикладной статистики «Microsoft Excel 2016» с определением средней величины (M), стандартной ошибки среднего (m). Характеристики выборок приведены как ($M \pm m$). Достоверность статистически значимых различий средних величин в сравниваемых группах рассчитывали по t -критерию Стьюдента для независимых выборок. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Морфологические и морфометрические изменения у новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза

3.1.1 Динамика изменения массы новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза

Средняя масса мышей линии C57Bl/6 при рождении составляла $(0,86 \pm 0,07)$ г. Начиная с 3-х суток эксперимента наблюдается двукратная разница в массе между мышатами из 1-й (NaCl) группы и 3-й (БЦЖ) группы с сохраняющейся тенденцией вплоть до 10-х суток эксперимента (Таблица 1).

Таблица 1 – Масса печени (г) новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента

Группы	Периоды наблюдения		
	3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	$3,51 \pm 0,21$	$5,18 \pm 0,81$	$9,11 \pm 0,13$
3-я (БЦЖ) группа	$1,81 \pm 0,47^*$	$3,1 \pm 0,68^*$	$5,54 \pm 0,9^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).			

При введении вакцины БЦЖ в брюшную полость наблюдается достоверная разница в массе тела с 3-х по 10-е сутки жизни, при сравнении с массой мышей из 1-й (NaCl) группы.

Такая картина вызвана вероятнее всего острым повреждением печени и интоксикацией организма при попадании микобактерий в брюшную полость и последующим персистированием микроорганизмов в гранулёмах.

3.1.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 с 3-х по 10-е сутки эксперимента

При морфометрическом изучении образцов печени мышей линии C57Bl/6, которым вводили интраперитонеально вакцину БЦЖ на 1-е сутки с момента рождения, отмечается появления гранулём только на 10-е сутки эксперимента. Эти гранулёмы встречались преимущественно вокруг крупных сосудов и имели преимущественно макрофагальное строение (Рисунок 1).

При оценке изменений в клетках Купфера у мышей из 3-й (БЦЖ) группы на 5-е сутки эксперимента наблюдалось увеличенное количество вакуолей, а также определялись вторичные вакуоли, содержащие *M. tuberculosis* (Рисунок 2).

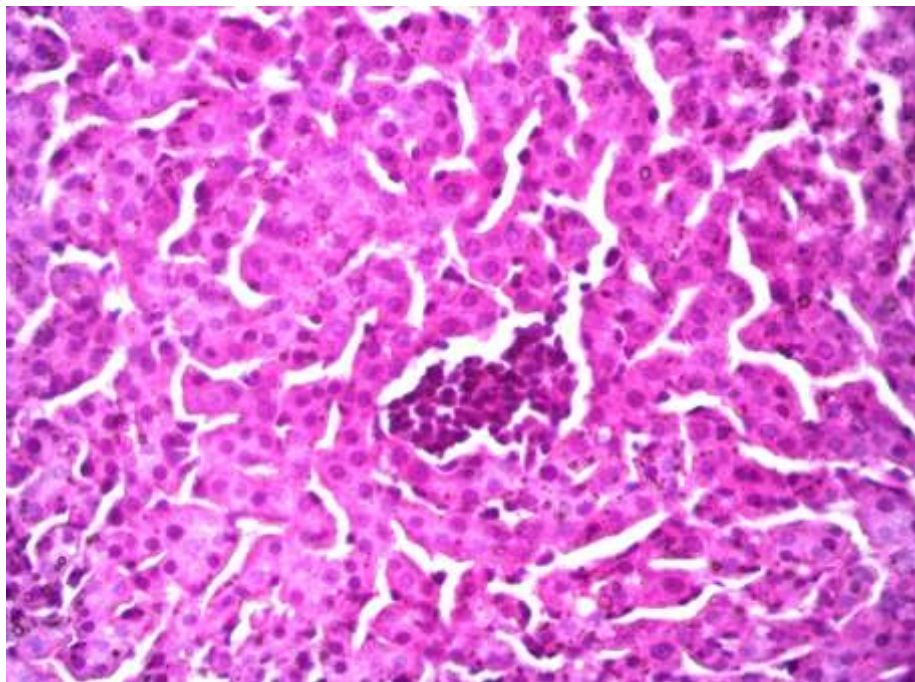


Рисунок 1 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки эксперимента. Определяется небольшая гранулёма в толще паренхимы печени. Сама гранулёма имеет преимущественно макрофагальное строение. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 400$

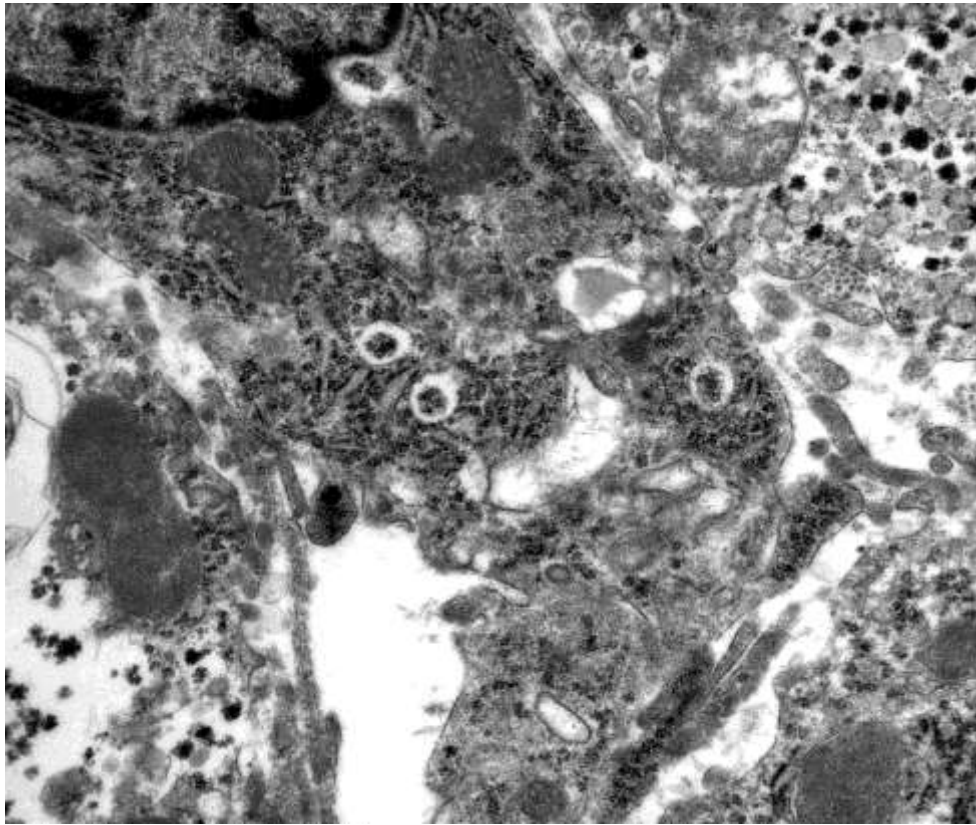


Рисунок 2 – Клетка Купфера мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 5-е сутки эксперимента. Определяется большое количество вакуолей и фаголизосомы, содержащие *M. tuberculosis*. Электронная микроскопия.

Увеличение $\times 10\,000$

Отсроченное появление гранулём (на 10-е сутки) после введения на первые сутки жизни вакцины БЦЖ, вероятно, обусловлено с незрелостью макрофагального звена иммунной системы у новорожденных мышей линии C57Bl/6 и персистенцией возбудителя в клетках Купфера. Ранее была продемонстрирована способность возбудителей сохраняться в вакуолярном аппарате клеток Купфера в течение 40 дней: в фагосомах клеток Купфера определялись клетки гриба у 2-месячных мышей линии C57Bl/6, инфицированных внутриутробно *C. albicans* [19]. Вероятно, что *M. tuberculosis* персистируют в клетках Купфера без образования гранулём. По достижении зрелости тканей и систем мышей к 10-м суткам начинается формирование гранулём. Данное отсроченное формирование гранулём можно объяснить тем, что

у новорожденных резидентные макрофаги обладают сниженной экспрессией мембранных белков и рецепторов, что приводит к сниженной антигенпрезентирующей функции этих клеток, а также характерна пониженная экспрессия комплекса мембранной атаки-1 и L-селектина, что приводит к снижению адгезии и инфильтрации к очагу воспаления [171]. Неонатальные макрофаги экспрессируют сниженное количество HLA-DR и CD80, что приводит к нарушению презентации антигенов, включая молекулы патогенного происхождения.

Также несмотря на то, что стимуляция с помощью ЛПС усиливает экспрессию TLR4, наряду с секрецией TNF- α , IL-6 и IL-10 неонатальными макрофагами, нисходящие сигнальные пути TLR4 нарушаются, о чем свидетельствует снижение фосфорилирования NF- κ B-p65 и p38, и это объясняет общее снижение цитокиновых реакций по сравнению со взрослыми клетками. По сравнению со своими взрослыми аналогами, неонатальные макрофаги имеют повышенную цитоплазматическую вакуолизацию и сниженную экспрессию CD11b, CD14 и F4/80. Тем не менее, при столкновении с патогеном они производят обильное количество IL-6 и CCL2/3/4. Учитывая ингибирующее действие IL-6 на нейтрофильную реакцию, повышенное соотношение IL-6/TNF- α в неонатальной периферической крови приводит к снижению нейтрофильной миграции к участкам воспаления.

Кроме того, полный фагоцитоз *M. tuberculosis* резидентными и рекрутированными макрофагами затруднён, а у новорожденных мышей с дефицитом массы тела и невозможен [115]. Микобактерия туберкулёза и родственные виды, такие как *M. marinum*, предотвращают нормальное формирование фоголизосом. Несколько эффекторов позволяют Mtb модулировать созревание фagosом, подрывая нормальную антимикробную способность лизосомального аппарата.

Одним из наиболее важных механизмов бактериальной персистенции в макрофаге является система секреции Mtb ESX-1 типа VII. ESX-1 выделяет ряд эффекторов, включая гетеродимер, состоящий из EsxA/ESAT-6 и EsxB/CFP-10.

EsxA участвует в разрыве мембраны фагосомы. Повреждение фагосомы Mtb имеет решающее значение для выживания, а также провоцирует реакцию дальнейшую воспалительную макроорганизма. ESX-1-зависимое повреждение мембраны происходит на ранней стадии после поглощения микобактерий, и цитозольные рецепторы макрофага обнаруживают бактериальные продукты и реагируют в течение первых часов после заражения. Микобактерия туберкулёза воздействует на белки группы RAB, чтобы микобактериальная фагосома максимально долго сохранялась и не трансформировалась в фаголизосому при слиянии с лизосомами макрофагов [195, 200].

3.1.3 Деструктивные изменения в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза

При морфологическом изучении образцов печени мышей линии C57Bl/6 3-й (БЦЖ) группы, начиная с 3-х суток эксперимента, наблюдались обширные поля дистрофически изменённых гепатоцитов в виде крупновакуольной дистрофии. Гепатоциты были резко увеличены в размере, округлой формы. Ядра были сморщены и расположены центрально, а цитоплазма имела бледно-розовый окрас или характеризовалась в виде «оптической пустоты» (Рисунок 2). В течение эксперимента до 10-х суток характер дистрофических изменений сменился с обширных полей на очаговый характер, а крупновакулярная дистрофия сменилась на преимущественно мелкокапельную вакуольную дистрофию (Рисунки 3 и 4). Мелкие очаги некрозов гепатоцитов были характерны только на 3-и сутки эксперимента у мышей после введения вакцины БЦЖ (Таблица 2).

Деструктивные изменения (дистрофические изменения и некроз гепатоцитов) в паренхиме печени связаны с токсическим воздействием микобактерий и замедленным процессом формирования гранулём [184]. Так в исследовании наблюдается обратная пропорциональная связь – при появлении гранулём выраженность дистрофии и некрозов гепатоцитов прогрессивно снижается. Это связано с тем, что персистирующие микобактерии захватываются

макрофагами и концентрируются в гранулёмах, ограничивая токсическое воздействие микобактерий на гепатоциты.

Таблица 2 – Объёмная плотность (Vv) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (Vv)	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Дистрофически измененные гепатоциты	$7,48 \pm 0,32$	$4,01 \pm 0,27$	$3,27 \pm 0,31$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,7 \pm 0,27$	$0,2 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$
3-я (БЦЖ) группа	Дистрофически измененные гепатоциты	$22,2 \pm 0,58^*$	$34,26 \pm 0,59^*$	$41,24 \pm 0,93^*$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$4,84 \pm 0,13^*$	$0,24 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,04$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).				

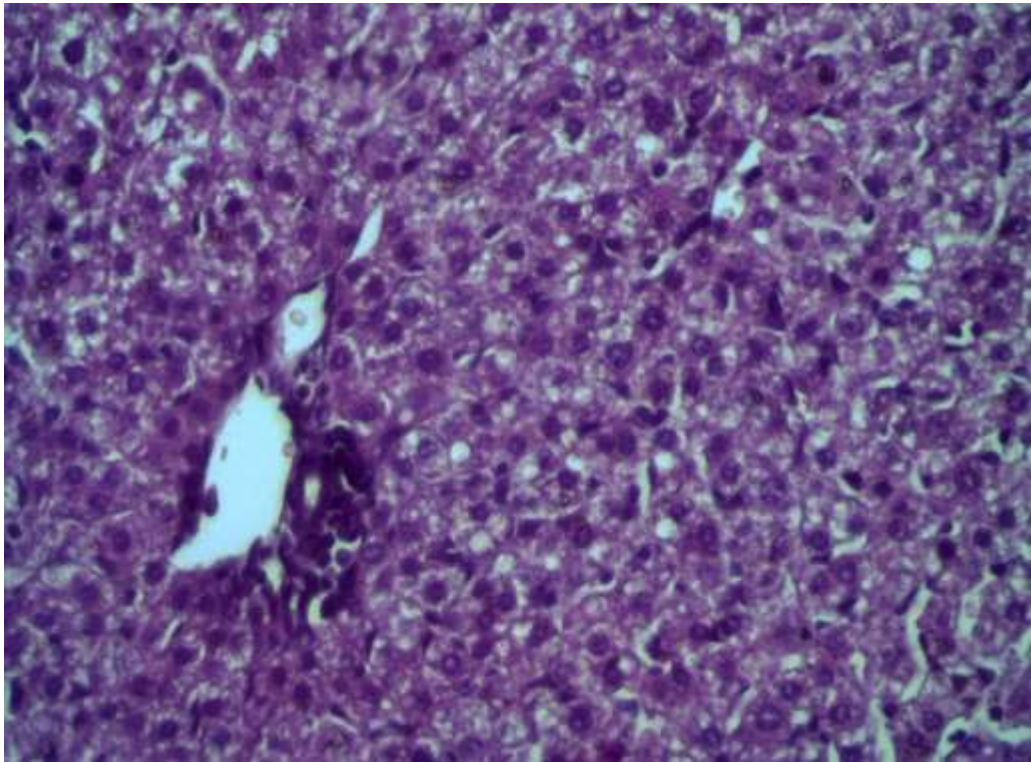


Рисунок 3 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 3-и сутки эксперимента. Диффузная крупнокапельная вакуолярная дистрофия и некроз гепатоцитов. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 200$

3.1.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени новорожденных мышей линии C57Bl/6

У мышей, инфицированных микобактериями, которые содержались в вакцине БЦЖ, наблюдается большее количество (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения на 5-е сутки эксперимента и прогрессивно снижение к 10-м суткам эксперимента (Рисунки 4 и 5). В то время как в 1-й (NaCl) группе снижение объёмной плотности (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения более плавное и островки на 10-е сутки эксперимента встречались уже достаточно редко. Но при этом численная плотность (N_{ai}) Мегакариоцитов на всём отрезке эксперимента между опытной и контрольной группой достоверно не различалась и рассматривается как вариант нормы (Таблица 3). Объёмная плотность (V_v) экстрамедуллярных очагов кроветворения прогрессивно

снижается, что соответствует варианту нормы, но при сравнении с контрольной группой на 3-и и 5-е сутки эксперимента объёмная плотность больше в экспериментальной группе на 17,17 % и 58,23 % соответственно.

Таблица 3 – Объёмная плотность (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения и численная плотность (N_{ai}) мегакариоцитов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$15,31 \pm 1,57$	$6,09 \pm 0,19$	$2,32 \pm 0,13$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,56 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,03$
3-я (БЦЖ) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$24,52 \pm 0,29^*$	$16,56 \pm 0,24^*$	$3,24 \pm 0,12$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,4 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,03$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).				

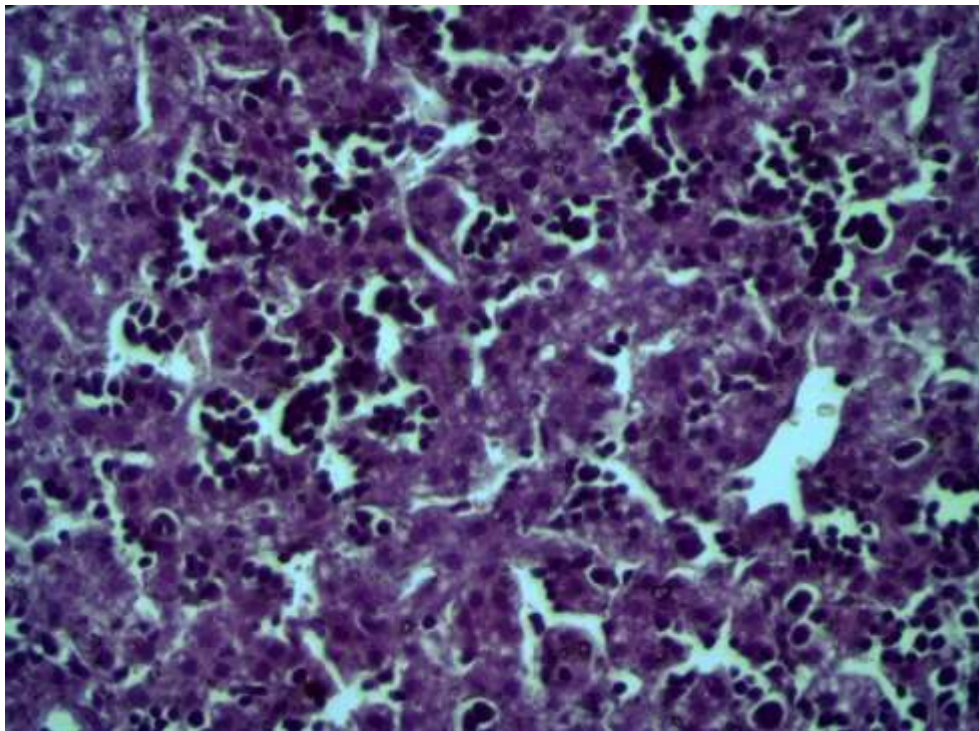


Рисунок 4 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 3-и сутки эксперимента. Определяется большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения и частые мегакариоциты.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

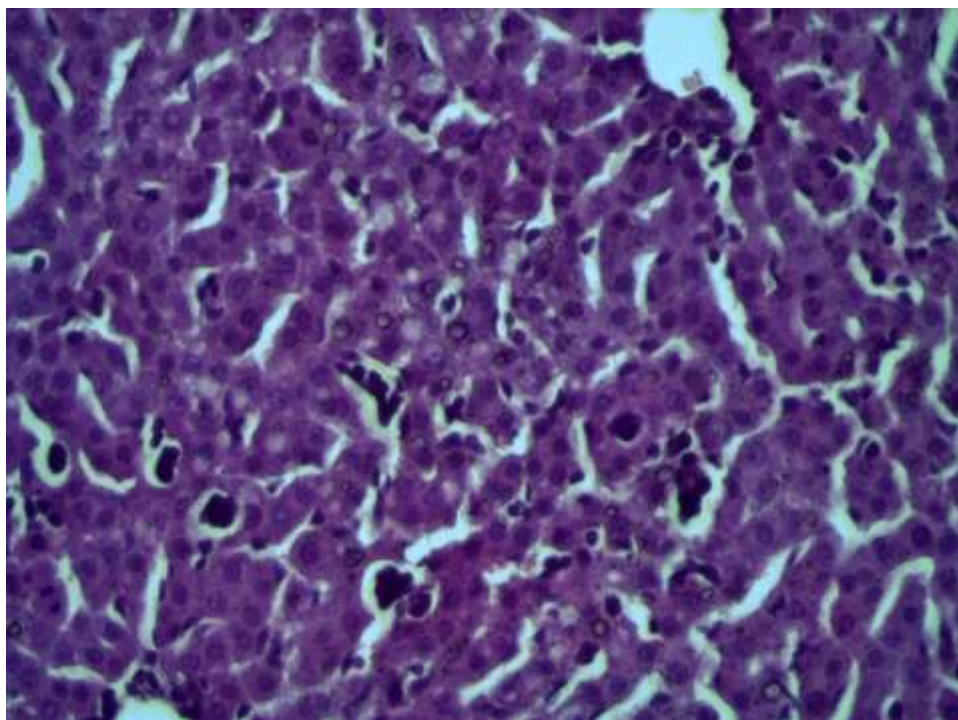


Рисунок 5 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки эксперимента. Очаги экстрамедуллярного кроветворения встречаются редко и имеют малые размеры. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

Длительное существование экстрамедуллярных очагов кроветворения при гранулематозном воспалении можно объяснить тем, что происходит активное поддержание процесса гемопоэза из-за незрелости костного мозга у новорожденных, а также с вовлечением миелоидных клеток в ответную воспалительную реакцию, вероятно, в том числе и вследствие недостаточного количества клеток Купфера и циркулирующих моноцитов [187]. Клетки Купфера способны оказывать прямое влияние на стволовые и недифференцированные кроветворные клетки в печени мышей путём секреции гемопоэтических факторов роста (SCF, IL-6 и IL-3) [125]. Клетки Купфера способствуют поддержке пролиферации стволовых клеток печени, которые дифференцируются в лимфоциты. Клетки Купфера секретируют IL-3, IL-6 и SCF, которые стимулируют пролиферацию стволовых. Также клетки Купфера способствуют кроветворению и лимфогенезу в печени посредством взаимодействия ICAM-1 и LFA-1.

У мышей с активным воспалительным процессом кроветворные клетки устойчивы к апоптозу, что позволяет этим клеткам расти в органах, которые обычно не способствуют росту и дифференцировке гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, иммунные клетки значительно пролиферируют у этих мышей, производя большие объемы цитокинов, которые могут поддерживать рост кроветворных клеток-предшественников на периферии [119]. Микробные компоненты, такие как лиганды TLR, могут влиять на кроветворение как в костном мозге, так и в селезенке. Лиганды TLR, такие как липополисахариды (лиганд TLR2) и Pam3CSK4 (лиганд TLR4), могут непосредственно активировать кроветворные клетки-предшественники через свои рецепторы, следовательно, дифференцировка предшественников в миелоидные клетки, такие как макрофаги и дендритные клетки.

3.1.5 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 3-х по 10-е сутки эксперимента

При микроскопическом исследовании образцов печени мышей линии C57Bl/6 из 3-й (БЦЖ) группы с 3-х по 10-е сутки эксперимента признаки репаративной регенерации гепатоцитов, которые принимались за численную плотность (N_{ai}) фигур митозов и гепатоцитов с 2 ядрами, достоверно не отличалась при сравнении с этими показателями из 1-й (NaCl) группы (Таблица 4). Однако при применении дополнительной иммуногистохимической окраски выявлено увеличение численной плотности (N_{ai}) гепатоцитов с позитивной экспрессией Ki-67 у новорожденных мышей в отрезке с 3-го по 10-й день эксперимента на всём протяжении в 10 раз.

Таблица 4 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии Ki-67 в ядрах гепатоцитов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группа	Исследованные параметры (N_{ai})	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Митозы в гепатоцитах	0	$0,09 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,03$
	Двуядерные гепатоциты	$0,15 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,03$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,38 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,10$
3-я (БЦЖ) группа	Митозы в гепатоцитах	0	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
	Двуядерные гепатоциты	$0,1 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,02$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,81 \pm 0,12^*$	$0,94 \pm 0,15^*$	$1,13 \pm 0,06^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).				

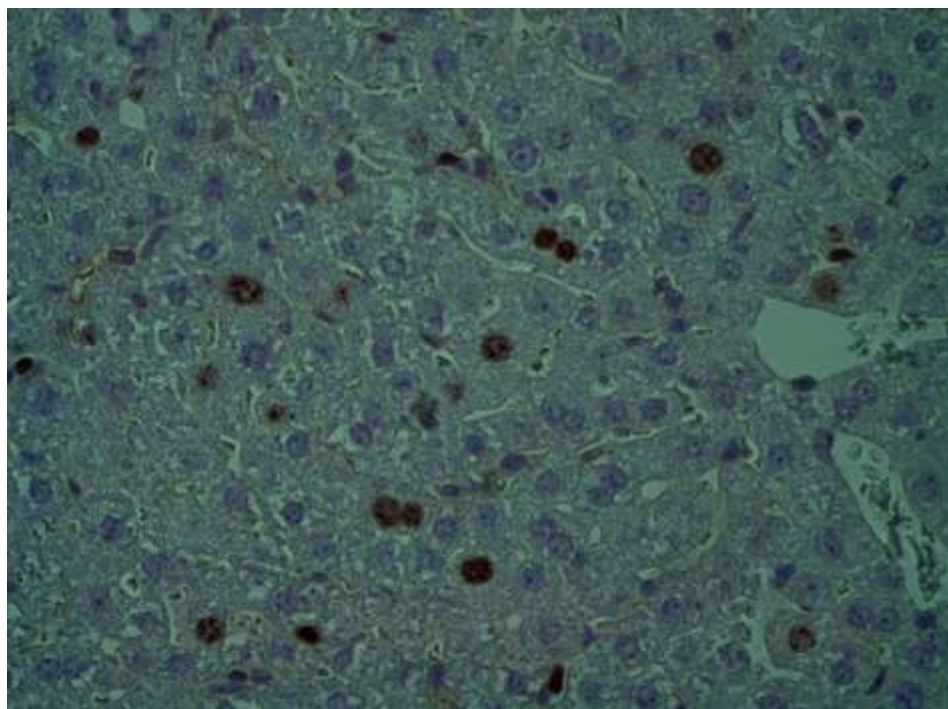


Рисунок 6 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 10-е сутки эксперимента. Гепатоциты с позитивной экспрессией Ki-67. Иммуногистохимическая окраска с применением моноклонального антитела Ki-67. Увеличение $\times 400$

Известно, что высвобождение TNF- α клетками Купфера может увеличить экспрессию IL-6, дополнительно индуцируя переход клеток печени из фазы G0 в фазу G1 и способствуя пролиферации гепатоцитов [84]. Также было показано, что при выключении клеток Купфера и повреждении гепатоцитов скорость восстановления ткани печени существенно замедлялась [88]. Впоследствии происходит токсическое накопление N-ацетил-бензохинонеймина, приводящее к образованию радикалов и активации клеток Купфера. Системное проявление гепатотоксичности ацетаминофена, как полагают, опосредовано провоспалительными цитокинами и врожденной иммунной системой. Начало регенерации печени обусловлено врожденной иммунной системой и высвобождением цитокинов. TNF, NF κ B и IL-6 являются важными медиаторами, которые приводят к активации STAT3 в гепатоцитах. TNF связывается с рецептором TNF 1 на непаренхимальных клетках, в первую очередь на клетках Купфера. Это приводит к активации NF κ B и производству IL-6. IL-6 действует на

гепатоциты через рецептор IL-6, активируя STAT3 и внеклеточных сигнальных киназ 1 и 2 (ERK1/2) путей. Липополисахарид, C3a и C5a, все компоненты врожденной иммунной системы, связываются с соответствующими рецепторами на клетках Купфера, вызывая регенерацию печени. IL-6 имеет несколько функций во время регенерации печени, включая его роль в острой фазе ответа, гепатопротектории и митогенезе. После связывания IL-6 с его рецептором на гепатоцитах активируется субъединица gp130, что приводит к активности тирозинкиназы. Это приводит к активации и димеризации STAT3, что позволяет транслоцироваться в ядро, где он активирует транскрипцию генов-мишеней. Фактор стволовых клеток (SCM) и онкостатин М (OCM) модулируют и усиливают эффекты IL-6 путем активации STAT3.

3.1.6 Особенности фибропластических процессов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза

При импрегнации серебром ретикулярные волокна в печени были обнаружены с 3-х суток эксперимента в опытной группе в составе стенок сосудов. К 10-м суткам эксперимента морфологическая картина была идентичная и ретикулярные волокна соединительной ткани также были представлены в стенках сосудов и виде единичных, слепо заканчивающихся нитей (Рисунок 7).

При окраске по Ван-Гизону коллагеновые волокна соединительной ткани выявляются на 10-е сутки эксперимента в опытной группе (БЦЖ) в составе стенок крупных сосудов.

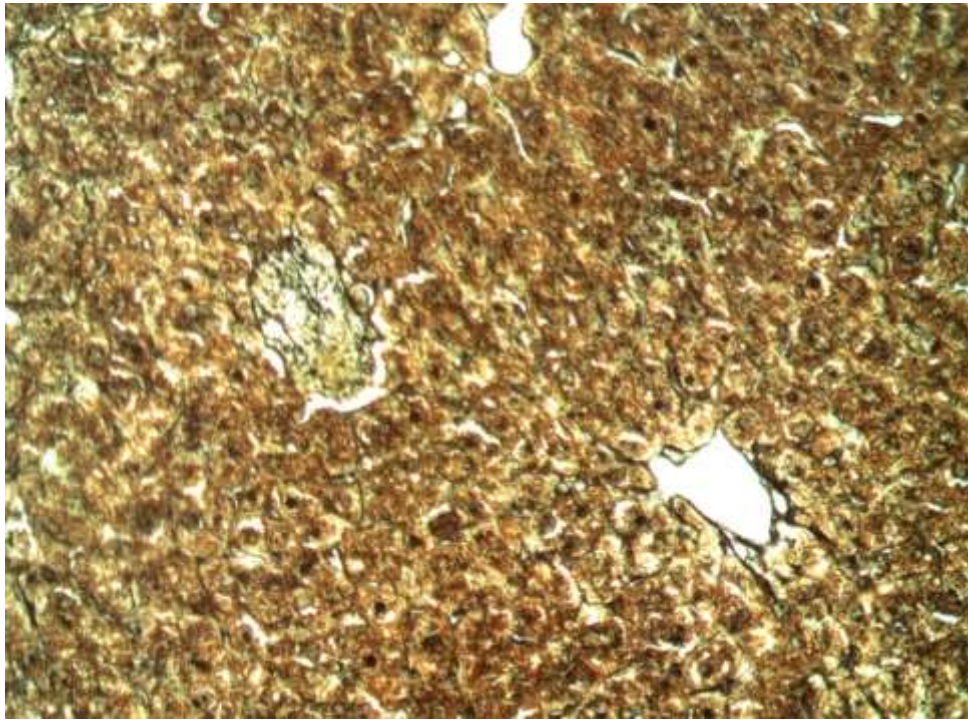


Рисунок 7 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 10-е сутки эксперимента.
Ретикулярные волокна в стенках сосудов. Окраска импрегнции серебром.

Увеличение $\times 200$

Так как полный фагоцитоз *Mycobacterium tuberculosis* резидентными и рекрутированными макрофагами затруднён, а у новорожденных мышей и невозможен, то в печени мышей во время выраженной альтерации персистируют провоспалительные макрофаги 1-го типа, ответственные за фагоцитоз и поддержание хронического воспалительного процесса. В то время как макрофаги 2-го типа существуют в печени в значительно меньшем количестве. Макрофаги 2-го типа считаются клетками, ответственными за регенерацию ткани. Они способны выделять такие интерлейкины, как IL-1 и IK-10, в частности. Так известно, что IL-1 непосредственно активирует дендритные клетки печени, что приводит к стимулированию фиброгенеза в печени.

3.2 Морфологические и морфометрические изменения у половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза

3.2.1 Динамика изменения массы половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза

С 28-х суток по 56-е сутки эксперимента у мышей линии C57Bl/6, которым вводили интраперитонеально вакцину БЦЖ, сохранялся дефицит массы тела (Таблица 5).

Таблица 5 – Масса печени (г) половозрелых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Периоды наблюдения	
	28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	$15,11 \pm 1,26$	$21,88 \pm 2,48$
3-я (БЦЖ) группа	$10,84 \pm 2,88^*$	$18,06 \pm 2,68^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).		

Сохраняющийся дефицит массы тела у мышей линии C57Bl/6 на 28,26 % на 28-е сутки и на 17,46 % на 56-е сутки в половозрелом периоде можно объяснить тем, что в ответ на введение вакцины БЦЖ у новорожденных мышей не сформировался нормальный иммунный ответ в виде образования гранулём и ограничения патогенного токсического воздействия микобактерий на паренхиматозные клетки печени.

3.2.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени взрослых мышей линии C57Bl/6 с 28-х по 56-е сутки эксперимента

Начиная с 28-х суток эксперимента в 3-й (БЦЖ) группе у мышей линии C57Bl/6 количество и размеры гранулём увеличилось. Также состав гранулём стал преимущественно эпителиоидноклеточный, а располагаться гранулёмы стали не только периваскулярно, но и в толще паренхимы печени (Рисунок 8).

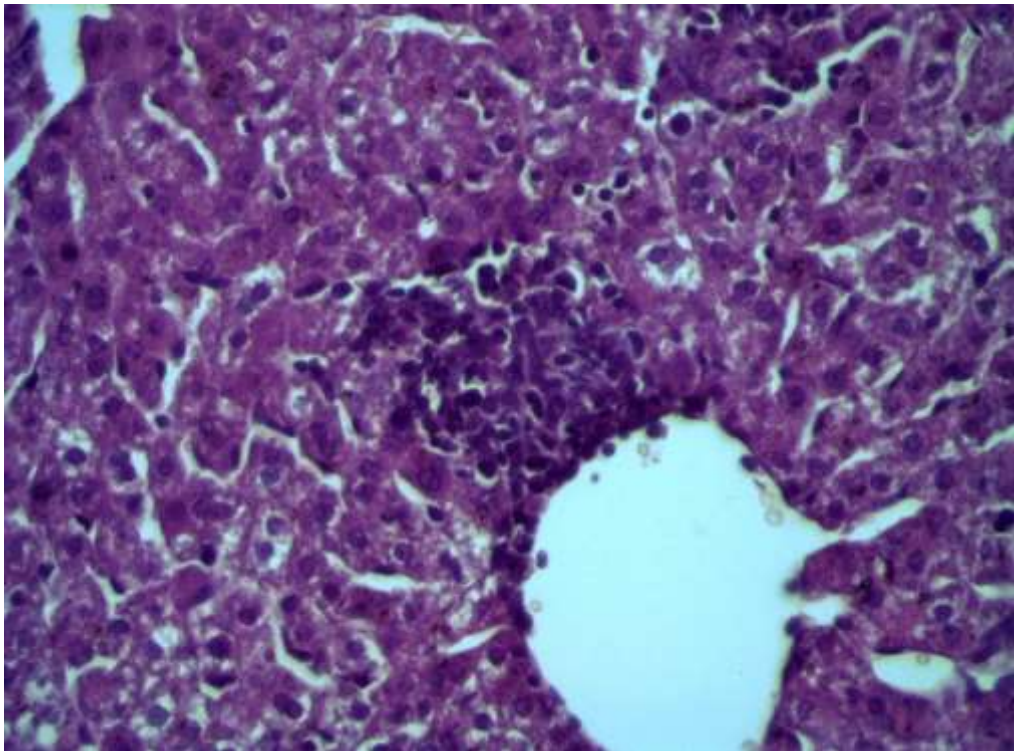


Рисунок 8 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 28-е сутки эксперимента.

Эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются преимущественно периваскулярно. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

На 56-е сутки при микроскопическом изучении образцов печени мышей линии C57Bl/6 из 3-й (БЦЖ) группы количество гранулём и их размер прогрессивно увеличивался (Таблица 6). Клеточный состав гранулём сохранился преимущественно эпителиоидно-клеточный. Располагались гранулёмы как периваскулярно, так и в толще паренхимы печени (Рисунок 9).

Таблица 6 – Динамика изменения численной плотности (N_{ai}) и диаметра гранулём (мкм) в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследуемые параметры	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
1-я группа	Численная плотность (N _{ai})	0,16 ± 0,06	3,2 ± 0,56
2-я группа		0,06 ± 0,03	2,15 ± 0,29*
1-я группа	Диаметр (мкм)	37,14 ± 1,84	69,78 ± 3,27
2-я группа		19,74 ± 1,71*	55,40 ± 2,27*
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (БЦЖ) группы (p < 0,05).			

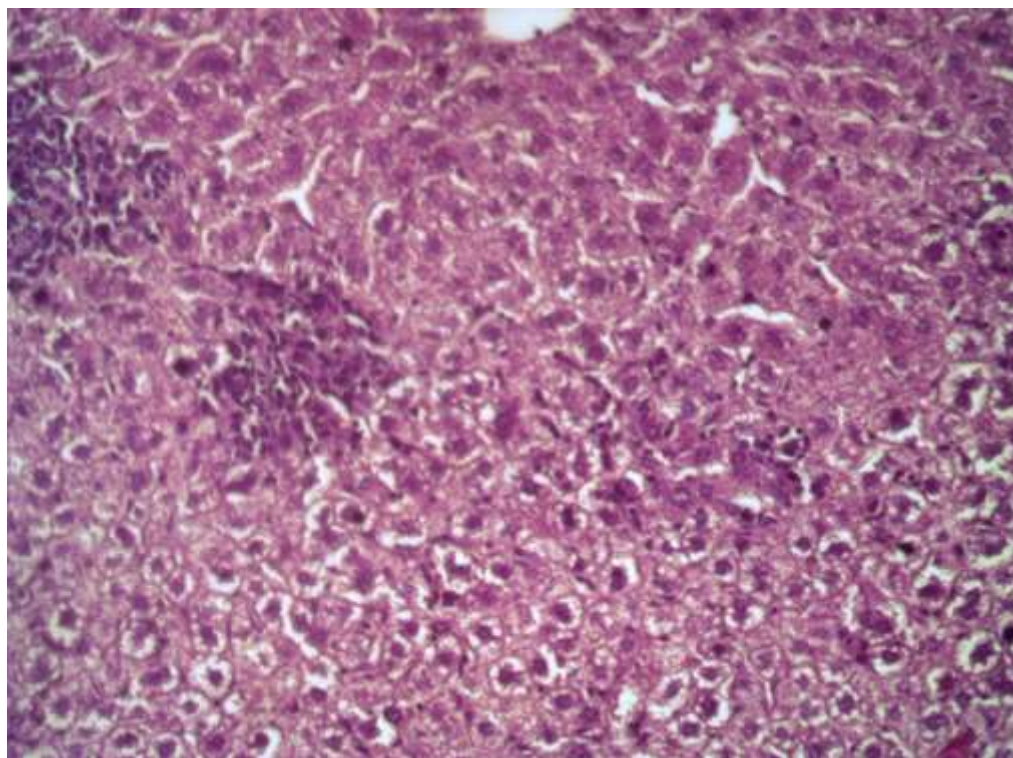


Рисунок 9 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента. Эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются плотно между собой в толще паренхимы печени. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

В гранулёмах макрофаги способны к эпителиоидной трансформации, при которой они приобретают характерный уплощенный вид и вытянутые ядра.

Эпителиоидная трансформация происходит в течение нескольких дней после образования гранулёмы. В то время как гранулёма в целом со временем становилась более эпителиоидной, даже в самых длительно существующих стадиях обнаруживаются высокоактивированные, инфицированные, макрофаги рядом с эпителиоидными клетками. Поскольку происходит постоянное привлечение макрофагов к таким воспалительным гранулёмам.

В печени мышей во время выраженной альтерации персистируют провоспалительные макрофаги 1-го типа, ответственные за фагоцитоз и поддержание хронического процесса, в то время как макрофаги 2-го типа обнаруживают в печени в значительно меньшем количестве [148]. В условиях БЦЖ-гранулематоза макрофаги поляризуются преимущественно по M2 пути, что приводит в дальнейшем к трансформации этих клеток в эпителиоидные клетки [7] и образованию эпителиоидноклеточных гранулём.

3.2.3 Деструктивные изменения в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза

При микроскопическом исследовании печени мышей линии C57Bl/6 наблюдалась схожая гистологическая картина на 28-е и 56-е сутки эксперимента: балочное строение печени было окончательно сформировано. Характер дистрофических изменений приобрёл менее выраженный характер. Вакуольная дистрофия гепатоцитов стала преимущественно мелкокапельной очаговой, а некрозы затрагивают лишь единичные гепатоциты (Таблица 7).

Таблица 7 – Объёмная плотность (Vv) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у взрослых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки жизни ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (Vv)	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	Дистрофически измененные гепатоциты	$2,34 \pm 0,41$	$0,48 \pm 0,07$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,84 \pm 0,16$	$0,16 \pm 0,03$
3-я (БЦЖ) группа	Дистрофически измененные гепатоциты	$18,84 \pm 0,54^*$	$15,76 \pm 0,42^*$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,28 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,14$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).			

При сравнении объёмной плотности (Vv) дистрофически измененных гепатоцитов на 28-е сутки эксперимента данный показатель был на 87,58 % повешен у мышей с морфологическими признаками гранулематозного гепатита, а на 56-е сутки – на 96,95 %. При этом объёмная плотность (Vv) некротизированных гепатоцитов между 3-й (БЦЖ) группой и 1-й (NaCl) группой достоверно не различалась и была принята за норму.

Продолжающиеся дистрофические изменения в печени мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза обусловлены, как уже было ранее описано, токсическим воздействием микобактерий и отсроченным формированием гранулём. Однако при изучении динамики изменения дистрофических изменений в печени мышей можно заметить прогрессивное снижение объёмной плотности (Vv) гепатоцитов в состоянии дистрофии к 56-м суткам эксперимента. Снижение токсического воздействия можно объяснить «дозреванием» макрофагального звена иммунитета и формированием гранулём, ограничивающих жизнедеятельность микобактерий в органе.

3.2.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени взрослых мышей линии C57Bl/6

С 28 суток эксперимента у мышей линии C57Bl/6 в 3-й (БЦЖ) группе в образцах печени встречаются крайне редкие мелкие островки экстрамедуллярного кроветворения. Объёмная плотность (V_v) составила $0,44 \pm 0,05$.

Большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения и их более продолжительное существование в печени мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита можно объяснить тем, что количество клеток Купфера у новорожденных мышей меньше, чем у половозрелых, а их фагоцитарная активность снижена. Островки экстрамедуллярного кроветворения в печени содержат преимущественно клетки эритроидного и миелоидного ростка. Тем самым, по-видимому, происходит пролиферация миелоидного ростка кроветворения в печени как компенсаторный процесс, на острую нехватку зрелых резидентных макрофагов.

3.2.5 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов взрослых мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 28-х по 56-е сутки эксперимента

На 28-е и 56-е сутки эксперимента у мышей из 3-й (БЦЖ) группы отмечается увеличение численной плотности (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов и гепатоцитов с митозами в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (NaCl) группы (Таблица 8).

На 28-е и 56-е сутки эксперимента у мышей из 3-й (БЦЖ) группы выявлено увеличение численной плотности (N_{ai}) гепатоцитов с позитивной экспрессией Ki-67 в 6 раз, при сравнении с 1-й (контрольной) группой на 28-е и 56-е сутки эксперимента (Рисунок 10).

Таблица 8 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов и митозов в гепатоцитах у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (N_{ai})	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	Митозы в гепатоцитах	$0,15 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$
	Двуядерные гепатоциты	$1,49 \pm 0,09$	$0,53 \pm 0,06$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,44 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,07$
3-я (БЦЖ) группа	Митозы в гепатоцитах	$1,01 \pm 0,19^*$	$0,09 \pm 0,03$
	Двуядерные гепатоциты	$5,12 \pm 0,26^*$	$6,8 \pm 0,18^*$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$2,78 \pm 0,32^*$	$2,78 \pm 0,32^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).			

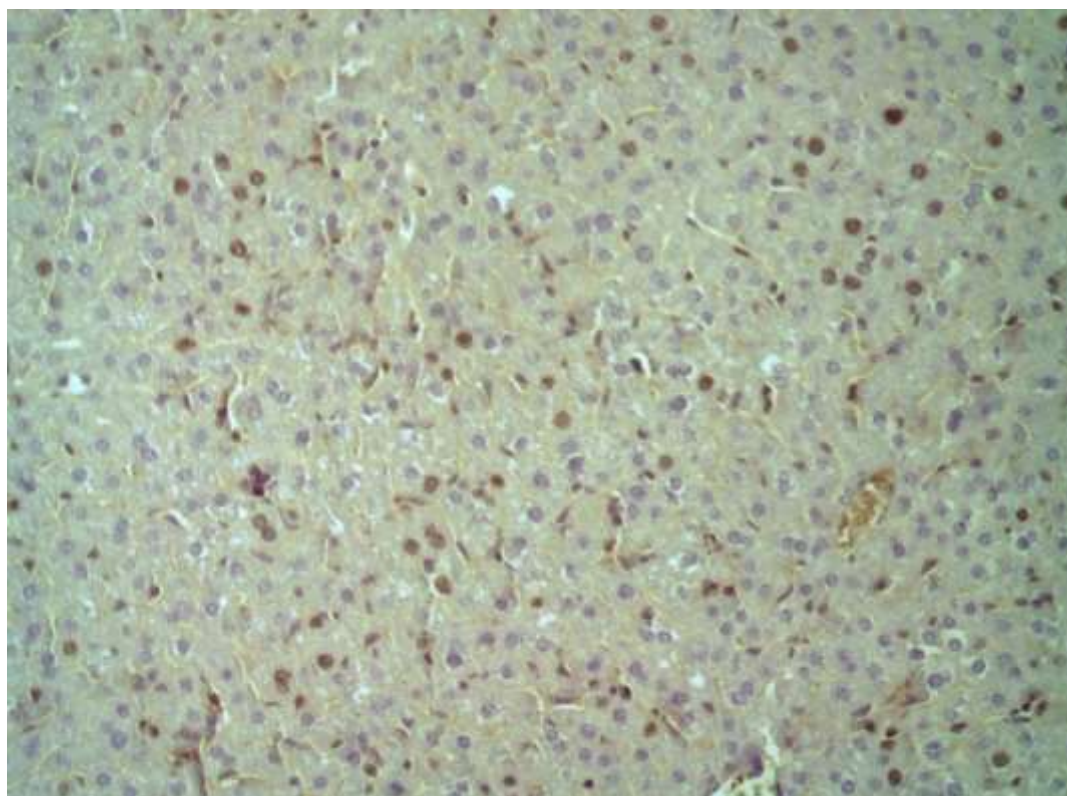


Рисунок 10 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента.

Большое количество гепатоцитов с позитивной экспрессией Ki-67.

Иммуногистохимическая окраска с применением антигена Ki-67.

Увеличение $\times 200$

3.2.6 Особенности фибропластических процессов в печени взрослых мышей линии С57В1/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза с 28-х по 56-е сутки эксперимента

Начиная с 28 суток эксперимента в печени мышей из опытной группы при импрегнации серебром наблюдается разрастание ретикулярных волокон в виде слепо заканчивающихся тонких тяжей и периваскулярных очагов на месте гранулём. В динамике объёмная плотность (V_v) ретикулярных волокон от 3-х суток эксперимента к окончанию эксперимента на 56-е сутки увеличилась в 10 раз и была большей в сравнении с аналогичным показателем у мышей контрольной группы на 28-е сутки в 1,5 раза (Рисунок 11).

При окраске по Ван-Гизону коллагеновые волокна соединительной ткани выявляются на 10-е и 28-е сутки эксперимента в опытной группе (БЦЖ) в составе стенок крупных сосудов. На 56-е сутки эксперимента разрастание коллагеновых волокон приобретает очаговый характер, и они наблюдаются в исходе эпителиоидных гранулём (Рисунок 12). Объёмная плотность (V_v) коллагеновых волокон в динамике наблюдения от 3-х суток к 56-м суткам эксперимента в печени мышей опытной группы увеличивалась в 3,77 раза.

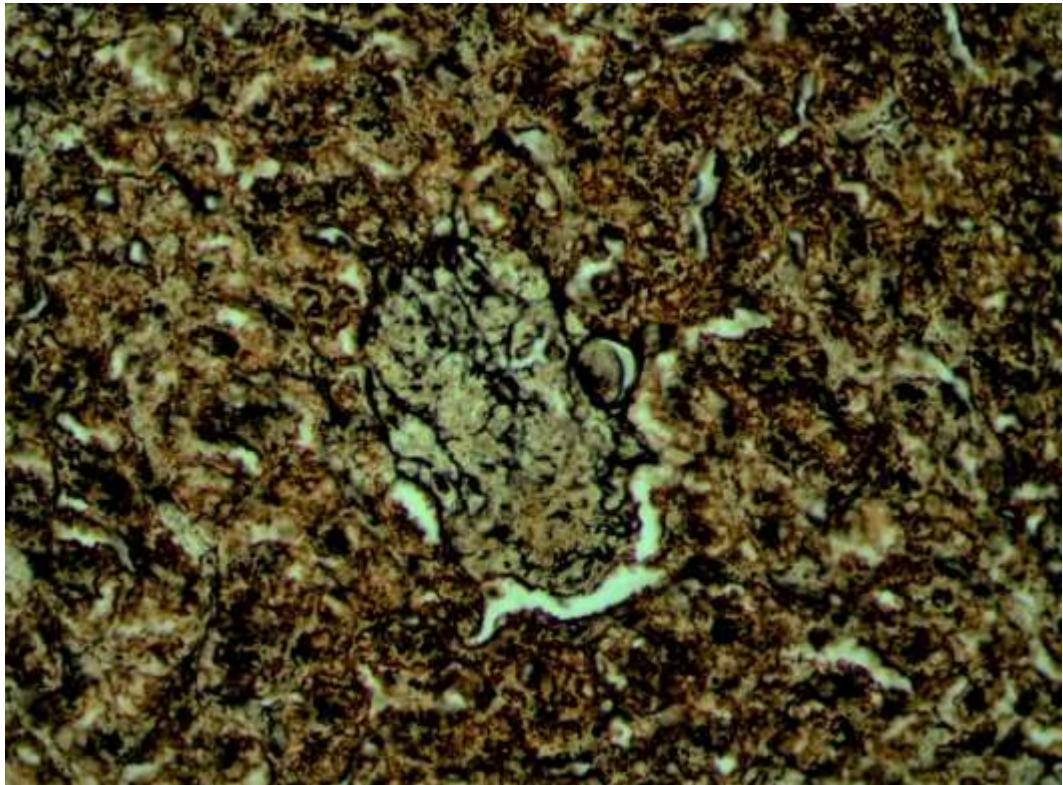


Рисунок 11 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента.
Ретикулярные волокна в толще гранулёмы. Окраска импрегнции серебром.
Увеличение $\times 400$

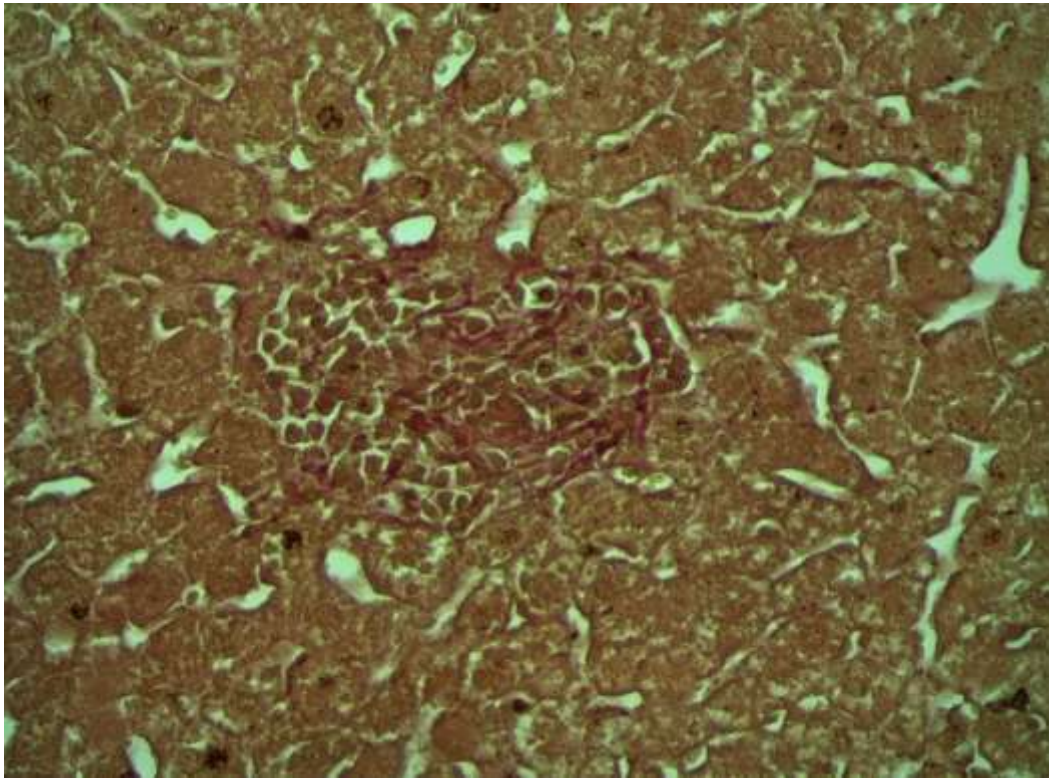


Рисунок 12 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки жизни.

Коллагеновые волокна в гранулёме. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение $\times 400$

Как было описано ранее, размеры и количество гранулём в печени мышей прогрессивно увеличивается с 28-х суток по 56-е сутки эксперимента, а также преобладание в гранулёмах эпителиоидных клеток только на 56-е сутки указывает, в первую очередь, о продолжающейся воспалительной реакции. Очевидный фибропластический процесс, который является исходом гранулематозного воспалительного процесса, развивается только к 28 суткам эксперимента в виде тонких ретикулярных волокон на месте сформировавшихся макрофагальных гранулём. К 56-м суткам эксперимента в толще эпителиоидноклеточных гранулём выявляются коллагеновые волокна. Отсроченный и слабовыраженный фиброз печени можно связать, во-первых, с незрелостью резидентных макрофагов и, во-вторых, с продолжающимся воздействием микобактерий на печень.

Фиброз при туберкулёзных гранулёмах наблюдается в двух формах: периферической и центральной, при этом чаще всего наблюдается

периферическая форма фиброза [45]. Фиброз, развивающийся в результате инфекции *Mtb*, может быть тесно связан с гранулёмами, и также часто фиброз присутствует только на периферии гранулём.

Количество клеток фибробластов и миофибробластов зависит от количества TGF- β 1, секретированным макрофагами в гранулёме. Концентрации TGF- β 1 и IL10 влияют на способность фибробластов к пролиферации. цитокины IL-4, IL-13 и TGF β стимулируют экспрессию коллагена-I на периферии гранулём. STAT1, STAT3 и NF κ B также относятся к важным медиаторам фибропластического процесса в гранулёмах. Макрофаги STAT1+ локализуются как в центре гранулём, так и на периферии и вне гранулём. Макрофаги STAT3+ были расположены в центральной и периферической зонах, а макрофаги NF κ B+ располагались только в центре гранулём.

Фибробласты синтезируют компоненты внеклеточного матрикса преимущественно в ответ на цитокины TGF- β 1 или IL-4/IL-13. Каждый из этих цитокинов может продуцироваться отдельными составляющими гранулёмы клетками: моноцитами, резидентными макрофагами, атипичными моноцитами, морфологически напоминающими гранулоциты; CD4+, CD8+ Т-клетками.

Слабовыраженный фибропластический процесс в условиях гранулематозного гепатита у мышей линии C57Bl/6 можно объяснить тем, что на всём протяжении эксперимента наблюдается запоздалое формирование гранулём с наиболее яркой картиной на 56-е сутки, где помимо сформированных гранулём наблюдается очаговая вакуольная дистрофия и единичные некрозы гепатоцитов, что говорит об активном воспалительном процессе. Как было ранее описано, в период активного хронического воспалительного процесса в тканях преобладают макрофаги 1-го типа, в которых преобладает секреция провосполительных медиаторов, направленная на уничтожение и элиминацию возбудителя. Тогда как противовоспалительные медиаторы, например, такие как IL-10 и TGF, секретируются преимущественно макрофагами 2-го типа. Вследствие чего, можно предположить, что причиной отсутствия выраженного фиброза является поздно развившийся и продолжающийся воспалительный процесс.

3.3 Морфологические и морфометрические изменения у новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном

3.3.1 Динамика изменения массы новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном

На 3-и сутки эксперимента масса мышей линии C57Bl/6, которым вводили только БЦЖ и БЦЖ в комбинации с окисленным декстраном, достоверно не отличалась. Но при сравнении с 1-й (NaCl) и 2-й (ОД) группой можно наблюдать, что масса меньше в 2 раза и дефицит массы тела сохраняется на всём протяжении эксперимента, вплоть до 10 суток эксперимента (Таблица 9).

Таблица 9 – Масса печени (г) новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Периоды наблюдения		
	3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	$3,51 \pm 0,21$	$5,18 \pm 0,81$	$9,11 \pm 0,13$
2-я (ОД) группа	$3,34 \pm 0,24$	$5,31 \pm 0,97$	$8,84 \pm 1,02$
3-я (БЦЖ) группа	$1,81 \pm 0,47^*$	$3,1 \pm 0,68^*$	$5,54 \pm 0,9^*$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	$1,92 \pm 0,34^*$	$3,31 \pm 0,53^*$	$5,67 \pm 0,11^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).			

Введение окисленного декстрана не приводит к коррекции дефицита массы тела мышей, так как, по-видимому, первоначальный острый повреждающий эффект, обусловленный патогенным воздействием микобактерий, содержащихся в вакцине БЦЖ, оказал достаточно выраженное воздействие в течение 1 суток эксперимента и до введения окисленного декстрана на 2-е сутки после рождения мышей.

3.3.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном с 3-х по 10-е сутки эксперимента

Отличительной особенностью при морфологическом исследовании печени мышей линии C57Bl/6 из 4-й (БЦЖ + ОД) группы явилось то, что по 10-е сутки эксперимента включительно гранулёмы в печени не определялись.

При применении окисленного декстрана на следующие сутки после введения вакцины БЦЖ интраперитонеально наблюдается менее выраженный гранулематозный воспалительный процесс в виде более позднего формирования гранулём и их меньшего количества. Полученный результат можно объяснить тем, что окисленный декстран избирательно захватывается макрофагами и способствует более быстрому созреванию фаголизосом и тем самым приводит к завершённому фагоцитозу микобактерий. Тем самым ОД, по всей видимости нивелирует незрелость макрофагального звена иммунного ответа и способность микобактерий избегать фагоцитоза внутри клеток Купфера.

3.3.3 Деструктивные изменения в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном

При применении раствора окисленного декстрана на 2-е сутки эксперимента как средства коррекции гепатита у мышей из 4-ой (БЦЖ + ОД) группы наблюдались следующие изменения при микроскопическом исследовании. Дистрофия гепатоцитов встречалась в виде небольших очагов, а сам характер дистрофии в гепатоцитах имел мелко- и крупновакуольный характер. Однако, начиная с 10-х суток эксперимента, количество гепатоцитов, в которых наблюдалась вакуольная дистрофия резко возросло и характер приобрёл очагово-сливной характер. При оценке такой характеристики как некроз гепатоцитов, он был выражен слабо и достоверно не отличался от контрольной группы (Рисунок 13).

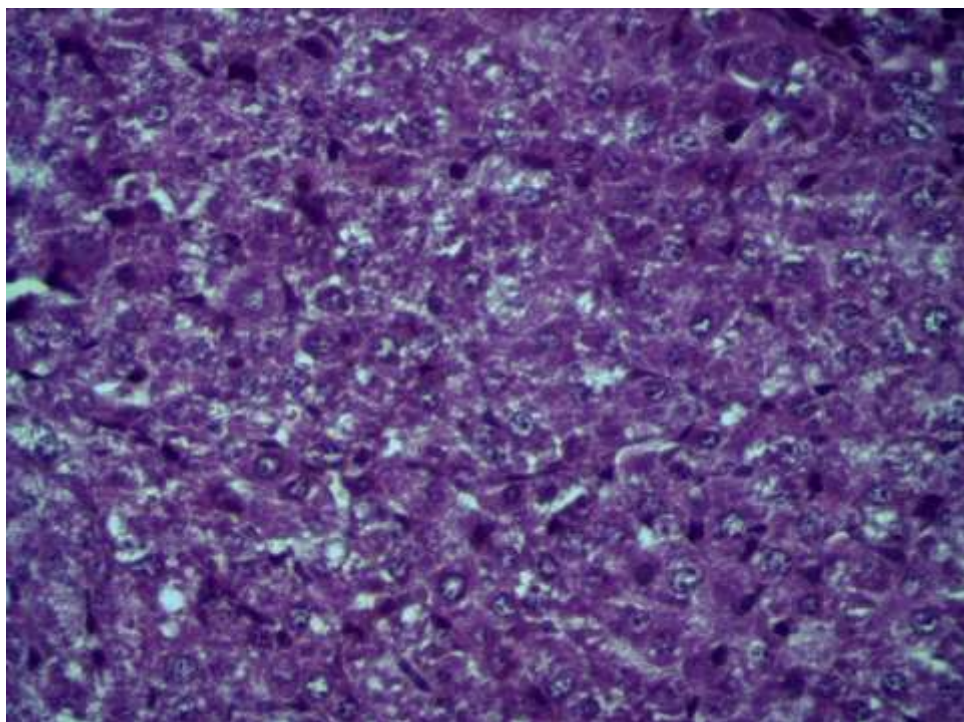


Рисунок 13 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки жизни. Очаги вакуольной дистрофии гепатоцитов.

Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

При морфометрическом исследовании отмечается, что у мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы объёмная плотность (V_v) дистрофически измененных гепатоцитов с 3-х по 5-е сутки была меньше в 8 раз, в сравнении с аналогичным показателем у мышей 3-й (БЦЖ) группы (Таблица 10).

Таблица 10 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически изменённых гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (V_v)	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$7,48 \pm 0,32$	$4,01 \pm 0,27$	$3,27 \pm 0,31$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,7 \pm 0,27$	$0,2 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,03$
2-я (ОД) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$0,48 \pm 0,05$	$0,46 \pm 0,1$	$0,44 \pm 0,06$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,24 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,02$
3-я (БЦЖ) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$22,2 \pm 0,58^*$	$34,26 \pm 0,59^*$	$41,24 \pm 0,93^*$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$4,84 \pm 0,13^*$	$0,24 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,04$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$6,8 \pm 0,32$	$3,8 \pm 0,38$	$24,2 \pm 0,69^{*a}$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$4,4 \pm 0,16^*$	$0,4 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,05$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$), (a) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы.				

Исследования с микобактериальными гликолипидами показали, что связывание микобактериального LAM с DC-SIGN дендритных клеток хозяина ингибировало передачу сигналов TLR, генерирующую иммуносупрессивный ответ, в то время как взаимодействие микобактериальных факторов, таких как PE-PGRS33 с TLR2, индуцировало апоптоз. TLR-1, 2, 4, 8 и 9 связаны с инфекцией Mtb. Известно, что многие из микобактериальных компонентов взаимодействуют с TLR2 и опосредуют передачу сигналов в сторону апоптоза. Сигнализация TLR2 и TLR4 часто приводит к производству TNF- α через MyD88. Отсутствие сигнализации TLR4 способствует некрозу, что свидетельствует о роли TLR4 в регулировании баланса между апоптозом и некрозом. Микобактерии, попадающие в макрофаги через TLR2, вызывают апоптоз по пути p38 MAPK.

3.3.4 Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени новорожденных мышей линии С57В1/6 и при коррекции окисленным декстраном

При микроскопическом исследовании образцов печени мышей линии С57В1/6 в 4-й (БЦЖ + ОД) группе наблюдается аналогичная картина с 3-х по 10-е сутки эксперимента, что и в печени мышей линии С57В1/6 из 3-й (БЦЖ) группы.

У мышей, инфицированных микобактериями, которые содержались в вакцине БЦЖ и независимо от условий коррекции течения заболевания (3-я (БЦЖ) и 4-я (БЦЖ + ОД группы) наблюдается большее количество (Vv) островков экстрамедуллярного кроветворения на 5-е сутки эксперимента и прогрессивное снижение к 10-м суткам эксперимента (Таблица 11). На 10-е сутки эксперимента отмечается большая объёмная плотность (Vv) очагов экстрамедуллярного кроветворения в 4-й (БЦЖ + ОД) группе в 2,5 раза больше, чем в 3-й (БЦЖ) группе.

Большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения и их более продолжительное существование в печени мышей линии С57В1/6 в условиях гранулематозного гепатита можно объяснить тем, что количество клеток Купфера у новорожденных мышей меньше, чем у половозрелых, а их фагоцитарная активность снижена. Островки экстрамедуллярного кроветворения в печени содержат преимущественно клетки эритроидного и миелоидного ростка. Тем самым, по-видимому, происходит пролиферация миелоидного ростка кроветворения в печени как компенсаторный процесс на острую нехватку зрелых резидентных макрофагов.

Таблица 11 – Объёмная плотность (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения и численная плотность (N_{ai}) мегакариоцитов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и при коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$15,31 \pm 1,57$	$6,09 \pm 0,19$	$2,32 \pm 0,13$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,56 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,03$
2-я (ОД) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$10,16 \pm 0,28$	$3,76 \pm 0,16$	$3,84 \pm 0,15$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,88 \pm 0,11$	$0,4 \pm 0,06$	$0,16 \pm 0,03$
3-я (БЦЖ) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$24,52 \pm 0,29^*$	$16,56 \pm 0,24^*$	$3,24 \pm 0,12$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,4 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,03$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	Очаги экстрамедуллярного кроветворения (V_v)	$18,11 \pm 0,32^*$	$14,88 \pm 0,27^*$	$10,88 \pm 0,28^{*a}$
	Мегакариоциты (N_{ai})	$0,14 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,05$	$0,21 \pm 0,08$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$), (a) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы.				

3.3.5. Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 3-х по 10-е сутки эксперимента

При морфологическом исследовании печени новорожденных мышей из 4-й (БЦЖ + ОД) группы с 3-х по 10-е сутки эксперимента численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов и гепатоцитов, в которых определяются фигуры митозов, а также гепатоцитов с положительной экспрессией Ki-67 антигена,

достоверно не отличались от результатов в печени мышей из 3-й (БЦЖ) группы (Таблица 12).

Таблица 12 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии антигена Ki-67 в ядрах гепатов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (N_{ai})	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Митозы в гепатоцитах	0	$0,09 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,03$
	Двуядерные гепатоциты	$0,15 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,03$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,38 \pm 0,06$	$0,25 \pm 0,07$	$0,25 \pm 0,10$
2-я (ОД) группа	Митозы в гепатоцитах	$0,16 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,03$	$0,12 \pm 0,05$
	Двуядерные гепатоциты	0	$0,06 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,03$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,44 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,11$	$0,56 \pm 0,12$
3-я (БЦЖ) группа	Митозы в гепатоцитах	0	$0,06 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
	Двуядерные гепатоциты	$0,1 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,03$	$0,03 \pm 0,02$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,81 \pm 0,12^*$	$0,94 \pm 0,15^*$	$1,13 \pm 0,06^*$
4-я (БЦЖ+ОД) группа	Митозы в гепатоцитах	0	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
	Двуядерные гепатоциты	$0,07 \pm 0,03$	$0,16 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,02$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,94 \pm 0,12^*$	$1,06 \pm 0,17^*$	$1,13 \pm 0,07^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).				

Окисленный декстран в условиях БЦЖ-гранулематоза у новорожденных мышей не вызывает выраженного репаративного процесса в гепатитах, что вероятнее всего связано с активным воспалительным процессом и выраженными деструктивными изменениями. Вследствие чего в очаге повреждения будут

преобладать классически активированные макрофаги, которые секретируют преимущественно провоспалительные цитокины, которые не оказывают никакого воздействия на процессы регенерации.

3.3.6 Особенности фибропластических процессов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном

При окрасе образцов печени по Ван-Гизону и методом импрегнации серебром коллагеновые и ретикулярные волокна определялись только в структуре стенок крупных сосудов (Таблица 13). На протяжении эксперимента, вплоть до 10-х суток объёмная плотность (V_v) ретикулярных и коллагеновых волокон достоверно не отличалась от контрольных и опытной групп и расценена как вариант нормы.

Таблица 13 – Объёмная плотность (V_v) коллагеновых и ретикулярных волокон в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (V_v)	Периоды наблюдения		
		3-и сутки	5-е сутки	10-е сутки
1-я (NaCl) группа	Ретикулярные волокна	$2,14 \pm 0,14$	$3,47 \pm 0,17$	$5,21 \pm 0,22$
	Коллагеновые волокна	$2,58 \pm 0,19$	$4,12 \pm 0,14$	$6,06 \pm 0,13$
2-я (ОД) группа	Ретикулярные волокна	$2,31 \pm 0,17$	$3,97 \pm 0,16$	$6,12 \pm 0,14$
	Коллагеновые волокна	$2,55 \pm 0,21$	$4,22 \pm 0,18$	$5,28 \pm 0,25$
3-я (БЦЖ) группа	Ретикулярные волокна	$2,38 \pm 0,16$	$3,51 \pm 0,15$	$6,07 \pm 0,19$
	Коллагеновые волокна	$2,75 \pm 0,11$	$4,52 \pm 0,18$	$5,06 \pm 0,16$
4-я (БЦЖ+ОД) группа	Ретикулярные волокна	$1,98 \pm 0,14$	$3,77 \pm 0,21$	$5,59 \pm 0,23$
	Коллагеновые волокна	$2,56 \pm 0,17$	$4,49 \pm 0,19$	$6,87 \pm 0,29$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).				

3.4 Морфологические и морфометрические изменения у половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном

3.4.1 Динамика изменения массы взрослых мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном

С 28 суток эксперимента масса мышей линии C57Bl/6, которым вводили только БЦЖ и БЦЖ в комбинации с окисленным декстраном, также как и у новорожденных мышей, достоверно не отличалась. А при сравнении с 1-й (NaCl) и 2-й (ОД) группой наблюдается сохранение динамики так же, как и в более ранние периоды (Таблица 14).

Таблица 14 – Масса печени (г) взрослых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Периоды наблюдения	
	28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	15,11 $\pm$ 1,26	21,88 $\pm$ 2,48
2-я (ОД) группа	14,93 $\pm$ 1,21	22,07 $\pm$ 2,76
3-я (БЦЖ) группа	10,84 $\pm$ 2,88*	18,06 $\pm$ 2,88*
4-я (БЦЖ + ОД) группа	11,03 $\pm$ 1,76*	20,06 $\pm$ 2,88*
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).		

Несмотря на введение на 2-е сутки эксперимента окисленного декстрана мышам с БЦЖ-гранулематозом печени, коррекции дефицита массы тела не произошло. При этом можно наблюдать менее выраженные дистрофические изменения на 3-и и 5-е сутки эксперимента, а также отсутствие гранулём на 10-е сутки эксперимента. Но как будет обсуждено в дальнейшем, на 28-е и 56-е сутки эксперимента в 4-й (БЦЖ + ОД) группе наблюдаются макрофагальные и эпителиоидно-клеточные гранулёмы. Что позволяет судить об персистенции

возбудителя и продолжительном его отрицательном воздействии на организм мышей.

3.4.2 Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени взрослых мышей линии С57В1/6 и при коррекции окисленным декстраном с 28-х по 56-е сутки эксперимента

У мышей линии С57В1/6 из 4-й (БЦЖ + ОД) группы гранулёмы определяются только на 28-е сутки эксперимента. Гранулёмы имеют преимущественно макрофагальный состав и располагались периваскулярно (Рисунок 14). Численная плотность (N_{ai}) составила $0,06 \pm 0,03$, а диаметр ($19,74 \pm 1,71$) мкм.

К 56-м суткам эксперимента у мышей из 4-й (БЦЖ + ОД) группы количество и размер прогрессивно увеличилось. Численная плотность (N_{ai}) составила $3,2 \pm 0,56$, а диаметр ($55,40 \pm 2,27$) мкм. При морфологическом исследовании состав гранулём был также преимущественно эпителиоидноклеточный, а расположение сохранялось, как и на 28-е сутки эксперимента (Рисунок 15).

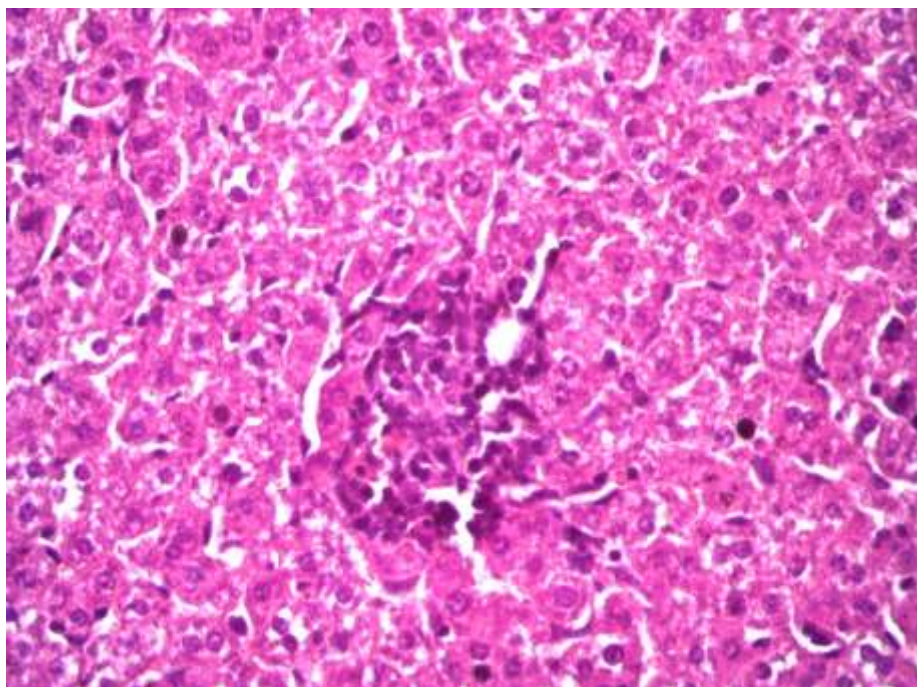


Рисунок 14 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 28-е сутки эксперимента.

Редкие эпителиоидно-клеточные гранулёмы небольших размеров в толще паренхимы печени. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

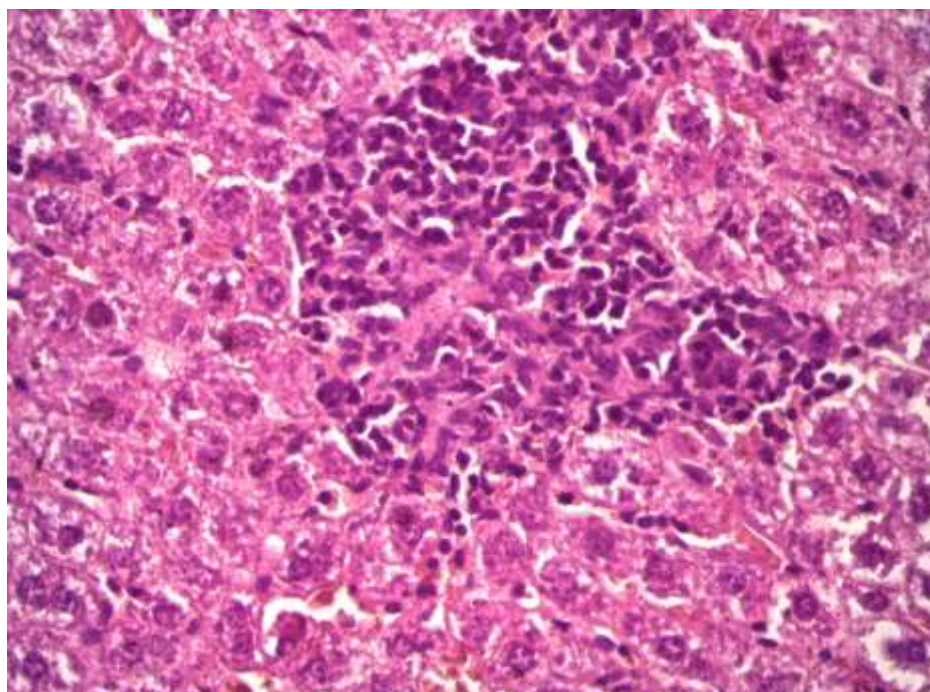


Рисунок 15 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 56-е сутки эксперимента.

Редкие эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются преимущественно периваскулярно. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$

Клетки Купфера являются резидентными макрофагами и гранулёмобразующими клетками. Окисленный декстран способствует ускорению процесса фаголизосомного слияния путём усиления NO-синтетазной активности, преобладанию классически-активированных макрофагов и элиминации возбудителя и тем самым приводит к уменьшению гранулёмогенеза. Также описан такой процесс, как экспрессия катепсинов В и D макрофагами *in vitro* при исследовании влияния липосомальной формы конъюгированного декстрана и изониазида (декстразида) [34]. Клетки Купфера при антигенной стимуляции выделяют хемоаттрактанты для рекрутирования в очаг воспаления моноцитов и нейтрофилов. Меньший диаметр гранулём в печени мышей при применении ОД связан с тем, что при раннем и завершённом фагоцитозе и, как следствие, элиминации возбудителя происходит снижение выделения хемоаттрактантов клетками Купфера.

Также большую роль в адекватной элиминации патогенных микроорганизмов играет гистоархитектоника печени у новорожденных мышей: гепатоциты расположены рыхло и балочное строение с четкой сосудистой системой отсутствует, что приводит к задержке патогена в печени и более поздней презентации антигенов резидентными макрофагами – клетками Купфера [109]. Клетки Купфера у новорожденных мышей не способны останавливать бактерии, которые находятся в протоке синусоидных капилляров. Эти клетки также демонстрируют более низкий бактериальный захват и нарушение способности к завершённому фагоцитозу.

Учитывая незрелость механизмов макрофагального звена, а конкретно, худший захват и фагоцитоз патогенных агентов, а также само влияние микобактерий и их способность к эндоцитобиозу путём остановки формирования фаголизосомы и разрыву мембраны фагосомы, можно предположить, что эти причины являются ключевыми при отсроченном формировании гранулём у мышей, инфицированных на 1-е сутки путём введения интраперитонеально вакцины БЦЖ.

Однако, несмотря на положительный эффект ОД, гранулёмы формируются

так же, как и в 3-й (БЦЖ) группе, что связано с выведением окисленного декстрана и продолжительной персистенции микобактерий в клетках.

3.4.3 Деструктивные изменения в печени половозрелых мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном

На 28-е сутки в печени у мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы объёмная плотность (Vv) дистрофически измененных гепатоцитов была меньшей в сравнении с аналогичным показателем у мышей 3-й (БЦЖ) группы в 1,2 раза. К 56 суткам эксперимента различия этого показателя между мышами 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп не обнаружили. Объёмная плотность (Vv) очагов некроза у мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы не отличалась от аналогичного показателя у мышей 1-й (интактной) и 2-й (контрольной) группы во все периоды наблюдения, и была меньшей на 56-е сутки в сравнении с аналогичным показателем у мышей 3-й (БЦЖ) группы в 3 раза (Таблица 15).

Таблица 15 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически изменённых гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группы	Исследованные параметры (V_v)	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$1,34 \pm 0,41$	$0,38 \pm 0,07$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,84 \pm 0,16$	$0,16 \pm 0,03$
2-я (ОД) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$0,51 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,07$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,11 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$
3- (БЦЖ) я группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$28,84 \pm 0,54^*$	$15,76 \pm 0,42^*$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$0,28 \pm 0,06$	$0,41 \pm 0,14$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	Дистрофически изменённые гепатоциты	$25,20 \pm 0,61^{*a}$	$14,16 \pm 0,32^*$
	Очаги некрозов гепатоцитов	$1,48 \pm 0,18$	$0,21 \pm 0,08$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$), (a) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы.			

Окисленный декстран, обладая таким свойством, как лизосомотропизм, может избирательно захватываться клетками и инициировать внутриклеточную регенерацию и восстановление гладкого эндоплазматического ретикулума, так как вакуольная дистрофия гепатоцитов обусловлена повреждением гладкого эндоплазматического ретикулума, увеличением его проницаемости и накоплением патологических метаболитов, то есть ОД при токсическом гепатозе обладает выраженным гепатопротекторным эффектом [6].

3.4.4 Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита с 28-х по 56-е сутки эксперимента

При морфометрическом исследовании образцов печени мышей на 28-е и 56-е сутки эксперимента у мышей из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп

отмечается увеличение численной плотности (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов и гепатоцитов с митозами в сравнении с аналогичным показателем у мышей 1-й (интактной) и 2-й (контрольной) групп. У мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы количество двуядерных гепатоцитов, отражающее репаративную регенерацию гепатоцитов, было большим на 28-е и 56-е сутки в сравнении с аналогичным показателем у мышей 3-й (БЦЖ) группы в 1,8 раза.

На 28-е и 56-е сутки эксперимента у мышей из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп выявлено увеличение численной плотности (N_{ai}) гепатоцитов с позитивной экспрессией Ki-67 в 6 раз, при сравнении с 1-й (контрольной) группой на 28-е и 56-е сутки эксперимента. Разница между двумя группами на 28-е и 56-е сутки эксперимента достоверно не различалась (Таблица 16).

Таблица 16 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии антигена Ki-67 в ядрах гепатов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группа	Исследованные параметры (N_{ai})	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
1-я (NaCl) группа	Митозы в гепатоцитах	$1,01 \pm 0,19$	$0,09 \pm 0,03$
	Двуядерные гепатоциты	$0,52 \pm 0,26$	$1,8 \pm 0,18$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,44 \pm 0,08$	$0,44 \pm 0,07$
2-я (ОД) группа	Митозы в гепатоцитах	$0,2 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,03$
	Двуядерные гепатоциты	$0,21 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,08$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$0,63 \pm 0,06$	$0,13 \pm 0,04$
3-я (БЦЖ) группа	Митозы в гепатоцитах	$0,15 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$
	Двуядерные гепатоциты	$1,49 \pm 0,09^*$	$1,53 \pm 0,06^*$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$2,78 \pm 0,32^*$	$2,78 \pm 0,32^*$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	Митозы в гепатоцитах	$1,19 \pm 0,05^*$	$0,21 \pm 0,08$
	Двуядерные гепатоциты	$2,75 \pm 0,08^*$	$2,63 \pm 0,18^*$
	Гепатоциты, экспрессирующие Ki-67	$2,44 \pm 0,35^*$	$3,13 \pm 0,26^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (NaCl) группы ($p < 0,05$).			

3.3.5 Особенности фибропластических процессов в печени половозрелых мышей линии С57Вl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном

При микроскопическом исследовании образцов печени мышей линии С57Вl/6 из 4-й (БЦЖ + ОД) группы с применением дополнительных методов окраски по Ван-Гизону и методом импрегнации серебром отмечается, что на 28-е сутки ретикулярные волокна встречаются как в толще стенок сосудов, так и в самих макрофагальных гранулёмах (Рисунок 16). Однако на 56-е сутки эксперимента коллагеновые волокна в эпителиоидно-клеточных гранулёмах отсутствуют (Таблица 17, Рисунок 17).

Таблица 17 – Объёмная плотность (V_v) коллагеновых и ретикулярных волокон в печени мышей линии С57Вl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Группа	Исследованные параметры (V_v)	Периоды наблюдения	
		28-е сутки	56-е сутки
3-я (БЦЖ) группа	Ретикулярные волокна	$10,5 \pm 0,21$	$17,4 \pm 0,40$
	Коллагеновые волокна	$6,69 \pm 0,26$	$10,38 \pm 0,31$
4-я (БЦЖ + ОД) группа	Ретикулярные волокна	$11,3 \pm 1,13$	$13,8 \pm 1,07$
	Коллагеновые волокна	$6,91 \pm 0,46$	$7,07 \pm 0,41^*$
Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы ($p < 0,05$).			

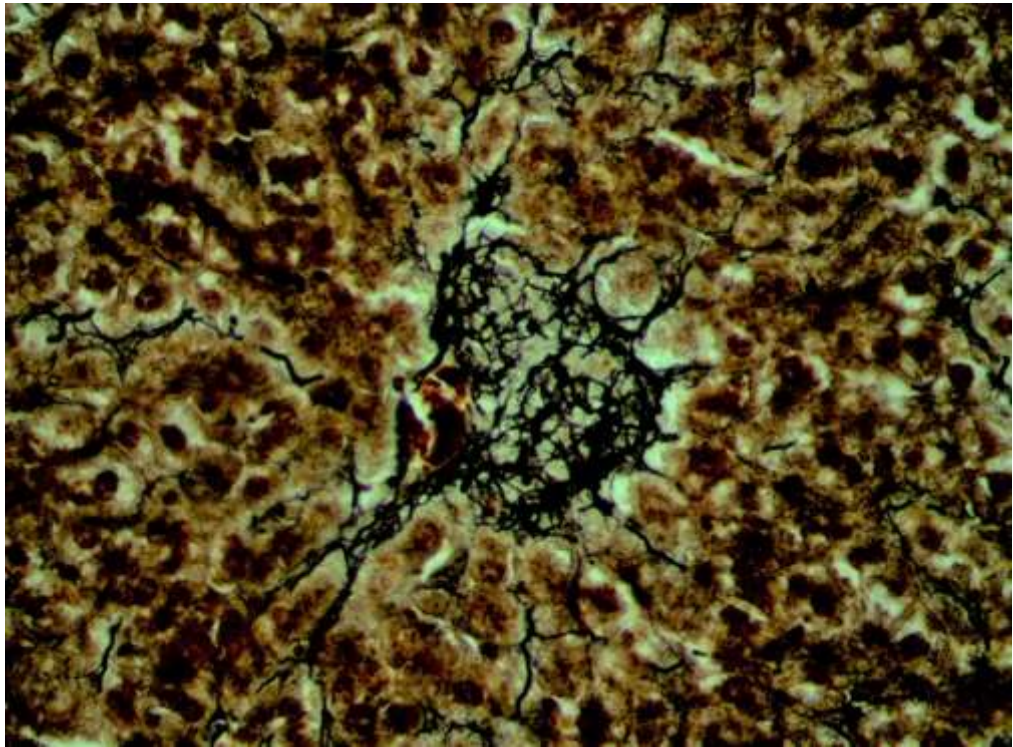


Рисунок 16 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 28-е сутки эксперимента.

Ретикулярные волокна в толще гранулёмы. Окраска импрегнации серебром.

Увеличение $\times 400$

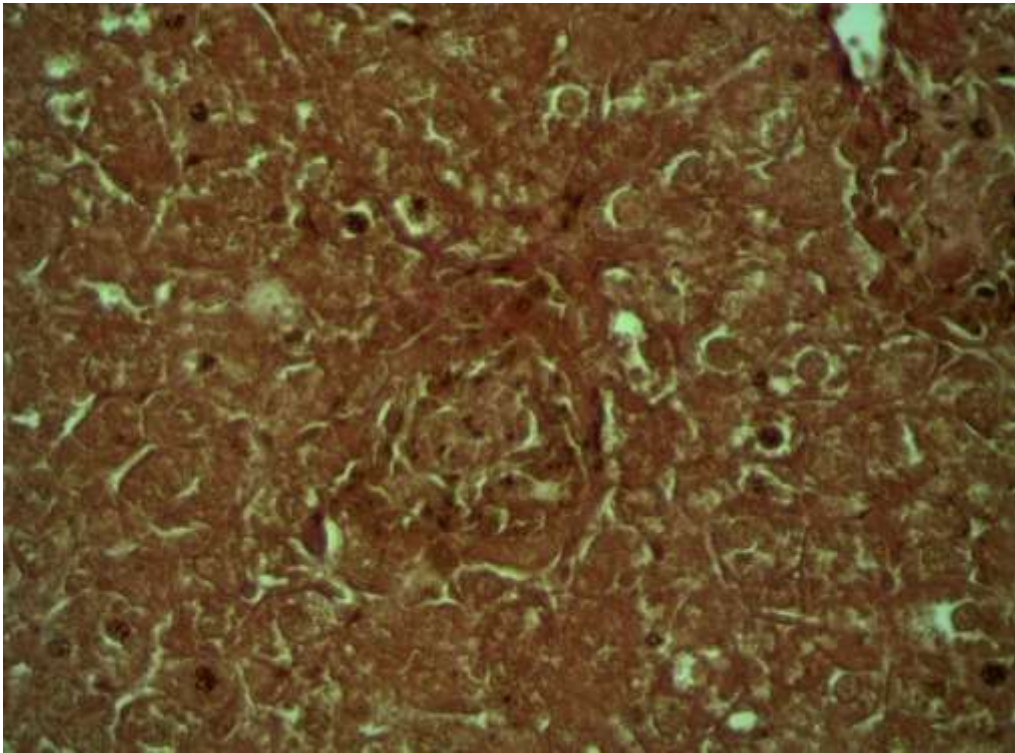


Рисунок 17 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 56-е сутки эксперимента. Коллагеновые волокна определяются в небольшом количестве, преимущественно в краевой зоне гранулёмы. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение $\times 400$

Фибропластический процесс в условиях гранулематозного гепатита у мышей линии C57Bl/6 обусловлен тем, что на протяжении эксперимента наблюдается запоздалое формирование гранулём с наиболее яркой картиной на 56-е сутки, где помимо сформированных гранулём наблюдается очаговая вакуольная дистрофия и микронекрозы гепатоцитов, что говорит об активном воспалительном процессе. В период активного воспалительного процесса преобладают макрофаги 1-го типа, в которых преобладает секреция провосполительных медиаторов, направленная на поддержание воспаления в тканях с целью уничтожения и элиминации возбудителя. Тогда как противовоспалительные медиаторы секретируются преимущественно макрофагами 2-го типа [7]. Основными цитокинами, участвующими в фибропластическом процессе, являются TGF, IL-4, IL-10, IL-13, стимулируя экспрессию коллагена-I в фибробластах на периферии гранулём [45]. В этой связи

можно предположить, что причиной позднего развития фиброза в печени является отсроченный воспалительный гранулематозный процесс.

Применение окисленного декстрана при гранулематозном гепатите у мышей линии C57Bl/6 сопровождается менее выраженным фиброзом, в связи с менее выраженным воспалительным процессом. Кроме того, ОД препятствует сборке коллагена и тем самым препятствует фиброзу путём образования альдегид-альдегидных связей тропоколлагеном, образуя прочные связи и блокируя их соединение. При применении ОД в условиях БЦЖ-гранулематоза отмечается снижение экспрессии цепи $\alpha 1$ коллагена III типа и TGF- β [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что, начиная с 3-х суток эксперимента, наблюдается двукратная разница в массе между мышатами из 1-й (NaCl) группы и 3-й (БЦЖ) группы с сохраняющейся тенденцией вплоть до 56-х суток жизни мышей. При введении окисленного декстрана у мышей из 4-й (БЦЖ + ОД) группы наблюдается аналогичная картина в виде дефицита массы тела, который сохраняется до 28 суток жизни. Однако на 56-е сутки жизни достоверной разницы в массе между мышами из 1-й (NaCl) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп нет. Сохраняющийся дефицит массы тела можно объяснить тем, что в ответ на введение вакцины БЦЖ у новорожденных мышей не сформировался нормальный иммунный ответ в виде образования гранулём и ограничения патогенного токсического воздействия микобактерий на паренхиматозные клетки печени. Однократное применение окисленного декстрана на 2-е сутки после рождения не приводит к скорой коррекции массы тела у мышей с БЦЖ-гранулематозом.

У мышей из 3-й (БЦЖ) группы только на 10-е сутки жизни наблюдаются единичные мелкие гранулёмы, которые имели макрофагальное строение и располагались преимущественно рядом с крупными сосудами. На 28-е сутки жизни количество и размеры гранулём увеличивались, а сами гранулёмы имели эпителиоидноклеточное строение и располагались как периваскулярно, так и в толще паренхимы печени с сохраняющейся динамикой увеличения размеров и количества к 56-м суткам жизни.

Полученный результат в виде формирования гранулём у мышей в половозрелом периоде можно объяснить незрелостью макрофагального звена иммунной системы у новорожденных мышей линии C57B1/6 и персистенцией возбудителя в вакуолярном аппарате клеток Купфера. У новорожденных мышей резидентные макрофаги обладают сниженной экспрессией мембранных белков и рецепторов, что приводит к сниженной антигенпрезентирующей функции этих клеток, а также характерна сниженная экспрессия комплекса мембранной атаки-1 и L-селектина, что приводит к снижению миграции лейкоцитов из сосудов в очаг

воспаления. Неонатальные макрофаги экспрессируют повышенное количество IL-27, что приводит к нарушению презентации антигенов, включая молекулы патогенного происхождения. Кроме того, известно, что у новорождённых мышей клетки Купфера демонстрируют более низкую фагоцитозную активность, следовательно, позже инициируют процесс миграции макрофагов в печень.

При применении окисленного декстрана первые гранулёмы определяются только с 28-х суток жизни в отличие от таковых в печени мышей 3-й (БЦЖ) группы. Гранулёмы имели макрофагальное строение и располагались преимущественно периваскулярно. К 56-м суткам жизни гранулёмы имели эпителиоидноклеточное строение и располагались как периваскулярно, так и в толще паренхимы печени. На 56-е сутки жизни определяется статистически значимая разница как в размере, так и в количестве гранулём между мышами из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп.

При морфологическом исследовании отмечали, что у мышей, которым вводили раствор вакцины БЦЖ независимо от коррекции окисленным декстраном, наблюдаются дистрофические и некротические изменения гепатоцитов. На 3-и сутки жизни у мышей в печени наблюдалась диффузная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, сохраняющаяся до 10-х суток жизни. С 28-х суток жизни дистрофия приобретала очаговый мелкокапельный характер. Некротические изменения наблюдались только на 3-и сутки эксперимента в виде фокусов некрозов гепатоцитов. При сравнении альтеративных процессов в печени мышей из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп наблюдается статистическое различие на протяжении всего эксперимента.

Дистрофия и некроз гепатоцитов связаны с токсическим воздействием микобактерий и замедленным процессом формирования гранулём. ОД, обладая таким свойством, как лизосомотропизм, может избирательно захватываться клетками и инициировать внутриклеточную регенерацию и восстановление гладкого эндоплазматического ретикулума, так как морфологически вакуольная дистрофия обусловлена повреждением гладкого эндоплазматического ретикулума, увеличением ее проницаемости и накоплением патологических

метаболитов, то есть ОД при токсическом гепатозе обладает выраженным гепатопротекторным эффектом

У мышей, инфицированных микобактериями, которые содержались в вакцине БЦЖ, наблюдается большее количество островков экстрамедуллярного кроветворения на 5-е сутки эксперимента и прогрессивно снижение к 10-м суткам эксперимента. В то время как в 1-й (NaCl) группе снижение количества островков экстрамедуллярного кроветворения более плавное и островки на 10-е сутки эксперимента встречались уже достаточно редко. С 28-х суток эксперимента у мышей линии C57Bl/6 в 3-й (БЦЖ) группе в образцах печени встречаются крайне редкие мелкие островки экстрамедуллярного кроветворения.

Большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения и их более продолжительное существование в печени мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита можно объяснить тем, что количество клеток Купфера у новорожденных мышей меньше, чем у половозрелых, а их фагоцитарная активность снижена. Островки экстрамедуллярного кроветворения в печени содержат преимущественно клетки эритроидного и миелоидного ростка. Тем самым, по-видимому, происходит пролиферация миелоидного ростка кроветворения в печени как компенсаторный процесс на острую нехватку зрелых резидентных макрофагов.

При оценке процессов регенерации у мышей из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп отмечали статистически значимое увеличение числа двуядерных гепатоцитов на 28-е и 56-е сутки жизни, увеличение числа гепатоцитов с фигурами митоза на 56-е сутки жизни. Однако наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии Ki-67 на всём протяжении эксперимента.

Полученные результаты можно объяснить тем, что на протяжении первых 28 суток жизни гранулематозный процесс в печени был выражен недостаточно, и преобладали процессы альтерации.

Известно, что клетки Купфера принимают активное участие в регулировании процесса регенерации печени. Так, высвобождение TNF- α

клетками Купфера может увеличить экспрессию IL-6, дополнительно индуцируя переход клеток печени из фазы G0 в фазу G1 и способствуя пролиферации гепатоцитов. Также было показано, что при блокаде клеток Купфера и повреждении гепатоцитов процессы регенерации гепатоцитов существенно замедлялись.

Предполагается, что многоядерность в гепатоцитах способна защищать гепатоциты от токсического повреждения путем увеличения числа копий функциональных генов; это может быть особенно важно для печени, которая играет основную детоксикационную функцию в организме. Также такой способ пролиферации является более энергоэффективным.

Начиная с 28 суток эксперимента в печени мышей из 3-й (БЦЖ) группы наблюдается разрастание ретикулярных волокон соединительной ткани в виде слепо заканчивающихся тонких тяжей в паренхиме печени, периваскулярно и в виде очагов на месте гранулём. На 56-е сутки эксперимента разрастание коллагеновых волокон наблюдали не только периваскулярно, но и в гранулёмах.

При применении окисленного декстрана отмечается статистически значимое снижение объёма ретикулярных и коллагеновых волокон на месте гранулём на 56-е сутки жизни мышей.

Отсроченный фибропластический процесс в условиях гранулематозного гепатита у мышей линии C57Bl/6 обусловлен тем, что на протяжении эксперимента наблюдается запоздалое формирование гранулём с наиболее яркой картиной на 56-е сутки, где помимо сформированных гранулём наблюдаются очаговая вакуольная дистрофия и микронекрозы гепатоцитов, что говорит об активном воспалительном процессе. В период активного воспалительного процесса преобладают макрофаги 1-го типа, в которых преобладает секреция провоспалительных медиаторов, направленная на поддержание воспаления в тканях с целью уничтожения и элиминации возбудителя. Тогда как противовоспалительные медиаторы секретируются преимущественно макрофагами 2-го типа. Основными цитокинами, участвующими в фибропластическом процессе, являются TGF, IL-4, IL-10, IL-13, стимулируя

экспрессию коллагена-I в фибробластах на периферии гранулём. В этой связи можно предположить, что причиной позднего развития фиброза в печени является отсроченный воспалительный гранулематозный процесс.

Применение окисленного декстрана при гранулематозном гепатите у мышей линии C57Bl/6 сопровождается менее выраженным фиброзом в связи с менее выраженным воспалительным процессом. Кроме того, ОД препятствует сборке коллагена и тем самым препятствует фиброзу путём образования альдегид-альдегидных связей тропоколлагеном, образуя прочные связи и блокируя их соединение. При применении ОД в условиях БЦЖ-гранулематоза отмечается снижение экспрессии цепи $\alpha 1$ коллагена III типа и TGF- β .

ВЫВОДЫ

1. При введении вакцины БЦЖ новорожденным мышам гранулёмы в печени появлялись с 10-х суток жизни, а в условиях применения окисленного декстрана БЦЖ-гранулёмы в печени образовывались на 28-е сутки жизни в меньшем количестве и размере гранулём в сравнении с мышами без применения окисленного декстрана.

2. При введении вакцины БЦЖ наблюдаются выраженные дистрофические изменения в паренхиме печени мышей во все возрастные периоды наблюдения, в условиях применения окисленного декстрана выраженность дистрофических процессов в паренхиме печени значительно уменьшается (в 3,6 раза, $p < 0,05$), с активизацией процессов репаративной регенерации гепатоцитов, сопровождавшейся увеличением количества двухъядерных гепатоцитов (в 2,2 раза, $p < 0,05$) и гепатоцитов с положительной экспрессией Ki-67 (в 6,3 раза, $p < 0,05$).

3. При введении вакцины БЦЖ и применении окисленного декстрана очаги экстрамедуллярного кроветворения в печени мышей сохраняются в большем количестве до 28-х суток жизни.

4. При БЦЖ-гранулематозе фибропластические процессы в печени развиваются преимущественно на месте гранулём; применение окисленного декстрана в условиях БЦЖ-гранулематоза привело к меньшей выраженности фиброза в печени (коллагеновых волокон в 1,5 раза, ретикулярных – в 1,3 раза, $p < 0,05$), что обусловлено, вероятно, меньшими размерами и количеством гранулём.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные результаты могут послужить обоснованием необходимости учёта особенностей воспалительных реакций новорожденных при туберкулёзной инфекции.
2. Гепатопротекторные и лизосомотропные свойства окисленного декстрана могут быть использованы для создания эффективного противотуберкулёзного средства и испытания его на доклиническом этапе.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ОД	окисленный декстран
KK	клетки Купфера
Vv	объёмная плотность структур
N _{ai}	численная плотность профилей структур в площади среза
Mtb	микобактерия туберкулёза
IL	интерлейкин
TLR	толл-подобные рецепторы
TGF	трансформирующий фактор роста
STAT	сигнальный белок и активатор транскрипции

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние экспрессии факторов роста на процесс регенерации печени / А. А. Глухов, А. Ю. Лаптиёва, А. А. Андреев [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2022. – Т. 1, № 133. – С. 15–22.
2. Динамика количества м2 макрофагов при регенерации печени крыс / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов, Н. Ю. Усман [и др.] // Молекулярная медицина. – 2017. – Т. 15, № 1. – С. 45–50.
3. Ельчанинов, А. В. Пролиферативная активность гепатоцитов регенерирующей печени плода крысы / А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова, А. Г. Бабаева // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2012. – № 1. – С. 35–37.
4. Ельчанинов, А. В. Размер гепатоцитов и их ядер в регенерирующей фетальной печени крыс / А. В. Ельчанинов, Г. Б. Большакова // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2011. – Т. 19, № 2. – С. 1.
5. Зиновкина, В. Ю. Ультраструктурные и функциональные особенности внутриклеточной регенерации лизосом гепатоцитов в условиях эксперимента / В. Ю. Зиновкина, Т. Н. Глинская // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 120–121.
6. Ильин, Д. А. Исследование *in vitro* экспрессии рецепторов CD1, CD14, CD25, CD30, CD35, CD95 макрофагами мышей, инфицированных микобактериями туберкулёза / Д. А. Ильин, В. А. Шкурупий, Е. С. Ахраменко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 7. – С. 52–55.
7. Ильин, Д. А. особенности M1/M2-поляризации макрофагов БЦЖ-инфицированных мышей *in vitro* / Д. А. Ильин, В. А. Шкурупий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169, № 4. – С. 449–451.
8. Исследование макрофагов в бцж-гранулемах и различных компартментах системы мононуклеарных фагоцитов / С. А. Архипов,

В. А. Шкурупий, М. В. Соломатина [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 10. – С. 462–465.

9. Исследование фибротических осложнений и концентрации гидроксипролина в печени мышей в различные периоды развития генерализованного БЦЖ-гранулематоза / В. А. Шкурупий, Л. Б. Ким, О. В. Потапова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 4. – С. 463–467.

10. К вопросу о клеточной регуляции регенерации печени / В. В. Базарный, И. Ю. Маклакова, Д. Ю. Гребнев [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2019. – Т. 16, № 3. – С. 357–364.

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

12. Карпов, М. А. Исследование фибротических осложнений в гранулемах при хроническом силикотуберкулезе у мышей / М. А. Карпов, В. А. Шкурупий, А. П. Надеев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. – 149, № 5. – С. 594–597.

13. Ким, Л. Б. Изменение структуры протеогликанов/гликозаминогликанов в печени мышей как проявление ремоделирования внеклеточного матрикса при бцж-индуцированном гранулематозе / Л. Б. Ким, В. А. Шкурупий, А. Н. Путятин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 9. – С. 313–317.

14. Клиническая морфология печени: дисплазия, апоптоз, регенерация / В. М. Цыркунов, В. П. Андреев, Н. И. Прокопчик, Р. И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. – 2017. – Т. 1, № 1. – С. 41–52.

15. Лепехова, С. А. Роль фактора роста гепатоцитов в регенерации печени / С. А. Лепехова, К. А. Апарцин, А. И. Искра // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 7, № 1. – С. 187–192.

16. Мозолева, С. П. Вакуолярный аппарат клеток Купфера при

внутриутробном кандидозном инфицировании у новорожденных мышей оппозитных линий СВА и С57Bl/6 / С. П. Мозолева, А. П. Надеев, С. В. Позднякова // Сибирский медицинский вестник. – 2018. – № 4. – С. 19–24.

17. Мозолева, С. П. структурная организация печени и клеток купфера у новорожденных мышей оппозитных линий СВА и С57Bl/6, перенесших хроническую внутриутробную гипоксию / С. П. Мозолева, А. П. Надеев, С. В. Позднякова [и др.] // Уральский медицинский журнал. – 2018. – Т. 2, № 157. – С. 115–120.

18. Морфофункциональные изменения иммунной системы мышей BALB/С и С57Bl/6 при воздействии низкой дозы липополисахарида / М. Е. Диатроптов, О. В. Макарова, С. Н. Серебряков [и др.] // Иммунология. – 2011. – Т. 3. – С. 135–139.

19. Надеев, А. П. Печень и плацента в пери- и постнатальный периоды при патологии: Клинико-экспериментальное исследование / А. П. Надеев, В. А. Шкурупий, И. О. Маринкин. – Новосибирск : Наука, 2014. – 244 с.

20. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году : Государственный доклад. – М. : Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – 299 с.

21. Особенности репаративной регенерации печени неполовозрелых крыс на фоне хронического медикаментозного гепатита / Н. А. Рыкало, О. Ю. Гуминская, М. В. Мнихович // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2016. – Т. 5, № 1. – С. 83–85.

22. Патент 2052219 Российская Федерация, МПК G09В 23/28. Способ моделирования хронического гранулематозного воспаления в печени : № 5007602/14 : заявл. 15.07.1991 : опубл. 10.01.1996 // Архипов С. А., Шкурупий В. А. ; заявитель и патентообладатель Новосибирский медицинский институт. – 4 с.

23. Патент 2569979 Российская Федерация, МПК C08В 37/02. Способ получения окисленного декстрана : № 2014128706/13 ; заявл. 11.07.2014 : опубл.

10.12.2015 / Жарков А. С., Шкурупий В. А., Певченко Б. В., Троицкий А. В., Фролов А. В., Глазев Д. Ю. ; заявитель и патентообладатель АО «Федеральный научно-производственный центр «Алтай», Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины. – 5 с.

24. Патент 2618341 Российская Федерация, МПК C08B 37/02. Способ получения окисленного декстрана : № 2016104238 : заявл. 09.02.2016 : опубл. 03.05.2017 / Шкурупий В. А., Копылов А. Н., Троицкий А. В. ; заявитель и патентообладатель ООО «Генерис Фарм». – 10 с.: ил.

25. Петросян, Т. Р. Клетки участвующие в регенерации печени: стволовые клетки, овальные клетки, клетки Ито, гибридные гепатоциты. Стволовые клетки в генезе ГЦК и лечении цирроза / Т. Р. Петросян // Синергия Наук. – 2017. – № 17. – С. 927–933.

26. Результаты исследования эффективности различных противотуберкулёзных средств и способов лечения мышей с БЦЖ-гранулематозом, численности и локализации микобактерий туберкулёза в печени / А. М. Синявская, В. А. Шкурупий, А. В. Троицкий, А. М. Ковнер // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170, № 8. – С. 205–208.

27. Романова, Л. П. Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс / Л. П. Романова, И. И. Малышев // Вестник Чувашского университета. – 2011. – № 3. – С. 398–402.

28. Рыкало, Н. А. Закономерности и особенности репаративной регенерации печени неполовозрелых крыс на фоне хронического медикаментозного гепатита в эксперименте / Н. А. Рыкало, О. Ю. Гуминская // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2014. – Т. 3, № 1. – С. 37–39.

29. Савченков, Ю. И. Постнатальное развитие потомства матерей с отягощённой беременностью : монография / Ю. И. Савченков, С. Н. Шилов. – Красноярск : Универс, ПСК «Союз», 2002. – 368 с.

30. Система моноклеарных фагоцитов в постнатальном периоде у мышей, перенесших внутриутробное кандидозное инфицирование, при экспериментальном туберкулезе / А. П. Надеев, В. А. Шкурупий,

С. В. Позднякова, М. А. Травин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 1. – С. 103–106.

31. Структурная организация печени и звездчатых макрофагов у новорожденных мышей линии СВА и С57В1/6 / С. П. Мозолева, А. П. Надеев, С. В. Позднякова, С. В. Залавина // Морфология. – 2017. – Т. 152, № 4. – С. 44–48.

32. Структурные изменения в печени и лёгких мышей при лечении экспериментального туберкулёза липосомальной формой декстразида / В. А. Шкурупий, Л. А. Черданцева, А. В. Ковнер [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 11. – С. 597–601.

33. Структурные изменения в печени плодов от мышей-самок, инфицированных вакциной БЦЖ / Л. А. Черданцева, А. В. Якимова, А. П. Надеев, В. А. Шкурупий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 51. – С. 86–88.

34. Цитоморфологические исследования реакции системы мононуклеарных фагоцитов при гранулематозе смешанной (силикотической и туберкулезной) этиологии в эксперименте / В. А. Шкурупий, А. П. Надеев, М. А. Карпов, Ю. С. Бугримова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 4. – С. 448–451.

35. Цыркунов, В. М. Клиническая морфология печени: редкие и комбинированные поражения / В. М. Цыркунов, Н. И. Прокопчик // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 5. – С. 601–614.

36. Шафигуллина, З. А. Регенераторный ответ гепатоцитов при диффузном токсическом повреждении / З. А. Шафигуллина, И. Ф. Гетте, И. Г. Данилова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 313–322.

37. 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.

38. Шкурупий, В. А. Исследование деструктивных и репаративных процессов в печени при хроническом гранулематозе смешанной (силикотической и туберкулезной) этиологии в эксперименте / В. А. Шкурупий, А. П. Надеев, М. А. Карпов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149, № 6 – С. 622–626.
39. Шкурупий, В. А. Процессы деструкции и фибротические осложнения в печени мышей с БЦЖ-гранулематозом, леченных противотуберкулёзными средствами / В. А. Шкурупий, А. М. Синявская, А. В. Троицкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 170, № 10. – С. 476–481.
40. Шкурупий, В. А. Туберкулёзный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия / В. А. Шкурупий. – М. : Издательство РАМН, 2007. – 536 с.
41. Шкурупий, В. А. Ультраструктура эпителиоидных клеток типа А при бцж-гранулематозе и введении лизосомотропной формы изониазида / В. А. Шкурупий, М. А. Козяев, А. П. Надеев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141, № 4. – С. 474–477.
42. Экспрессия генов белков, сопряженных с фибропластическими процессами, в легких мышей при развитии туберкулезного воспаления / П. М. Кожин, А. В. Чечушков, Н. С. Зайцева [и др.] // Сибирский научный медицинский журнал. – 2019. – Т. 39. – № 4. – С. 22–29.
43. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells / C. Schulz, E. G. Perdiguero, L. Chorro, [et al.] // Science. – 2012. Vol. 336, № 6077. – P. 86–90.
44. A Liver Capsular Network of Monocyte-Derived Macrophages Restricts Hepatic Dissemination of Intraperitoneal Bacteria by Neutrophil Recruitment / F. Sierro, M. Evrard, S. Rizzetto [et al.] // Immunity. – 2017. – Vol. 47, № 2. – P. 374–388.
45. Active transforming growth factor- β is associated with phenotypic changes in granulomas after drug treatment in pulmonary tuberculosis / R. M. DiFazio, J. T. Mattila, E. C. Klein [et al.] // Fibrogenesis & tissue repair. – 2016. – Vol. 9. – P. 6.
46. Acute Inflammation Confers Enhanced Protection against Mycobacterium

tuberculosis Infection in Mice / T. J. Piergallini, J. M. Scordo, P. A. Pino [et al.] // Microbiology spectrum. – 2021. – Vol. 9, № 1. – P. e0001621.

47. Adams, D. O. The granulomatous inflammatory response: a review / D. O. Adams // The American journal of pathology. – 1976. – Vol. 84. – P. 164–169.

48. Anatskaya, O. V. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver / O. V. Anatskaya, A. E. Vinogradov // Genomics. – 2007. – Vol. 89, № 1. – P. 70–80.

49. Anatskaya, O. V. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome / O. V. Anatskaya, A. E. Vinogradov // Functional & integrative genomics. – 2010. – Vol. 10, № 4. – P. 433–46.

50. Andrew, J. Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes / J. Andrew, B. Roediger, W. Weninger // Cellular Immunology. – 2014. – Vol. 291, № 1-2. – P. 22–31.

51. Arginase1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis / J. T. Pesce, T. R. Ramalingam, M. M. Mentink-Kane [et al.] // PLoS pathogens. – 2009. – Vol. 5, № 4. – P. e1000371.

52. Asahina K. Multiplicative mononuclear small hepatocytes in adult rat liver: their isolation as a homogeneous population and localization to periportal zone / K. Asahina // Biochemical and biophysical research communications. – 2006. – Vol. 342, № 4. – P. 1160–1167.

53. Augmenter of liver regeneration promotes hepatocyte proliferation induced by Kupffer cells / C. P. Wang, L. Zhou, S.-H. Su [et al.] // World journal of gastroenterology. – 2006. – Vol. 12, № 30. – P. 4859–4865.

54. Bacillus calmette-guerin infection in NADPH oxidase deficiency: defective mycobacterial sequestration and granuloma formation / C. Deffert, M. G. Schächpi, J. C. Pache [et al.] // PLoS pathogens. – 2014. – Vol. 10, № 9. – P. e1004325.

55. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity / R. Arts, S. J. Cю F. M. Moorlag, B. Novakovic [et al.] // Cell host & microbe. – 2018. – Vol. 23,

№ 1. – P. 89–100.

56. BCGitis and BCGosis in children with primary immunodeficiency – imaging characteristics / S. Shrot, G. Barkai, A. Ben-Shlush, M. Soudack // *Pediatric radiology*. – 2016. – Vol. 46, № 2. – P. 237–245.

57. Beath, S. V. Hepatic function and physiology in the newborn / S. V. Beath // *Seminars in neonatology*. – 2003. – Vol. 8, № 5. – P. 337–346.

58. Bermudez, L. E. Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells / L. E. Bermudez, F. J. Sangari // *Microbes and infection*. – 2001. – Vol. 3, № 1. – P. 37–42.

59. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions / L. Beattie, A. Sawtell, J. Mann [et al.] // *Journal of hepatology*. – 2016. – Vol. 65. – P. 758–768.

60. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells / C. L. Scott, F. Zheng, P. De Baetselier [et al.] // *Nature communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 10321.

61. Cadena, A. M. Heterogeneity in tuberculosis / A. M. Cadena, S. M. Fortune, J. L. Flynn // *Nature reviews. Immunology*. – 2017. – Vol. 17, № 11. – P. 691–702.

62. Cadena, A. M. The Importance of First Impressions: Early Events in Mycobacterium tuberculosis Infection Influence Outcome / A. M. Cadena, J. L. Flynn, S. M. Fortune // *mBio*. – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. e00342–16.

63. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells / B. Smedsrød, P. J. De Bleser, F. Braet [et al.] // *Gut*. – 1994. – Vol. 35, № 11. – P. 1509–1516.

64. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver / Y. Magami, T. Azuma, H. Inokuchi [et al.] // *Liver*. – 2002. – Vol. 22, № 5. – P. 419–425.

65. Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice / B. G. Lopez, M. S. Tsai, J. L. Baratta [et al.] // *Comparative hepatology*. – 2011. – Vol. 10, № 1. – P. 2.

66. Characterization of Liver-Specific Functions of Human Fetal Hepatocytes

in Culture / C. M. Chinnici, F. Timoneri, G. Amico [et al.] // Cell transplantation. – 2015. – Vol. 24, № 6. – P. 1139–1153.

67. Cohn, Z. A. The structure and function of monocytes and macrophages / Z. A. Cohn // Advances in immunology. – 1968. – Vol. 9. – P. 163–214.

68. Coillard, A. In vivo Differentiation of Human Monocytes / A. Coillard, E. Segura // Frontiers in immunology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1907.

69. Combination of mass cytometry and imaging analysis reveals origin, location, and functional repopulation of liver myeloid cells in mice / B. A. David, R. M. Rezende, M. M. Antunes [et al.] // Gastroenterology. – 2016. – Vol. 151. – P. 1176–1191.

70. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis / K. M. Vannella, T. R. Ramalingam, L. A. Borthwick [et al.] // Sci. Transl. Med. – 2016. – Vol. 8 (337). – P. 337ra65.

71. Congenital tuberculosis and management of exposure in neonatal and pediatric intensive care units. The international journal of tuberculosis and lung disease / G. Grisaru-Soen, M. Savyon, E. Sadot [et al.] // the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. – 2014. – Vol. 18, № 9. – P. 1062–1065.

72. Congenital tuberculosis in an extremely preterm infant and prevention of nosocomial infection. Journal of infection and chemotherapy / K. Tamura, H. Kawasuji, S. Tachi, Y. Kawasaki // official journal of the Japan Society of Chemotherapy. – 2019. – Vol. 25, № 9. – P. 727–730.

73. Cotterell, S. E. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha / S. E. Cotterell, C. R. Engwerda, P. M. Kaye // Blood. – 2000. – Vol. 95, № 5. – P. 1642–1651.

74. Craig, C. Extramedullary haematopoiesis in massive hepatic necrosis / C. Craig, A. Quaglia, A. P. Dhillon // Histopathology. – 2004. – Vol. 45, № 5. – P. 518–525.

75. Crawford, C. L. The Epithelioid Cell in Tuberculosis is Secretory and Not a Macrophage / C. L. Crawford // The Journal of infectious diseases. – 2015. – Vol. 212,

№ 7. – P. 1172–1173.

76. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny / M. Guillemins, F. Ginhoux, C. Jakubzick [et al.] // *Nature reviews. Immunology*. – 2014. – Vol. 14, № 8. – P. 571–578.

77. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: Granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism / M. Hesse, M. Modolell, A. C. La Flamme [et al.] // *Journal of immunology*. – 2001. – Vol. 167, № 11. – P. 6533–6544.

78. Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages / M. Ikarashi, H. Nakashima, M. Kinoshita [et al.] // *Journal of leukocyte biology*. – 2013. – Vol. 94, № 6. – P. 1325–1336.

79. Distinct populations of hepatic stellate cells in the mouse liver have different capacities for retinoid and lipid storage / D. N. Dambrosio, J. L. Walewski, R. D. Clugston [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – Vol. 6, № 9. – P. e24993.

80. Dominguez, P. M. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation / P. M. Dominguez, C. Ardavin // *Immunological reviews*. – 2010. – Vol. 234, № 1. – P. 90–104.

81. E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells / S. K. Pandit, B. Westendorp, S. Nantasanti [et al.] // *Nature cell biology*. – 2012. – Vol. 14, № 11. – P. 1181–1191.

82. Eming, S. A. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration / S. A. Eming, T. A. Wynn, P. Martin // *Science*. – 2017. – Vol. 356, № 6342. – P. 1026–1030.

83. Epigenetic Regulation of Kupffer Cell Function in Health and Disease / H. Bennett, T. D. Troutman, M. Sakai, C. K. Glass // *Frontiers in immunology*. – 2021. – Vol. 11. – P. 609618.

84. Fausto, N. Liver regeneration / N. Fausto // *Journal of hepatology*. – 2000. – Vol. 32, №1. – P. 19–31.

85. Flannagan, R. S. The cell biology of phagocytosis / R. S. Flannagan, V. Jaumouillé, S. Grinstein // *Annual review of pathology*. – 2012. – Vol. 7. – P. 61–98.

86. Fortier, M. Incomplete cytokinesis/binucleation in mammals: The powerful system of hepatocytes / M. Fortier, S. Celton-Morizur, C. Desdouets // *Methods in cell biology*. – 2017. – Vol. 137. – P. 119–142.
87. Freeman, S. A. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton / S. A. Freeman, S. Grinstein // *Immunological reviews*. – 2014. – Vol. 262, № 1. – P. 193–215.
88. Fujiyoshi, M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases / M. Fujiyoshi, M. Ozaki // *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. – 2011. – Vol. 18, № 1. – P. 13–22.
89. Functional Differences between Periportal and Perivenous Kupffer Cells Isolated by Digitonin-Collagenase Perfusion / I. Bykov, P. Ylipaasto, L. Eerola, K. O. Lindros // *Comparative hepatology*. – 2004. – Vol. 3, № 1. – P. S34.
90. Geerts, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells / A. Geerts // *Seminars in liver disease*. – 2001. – Vol. 21. – P. 311–335.
91. Geissmann, F. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties / F. Geissmann, S. Jung, D. R. Littman // *Immunity*. – 2003. – Vol. 19, № 1. – P. 71–82.
92. Gentric, G. Polyploidization in liver tissue / G. Gentric, D. Chantal // *The American journal of pathology*. – 2014. – Vol. 184, № 2. – P. 322–331.
93. Global tuberculosis report 2021. – Geneva : World Health Organization, 2021. – 57 p.
94. Gordon, S. Monocyte and macrophage heterogeneity / S. Gordon, P. R. Taylor // *Nature reviews. Immunology*. – 2005. – Vol. 5, № 12. – P. 953–964.
95. Granulomatous liver diseases: a review / M. Coash, F. Forouhar, C. H. Wu, G. Y. Wu // *Journal of the Formosan Medical Association*. – 2012. – Vol. 111, № 1. – P. 3–13.
96. Grijalva, J. Neonatal liver physiology / J. Grijalva, K. Vakili // *Seminars in Pediatric Surgery*. – 2013. – Vol. 22, № 4. – P. 185–189.
97. Halpern, K. B. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of

labour in the mammalian liver / K. B. Halpern // *Nature*. – 2017. – Vol. 542. – P. 352–356.

98. Hamzaoui, A. La tuberculose de l'enfant [Childhood tuberculosis] / A. Hamzaoui // *Revue de pneumologie Clinique*. – 2015. – Vol. 71, № 2-3. – P. 168–180.

99. Harding, C. V. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity / C. V. Harding, L. Ramachandra, M. J. Wick // *Current opinion in immunology*. – 2003. – Vol. 15, № 1. – P. 112–119.

100. Hepatic stellate and endothelial cells maintain hematopoietic stem cells in the developing liver / Y. Lee, J. Leslie, Y. Yang, L. Ding // *Journal of Experimental Medicine*. – 2021. – Vol. 218, № 3. – P. e20200882.

101. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer / C. Yin, K. J. Evason, K. Asahina, D. Y. R. Stainier // *Journal of clinical investigation*. – 2013. – Vol. 123, № 5. – P. 1902–1910.

102. Hepatocyte Polyploidy: Driver or Gatekeeper of Chronic Liver Diseases / R. Donne, F. Sangouard, S. Celton-Morizur, C. Desdouets // *Cancers*. – 2021. – Vol. 13, № 20. – P. 5151.

103. Higashi, T. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis / T. Higashi, S. L. Friedman, Y. Hoshida // *Advanced drug delivery reviews*. – 2017. – Vol. 121. – P. 27–42.

104. Hoeffel, G. Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages / G. Hoeffel, F. Ginhoux // *Cellular immunology*. – 2018. – Vol. 330. – P. 5–15.

105. Huynh, M. L. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation / M. L. Huynh, V. A. Fadok, P. M. Henson // *The Journal of clinical investigation*. – 2002. – Vol. 109, № 1. – P. 41–50.

106. Identification of Erythromyeloid Progenitors And Their Progeny In The Mouse Embryo By Flow Cytometry / L. Iturri, J. Saenz Coronilla, Y. Lallemand, E. Gomez Perdiguero // *Journal of visualized experiments*. – 2017. – Vol. 125. – P. 55305.

107. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF- β

independent / M. Kaviratne, M. Hesse, M. Leusink [et al.] // Journal of immunology. – 2004. – Vol. 173, № 6. – P. 4020–4029.

108. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis / E. Hams, M. E. Armstrong, J. L. Barlow [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2014. – Vol. 111, № 1. – P. 367–372.

109. Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function / B. N. Nakagaki, K. Mafra, É. De Carvalho [et al.] // Journal of hepatology. – 2018. – Vol. 69, № 6. – P. 1294–1307.

110. Increased myelopoiesis during Leishmania major infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism / A. M. Mirkovich, A. Galelli, A. C. Allison, F. Z. Modabber // Clinical and experimental immunology. – 1986. – Vol. 64, № 1. – P. 1–7.

111. Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized / M. J. Marakalala, R. M. Raju, K. Sharma [et al.] // Nature medicine. – 2016. – Vol. 22, № 5. – P. 531–538.

112. Interception of host fatty acid metabolism by mycobacteria under hypoxia to suppress anti-TB immunity / H. Yang, F. Wang, X. Guo [et al.] // Cell discovery. – 2021. – Vol. 7, № 1. – P. 90.

113. Interleukin-13 activates distinct cellular pathways leading to ductular reaction, steatosis, and fibrosis / R. L. Gieseck 3rd, T. R. Ramalingam, K. M. Hart [et al.] // Immunity. – 2016. – Vol. 45, № 1. – P. 145–158.

114. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity / R. M. Reiman, R. W. Thompson, C. G. Feng [et al.] // Infection and immunity. – 2006. – Vol. 74, № 3. – P. 1471–1479.

115. Intrauterine infection, immune system and premature birth / F. R. Helmo, E. A. R. Alves, R. A. de Andrade Moreira [et al.] // The journal of maternal-fetal & neonatal medicine. – 2018. – Vol. 31, № 9. – P. 1227–1233.

116. Iwasaki, A. Control of adaptive immunity by the innate immune system / A. Iwasaki, R. Medzhitov // Nature immunology. – 2015. – Vol. 16, № 4. – P. 343–353.

117. Kawai, T. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors

in infection and immunity / T. Kawai, A. Shizuo // *Immunity*. – 2011. – Vol. 34, № 5. – P. 637–650.

118. Kaye, P. M. Lessons from other diseases: granulomatous inflammation in leishmaniasis / P. M. Kaye, L. Beattie // *Seminars in immunopathology*. – 2016. – Vol. 38, № 2. – P. 249–260.

119. Kim, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis / C. H. Kim // *Journal of blood medicine*. – 2010. – Vol. 1. – P. 13–19.

120. Kinoshita, M. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice / M. Kinoshita // *Journal of hepatology*. – 2010. – Vol. 53, № 5. – P. 903–910.

121. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2021. – Vol. 18, № 3. – P. 151–166.

122. Kupffer Cell Characterization by Mass Cytometry / C. Bleriot, S. Li, M. F. B. M. Kairi [et al.] // *Methods in molecular biology*. – 2020. – Vol. 2164. – P. 87–99.

123. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow derived and sessile hepatic macrophages / I. Klein, J. C. Cornejo, N. K. Polakos [et al.] // *Blood*. – 2007. – Vol. 110. – P. 4077–4085.

124. Kupffer Cells Promote the Differentiation of Adult Liver Hematopoietic Stem and Progenitor Cells into Lymphocytes via ICAM-1 and LFA-1 Interaction / D. Meng, Y. Qin, N. Lu [et al.] // *Stem cells international*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 4848279.

125. Kupffer cells support extramedullary erythropoiesis induced by nitrogen-containing bisphosphonate in splenectomized mice / H. Otsuka H. Yagi, Y. Endo // *Cellular immunology*. – 2011. – Vol. 271, № 1. – P. 197–204.

126. Lagana, S. M. Hepatic granulomas: pathogenesis and differential diagnosis / S. M. Lagana, R. K. Moreira, J. H. Lefkowitz // *Clinics in liver disease*. – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 605–617.

127. Lakdawala, N. Granulomatous diseases: Kids are not just little people /

N. Lakdawala, K. Ferenczi, J. M. Grant-Kels // Clinics in dermatology. – 2017. – Vol. 35, № 6. – P. 555–565.

128. Lamb, G. S. Tuberculosis in Infants and Children / G. S. Lamb, J. R. Starke // Microbiology spectrum. – 2017. – Vol. 5, № 2.

129. Levin, R. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution / R. Levin, S. Grinstein, J. Canton // Immunological reviews. – 2016. – Vol. 273, № 1. – P. 156–179.

130. Liu, C. H. Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion / C. H. Liu, H. Liu, B. Ge // Cellular & molecular immunology. – 2017. – Vol. 14, № 12. – P. 963–975.

131. Liver fibrogenesis: an update on established and emerging basic concepts / E. Novo, C. Bocca, B. Foglia [et al.] // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2020. – Vol. 689. – P. 108445.

132. Liver tetraploidization is controlled by a new process of incomplete cytokinesis / G. Margall-Ducos, S. Celton-Morizur, D. Couton [et al.] // Journal of cell science. – 2007. – Vol. 120, № 20. – P. 3633–3639.

133. Liver-derived signals sequentially reprogram myeloid enhancers to initiate and maintain Kupffer cell identity / M. Sakai, Ty. D. Troutman, J. S. Seidman [et al.] // Immunity. – 2019. – Vol. 51. – P. 655–670.

134. Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection / C. Bleriot, T. Dupuis, G. Jouvion [et al.] // Immunity. – 2015. – Vol. 42. – P. 145–158.

135. Macrophage epithelial reprogramming underlies mycobacterial granuloma formation and promotes infection / M. R. Cronan, R. W. Beerman, A. F. Rosenberg [et al.] // Immunity. – 2016. – Vol. 45. – P. 861–876.

136. Macrophage-associated erythropoiesis and lymphocytopoiesis in mouse fetal liver: ultrastructural and ISH analysis / D. Li, G.-Y. Wang, Z.-F. Liu [et al.] // Cell biology international. – 2004. – Vol. 28, № 6. – P. 457–461.

137. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis / L. A. Borthwick, L. Barron, K. M. Hart [et al.] // Mucosal

immunology. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 38–55.

138. Mafra, K. The liver as a nursery for leukocytes / K. Mafra // *Journal of leukocyte biology*. – 2019. – Vol. 106, № 3. – P. 687–693.

139. Mao, S. A. Liver regeneration / S. A. Mao, J. M. Glorioso, S. L. Nyberg // *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*. – 2014. – Vol. 163, № 4. – P. 352–362.

140. McClean, C. M. Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: lessons from tuberculosis and other diseases / C. M. McClean, M. T. David // *Pathogens and disease*. – 2016. – Vol. 74, № 7. – P. ftw068.

141. Melton, A. C. Hepatic stellate cell protrusions couple platelet-derived growth factor-BB to chemotaxis / A. C. Melton, H. F. Yee // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45, № 6. – P. 1446–1453.

142. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications / G. K. Michalopoulos, B. Bhushan // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2021. – Vol. 18, № 1. – P. 40–55.

143. Microarray analysis of gene expression of mouse hepatocytes of different ploidy / P. Lu, S. Prost, H. Caldwell [et al.] // *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*. – 2007. – Vol. 18, № 9. – P. 617–626.

144. Microenvironments in tuberculous granulomas are delineated by distinct populations of macrophage subsets and expression of nitric oxide synthase and arginase isoforms / J. T. Mattila, O. O. Ojo, D. Kepka-Lenhart [et al.] // *Journal of immunology*. – 2013. – Vol. 191, № 2. – P. 773–784.

145. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver / S. H. Hsu, E. R. Delgado, P. A. Oter [et al.] // *Hepatology*. – 2016. – Vol. 64, № 2. – P. 599–615.

146. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis in chronic liver diseases / C. Rosso, G. P. Caviglia, R. Younes, D. G. Ribaldone // *Minerva Biotechnol.* – 2020. – Vol. 32. – P. 121–127.

147. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior / C. Auffray, M. Shiokawa, T. Ueki [et al.] // *Science*. – 2007. – Vol. 317, № 5838. – P. 666–670.

148. Mosser, D. Exploring the full spectrum of macrophage activation / D. Mosser, J. Edwards // *Nature reviews. Immunology*. – 2008. – Vol. 8, № 12. – P. 958–69.
149. Naito, M. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells / M. Naito, G. Hasegawa, K. Takahashi // *Microscopy research and technique*. – 1997. – Vol. 39, № 4. – P. 350–364.
150. Network calisthenics: control of E2F dynamics in cell cycle entry / J. V. Wong, P. Dong, J. R. Nevins [et al.] // *Cell cycle*. – 2011. – Vol. 10, № 18. – P. 3086–3094.
151. Newberry, D. M. Congenital Tuberculosis: A New Concern in the Neonatal Intensive Care Unit. *Advances in neonatal care* / D. M. Newberry, T. Robertson Bell // official journal of the National Association of Neonatal Nurses. – 2018. – Vol. 18, № 5. – P. 341–349.
152. Nguyen, L. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages / L. Nguyen, J. Pieters // *Trends in cell biology*. – 2005. – Vol. 15, № 5. – P. 269–276.
153. Nonclassical Monocytes in Health and Disease / P. B. Narasimhan, P. Marcovecchio, A. A. J. Hamers, C. C. Hedrick [et al.] // *Annual review of immunology*. – 2019. – Vol. 37. – P. 439–456.
154. Okabe, Y. Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages / Y. Okabe, R. Medzhitov // *Cell*. – 2014. – Vol. 157. – P. 832–844.
155. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin / S. Tamoutounour, M. Guillemins, F. Montanana Sanchis [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39, № 5. – P. 925–938.
156. Ostrowski, P. Diffusion Barriers, Mechanical Forces, and the Biophysics of Phagocytosis / P. Ostrowski, S. Grinstein, S. A. Freeman [et al.] // *Developmental cell*. – 2016. – Vol. 38, № 2. – P. 135–146.
157. Ozaki, M. Cellular and molecular mechanisms of liver regeneration: Proliferation, growth, death and protection of hepatocytes / M. Ozaki // *Seminars in cell*

& developmental biology. – 2020. – Vol. 100. – P. 62–73.

158. Pagan, A. J. The Formation and Function of Granulomas / A. J. Pagan, L. Ramakrishnan // *Annual review of immunology*. – 2018. – Vol. 36. – P. 639–665.

159. Papadimitriou, J. M. The origin, properties and fate of epithelioid cells / J. M. Papadimitriou, W. G. Spector // *The Journal of pathology*. – 1971. – Vol. 105, № 3. – P. 187–203.

160. Papadimitriou, J. M. The ultrastructure of high- and low-turnover inflammatory granulomata / J. M. Papadimitriou, W. G. Spector // *The Journal of pathology*. – 1972. – Vol. 106, № 1. – P. 37–43.

161. Parola, M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues / M. Parola, M. Pinzani // *Molecular aspects of medicine*. – 2019. – Vol. 65. – P. 37–55.

162. Paucibacillary tuberculosis in mice after prior aerosol immunization with *Mycobacterium bovis* BCG / E. L. Nuermberger, T. Yoshimatsu, S. Tyagi [et al.] // *Infection and immunity*. – 2004. – Vol. 72, № 2. – P. 1065–1071.

163. Peritoneal tuberculosis / A. Guirat [et al.] // *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. – 2011. – Vol. 35, № 1. – P. 60–69.

164. Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling / S. Celton-Morizur, G. Merlen, D. Couton, C. Desdouets // *Cell Cycle*. – 2010. – Vol. 9, № 3. – P. 460–466.

165. Polyploidy in liver development, homeostasis and disease / R. Donne, M. Saroul-Aïnama, P. Cordier [et al.] // *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. – 2020. – Vol. 17, № 7. – P. 391–405.

166. Preterm birth and sustained inflammation: consequences for the neonate / A. Humberg, I. Fortmann, B. Siller [et al.] // *Seminars in immunopathology*. – 2020. – Vol. 42, № 4. – P. 451–468.

167. Preterm Twins Born to a Mother with Miliary Tuberculosis: Importance of Early Recognition and Prompt Response in Infection Control to Manage Congenital Tuberculosis Exposure in a Neonatal Intensive Care Unit / B. H. Ryu, E.-H. Baek, D.-H. Kim [et al.] // *Japanese journal of infectious diseases*. – 2021. – Vol. 74, № 2. –

P. 97–101.

168. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos / J. M. Davis, H. Clay, J. L. Lewis [et al.] // *Immunity*. – 2002. – Vol. 17. – P. 693–702.

169. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens / K. E. Killick, C. Ní Cheallaigh, C. O'Farrelly [et al.] // *Cellular microbiology*. – 2013. – Vol. 15, № 9. – P. 1484–1495.

170. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88 / M. Schnare, A. C. Holt, K. Takeda [et al.] // *Current biology*. – 2000. – Vol. 10, № 18. – P. 1139–1142.

171. Rosales, C. Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity / C. Rosales, E. Uribe-Querol // *BioMed research international*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 9042851.

172. Sasaki, K. Origin and fate of the central macrophages of erythroblastic islands in the fetal and neonatal mouse liver / K. Sasaki, H. Iwatsuki // *Microscopy research and technique*. – 1997. – Vol. 39, № 5. – P. 398–405.

173. Saviano, A. Single-cell genomics and spatial transcriptomics: Discovery of novel cell states and cellular interactions in liver physiology and disease biology / A. Saviano, N. C. Henderson, T. F. Baumert // *Journal of hepatology*. – 2020. – Vol. 73, № 5. – P. 1219–1230.

174. Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hemopoiesis of the fetal and early postnatal mouse: a semithin light- and electron-microscopic study / K. Sasaki, H. Iwatsuki, M. Suda, C. Itano // *Acta anatomica*. – 1993. – Vol. 147, № 2. – P. 75–82.

175. Shao, Y. Congenital and Perinatal Tuberculosis / Y. Shao, J. R. Hageman, S. T. Shulman // *NeoReviews*. – 2021. – Vol. 22, № 9. – P. 600–e605.

176. Shetty, A. K. Childhood sarcoidosis: A rare but fascinating disorder / A. K. Shetty, A. Gedalia // *Pediatric rheumatology online journal*. – 2008. – Vol. 6. – P. 16.

177. Single cell RNA sequencing identifies subsets of hepatic stellate cells and

myofibroblasts in liver fibrosis / O. Krenkel, J. Hundertmark, T. P. Ritz [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8, № 5. – P. 503.

178. Sonoda, Y. Hepatic extramedullary hematopoiesis and macrophages in the adult mouse: histometrical and immunohistochemical studies / Y. Sonoda, S. Kazunobu // Cells, tissues, organs. – 2012. – Vol. 196, № 6. – P. 555–564.

179. Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis / E. Mass, I. Ballesteros, M. Farlik [et al.] // Science. – 2016. – Vol. 353, № 6304. – P. aaf423.

180. Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche / J. Bonnardel, W. T'Jonck, D. Gaublomme [et al.] // Immunity. – 2019. – Vol. 51. – P. 638–654.

181. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing / P. L. Lin, C. B. Ford, M. T. Coleman [et al.] // Nature medicine. – 2014. – Vol. 20, № 1. – P. 75–79.

182. Tacke, F. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis / F. Tacke, H. W. Zimmermann // Journal of hepatology. – 2014. – Vol. 60, № 5. – P. 1090–1096.

183. Tacke, F. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets / F. Tacke, G. J. Randolph // Immunobiology. – 2006. – Vol. 211, № 6-8. – P. 609–618.

184. Targeting Molecular Inflammatory Pathways in Granuloma as Host-Directed Therapies for Tuberculosis / R. Guler, M. Ozturk, S. Sabeel [et al.] // Frontiers in immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 733853.

185. TGFbeta Induces Binucleation/Polyploidization in Hepatocytes through a Src-Dependent Cytokinesis Failure / M. De Santis Puzzonia, A. M. Cozzolino, G. Grassi [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 11. – P. e0167158.

186. The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions / B. Prideaux, L. E. Via, M. D. Zimmerman [et al.] // Nature medicine. – 2015. – Vol. 21, № 10. – P. 1223–1227.

187. The Quantification and Significance of Extramedullary Hematopoiesis Seen on Liver Biopsy Specimens / D. Tremblay, S. Saberi, J. Mascarenhas [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. – 2022. – Vol. 158 (2). – P. 277–282.

188. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes / D. Hashimoto, A. Chow, C. Noizat [et al.] // *Immunity*. – 2013. – Vol. 38, № 4. – P. 792–804.

189. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment / Y. Nagai, K. P. Garrett, S. Ohta [et al.] // *Immunity*. – 2006. – Vol. 24, № 6. – P. 801–812.

190. Tsuchida, T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S. L. Friedman // *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. – 2017. – Vol. 14, №. 7. – P. 397–411.

191. Tuberculosis (TB) in pregnancy – A review / N. Orazulike, J. B. Sharma, S. Sharma, Odidika U. J. Umeora // *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. – 2021. – Vol. 259. – P. 167–177.

192. Turk, J. L. The origin, morphology, and function of epithelioid cells / J. L. Turk, R. B. Narayanan // *Immunobiology*. – 1982. – Vol. 161, № 3-4. – P. 274–282.

193. Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subtissular niches / S. Chakarov, H. Y. Lim, L. Tan [et al.] // *Science*. – 2019. – Vol. 363, № 6432. – P. eaau0964.

194. Understanding the tuberculosis granuloma: the matrix revolutions / P. Elkington, M. E. Polak, M. T. Reichmann, A. Leslie // *Trends in molecular medicine*. – 2021. – Vol. 28, № 2. – P. 143–154.

195. Upadhyay, S. Tuberculosis and the art of macrophage manipulation / S. Upadhyay, E. Mittal, J. A. Philips // *Pathogens and disease*. – 2018. – Vol. 76, № 4. – 12 p.

196. van Furth, R. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes / R. van Furth, Z. A. Cohn // *The Journal of experimental medicine*. – 1968. – Vol. 128, № 3. – P. 415–435.

197. Virulent mycobacteria and the many aspects of macrophage uptake / L. Danelishvili, S. L. Cirillo, J. D. Cirillo, L. E. Bermudez // *Future microbiology*. – 2007. – Vol. 2, № 5. – P. 461–464.

198. Wang, J. A reservoir of mature cavity macrophages that can rapidly invade

visceral organs to affect tissue repair / J. Wang, P. Kubes // *Cell*. – 2016. – Vol. 165. – P. 668–678.

199. Wardle, E. N. Kupffer cells and their function / E. N. Wardle // *Liver*. – 1987. – Vol. 7, № 2. – P. 63–75.

200. Weiss, G. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria / G. Weiss, U. E. Schaible // *Immunological reviews*. – 2015. – Vol. 264, № 1. – P. 182–203.

201. Wynn, T. A. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis / T. A. Wynn, K. M. Vannella // *Immunity*. – 2016. – Vol. 44, № 3. – P. 450–462.

202. Young, H. A. Unraveling the pros and cons of interferon-gamma gene regulation / H. A. Young // *Immunity*. – 2006. – Vol. 24, № 5. – P. 506–507.

203. Zhang, X. Macrophage activation by endogenous danger signals / X. Zhang, D. M. Mosser // *The Journal of pathology*. – 2008. – Vol. 214, № 2. – P. 161–178.

204. Zhao, Y. L. Epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis / Y. L. Zhao, R. T. Zhu, Y. L. Sun // *Biomedical reports*. – 2016. – Vol. 4, № 3. – P. 269–274.

205. Ziegler-Heitbrock, L. Toward a refined definition of monocyte subsets / L. Ziegler-Heitbrock, T. P. Hofer // *Frontiers in immunology*. – 2013. – Vol. 4. – P. 23.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1. Рисунок 1 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки эксперимента. Определяется небольшая гранулёма в толще паренхимы печени. Сама гранулёма имеет преимущественно макрофагальное строение. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 400$ С. 46
2. Рисунок 2 – Клетка Купфера мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 5-е сутки эксперимента. Определяется большое количество вакуолей и фаголизосомы, содержащие *m. tuberculosis*. Электронная микроскопия. Увеличение $\times 10\,000$ С. 47
3. Рисунок 3 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 3-и сутки эксперимента. Диффузная крупнокапельная вакуольная дистрофия и некроз гепатоцитов. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение $\times 200$ С. 51
4. Рисунок 4 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 3-и сутки эксперимента. Определяется большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения и частые мегакариоциты. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 53
5. Рисунок 5 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки эксперимента. Очаги экстрамедуллярного кроветворения встречаются редко и имеют малые размеры. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 54
6. Рисунок 6 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 10-е сутки эксперимента. Гепатоциты с позитивной экспрессией Ki-67. Иммуногистохимическая окраска с применением моноклонального антитела Ki-67. Увеличение $\times 400$ С. 57
7. Рисунок 7 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 10-е сутки эксперимента. Ретикулярные волокна в стенках сосудов. Окраска

- импрегнации серебром. Увеличение $\times 200$ С. 59
8. Рисунок 8 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 28-е сутки эксперимента. Эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются преимущественно периваскулярно. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 61
9. Рисунок 9 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента. Эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются плотно между собой в толще паренхимы печени. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 62
10. Рисунок 10 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента. Большое количество гепатоцитов с позитивной экспрессией Ki-67. Иммуногистохимическая окраска с применением антигена Ki-67. Увеличение $\times 200$ С. 66
11. Рисунок 11 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки эксперимента. Ретикулярные волокна в толще гранулёмы. Окраска импрегнации серебром. Увеличение $\times 400$ С. 68
12. Рисунок 12 – Печень мышей 3-й (БЦЖ) группы на 56-е сутки жизни. Коллагеновые волокна в гранулёме. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение $\times 400$ С. 69
13. Рисунок 13 – Печень мыши линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ на 10-е сутки жизни. Очаги вакуольной дистрофии гепатоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 73
14. Рисунок 14 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 28-е сутки эксперимента. Редкие эпителиоидно-клеточные гранулёмы небольших размеров в толще паренхимы печени. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 81
15. Рисунок 15 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 56-е сутки эксперимента. Редкие эпителиоидно-клеточные гранулёмы располагаются преимущественно периваскулярно. Окраска

- гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 400$ С. 81
16. Рисунок 16 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 28-е сутки эксперимента. Ретикулярные волокна в толще гранулёмы. Окраска импрегнации серебром. Увеличение $\times 400$ С. 87
17. Рисунок 17 – Печень мышей 4-й (БЦЖ + ОД) группы на 56-е сутки эксперимента. Коллагеновые волокна определяются в небольшом количестве, преимущественно в краевой зоне гранулёмы. Окраска по Ван-Гизону. Увеличение $\times 400$ С. 88
18. Таблица 1 – Масса печени (г) новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента. С. 45
19. Таблица 2 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 50
20. Таблица 3 – Объёмная плотность (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения и численная плотность (N_{ai}) мегакариоцитов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 52
21. Таблица 4 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии Ki-67 в ядрах гепатоцитов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 56
22. Таблица 5 – Масса печени (г) половозрелых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 60
23. Таблица 6 – Динамика изменения численной плотности (N_{ai}) и диаметра гранулём (мкм) в печени мышей половозрелых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки

- эксперимента ($M \pm m$). С. 62
24. Таблица 7 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у взрослых мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки жизни ($M \pm m$). С. 64
25. Таблица 8 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов и митозов в гепатоцитах у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 66
26. Таблица 9 – Масса печени (г) новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 71
27. Таблица 10 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 74
28. Таблица 11 – Объёмная плотность (V_v) островков экстрамедуллярного кроветворения и численная плотность (N_{ai}) мегакариоцитов в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и при коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 76
29. Таблица 12 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии антигена Ki-67 в ядрах гепатов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 77
30. Таблица 13 – Объёмная плотность (V_v) коллагеновых и ретикулярных волокон в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 78
31. Таблица 14 – Масса печени (г) взрослых мышей линии C57Bl/6 при

- введении вакцины БЦЖ и коррекции ОД с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 79
32. Таблица 15 – Объёмная плотность (V_v) дистрофически измененных гепатоцитов и некротизированных гепатоцитов у новорожденных мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ с 3-х по 10-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 84
33. Таблица 16 – Численная плотность (N_{ai}) двуядерных гепатоцитов, митозов в гепатоцитах и положительной экспрессии антигена Ki-67 в ядрах гепатов у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 85
34. Таблица 17 – Объёмная плотность (V_v) коллагеновых и ретикулярных волокон в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана с 28-х по 56-е сутки эксперимента ($M \pm m$). С. 86