

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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Надеев Александр Петрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Волков Александр Михайлович

(Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е. Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория экспериментальной хирургии и морфологии, ведущий научный сотрудник, г. Новосибирск)

доктор медицинских наук, профессор

Лапий Галина Анатольевна

(Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Институт молекулярной патологии и патоморфологии, лаборатория общей патологии и патоморфологии, заведующий, г. Новосибирск)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Челябинск)

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, ул. Залесского, д. 4; тел. 8 (383) 222-68-35; <http://ngmu.ru/dissertation/540>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

С. В. Залавина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность избранной темы. 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 составила 9,7 на 100 тыс. детей (Global tuberculosis report, 2021). 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 год также имеет общую тенденцию к снижению. Медленнее всего снижение наблюдается в возрастной категории детей от 0 до 1 года (О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году).

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. В литературе подробно описаны иммунологические механизмы, которые обуславливают особенности развития гранулематозных заболеваний у новорожденных (Sarfes C., 2021; Carreto-Binaghi L. E., 2020; Gutierrez-Gonzalez L. H., 2021). Однако практически отсутствуют данные, касающиеся изучения морфологических особенностей, формирующихся при инфицировании микобактериями туберкулёза, в печени новорожденных и его осложнений.

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 (Nataprawira H. M., 2021). В этой связи поиск и разработка новых эффективных противотуберкулёзных лекарственных препаратов является приоритетной задачей современной медицины. Ранее показано, что окисленный декстран (ОД) обладает лизосомотропностью и избирательно захватывается клетками Купфера, активизирует их фагоцитарную активность путём формирования фаголизосом. Пролонгированные формы изониазида (конъюгированный с ОД) являются эффективным противотуберкулёзным средством (Шкурупий В. А., 2019).

Продemonстрировано, что окисленные декстраны обладают слабо выраженным прямым антиоксидантным свойством, 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 (Шкурупий В. А., 2017).

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 (Трунова Г. В., 2011). 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 (Надеев А. П., Шкурупий В. А., Маринкин И. О., 2014; Chinnici C. M., 2015). У новорожденных в печени сохраняется большое количество островков экстрамедуллярного кроветворения, тем самым продолжая занимать важную долю в формировании иммунной системы (Iturri L., 2017; Hoeffel G. 2018; Mafra K. 2019).

Клетки Купфера, которые являются резидентными макрофагами печени, выполняют функцию фагоцитоза, инактивации и элиминации экзо- и эндотоксинов, микроорганозмов. Помимо этих функций клетки Купфера осуществляют взаимодействие с гепатоцитами и иммунными клетками путём секреции различных провоспалительных и противовоспалительных медиаторов (Bennett H., 2021). 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 (Шкурупий В. А., 2007; Kaye P. M., 2016).

Степень разработанности темы исследования. 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 (Шкурупий В. А., 2007, 2010; Ким Л. Б. и др., 2018; Piergallini T. J., 2021; Nuernberger E. L., 2014). Особенности паренхиматозного гепатита и динамика морфологических изменений гранулематоза в возрастном аспекте освещены недостаточно.

В связи с этим необходимо изучить динамику гранулематозного процесса в возрастном аспекте, уточнение влияния туберкулёзной инфекции на печень новорожденных и в другие возрастные периоды жизни, а также исследование возможных осложнений, касающихся прежде всего развития фиброза и цирроза печени.

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 исследования. 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 ОД 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 ОД 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 ОД 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 ОД.

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 ОД.

Полученные данные о патологических изменениях в печени новорожденных мышей могут быть полезны для понимания особенностей патогенеза гранулематозных воспалительных заболеваний у плодов, новорожденных и детей раннего возраста. Оценка эффективности ОД в эксперименте с БЦЖ-гранулематозом позволяет продолжить разработку новых способов лечения и профилактики туберкулёза с учётом морфологических особенностей гранулематозного воспаления 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 ОД 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 при введении вакцины БЦЖ новорожденным мышам линии C57Bl/6 приводит к более позднему формированию гранулём у взрослых мышей, менее выраженным дистрофическим и некротическим изменениям с активизацией репаративных процессов в паренхиме печени.

Степень достоверности. Все использованные методические приемы и способы статистической обработки соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить доступные и достоверные анализы результатов. 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 учённых «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), на 2-м Дальневосточном международном медицинском конгрессе, конференции «Фундаментальные медицинские и биологические науки» (Хабаровск, 2021), на 6-м съезде Российского общества патологоанатомов (Новосибирск, 2022), на 2-й Международной научно-практической конференции «Бородинские чтения», посвященной 85-летию Новосибирского государственного медицинского университета (Новосибирск, 2020), на 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), на Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека имени академика А. П. Авцына) (Москва, 2021), на 16-й Международной научно-практической конференции памяти академика Ю. И. Бородина (Новосибирск, 2021), на 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» Новосибирского государственного медицинского университета (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 кафедры патологической анатомии Новосибирского государственного медицинского университета в темах «Гранулематозное воспаление», «Регенерация», «Туберкулёз».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах и изданиях, включённых в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, из

них 2 статьи в журналах, входящих в международную реферативную базу данных и систем цитирования (Scopus).

Объем 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 соискателя. 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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелые самцы и самки были получены из лаборатории разведения экспериментальных животных «Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (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 Новосибирского государственного медицинского университета. 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. При обнаружении копулятивной пробки во влагалище, беременные мыши-самки перемещались в отдельные клетки. Все манипуляции с инфицированными животными, органами, тканями проводились в боксе с активной вентиляцией.

Эксперимент проводился на 200 новорожденных мышах линии C57Bl/6 массой $(0,86 \pm 0,07)$ г. Мышей разделили на 4 группы: мышам из 1-й (контрольной) группы интраперитонеально вводили 0,02 мл/кг 0,9 % раствор натрия хлорида в 1-е сутки после рождения. Мышам из 2-й (ОД) группы вводили на 2-е сутки после рождения интраперитонеально раствор ОД молекулярной массой 40 кДа (Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск). Мышам из 3-й (БЦЖ) группы в 1-е 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 2-е сутки с момента рождения вводили интраперитонеально раствор ОД 40 кДа.

Для получения образцов печени осуществлялась эвтаназия мышей линии C57Bl/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.

При морфологическом исследовании измерялась масса (г) мышей линии C57Bl/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 (Филимонов П. Н., 1996; Надеев А. П., 1998; Козяев М. А., 1999; Травин М. А., 2006; Шкурупий В. А., 2007). При помощи окуляр-микрометра измеряли диаметры гранулём (мкм). При помощи морфометрической сетки, вставленной в окуляр, подсчитывали численную плотность (Nai) гранулём в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²).

Для оценки фибропластического процесса в условиях гранулематозного гепатита в возрастном аспекте подсчитывалась объемная плотность (Vv) коллагеновых и ретикулярных волокон соединительной ткани.

Для оценки дистрофии и некрозов гепатоцитов подсчитывали объёмную плотность (Vv) паренхимы печени, дистрофически измененных гепатоцитов, очагов некрозов гепатоцитов. Также при применении иммуногистохимического метода исследования подсчитывалась численная плотность (Nai) позитивно окрашенных ядер гепатоцитов при окраске антителом p53.

С целью оценки внутриклеточной регенерации ткани печени подсчитывали численную плотность (Nai) митозов в гепатоцитах, двухъядерных гепатоцитов в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²). При применении иммуногистохимического метода исследования подсчитывалась численная плотность (Nai) позитивно окрашенных ядер гепатоцитов при окраске антителом Ki-67 в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²).

В печени подсчитывали численную плотность (Nai) очагов экстрамедуллярного кроветворения в тестовой площади ($5,6 \times 10^5$ мкм²) для оценки реактивных изменений в печени в условиях введения вакцины БЦЖ и коррекции состояния введением ОД.

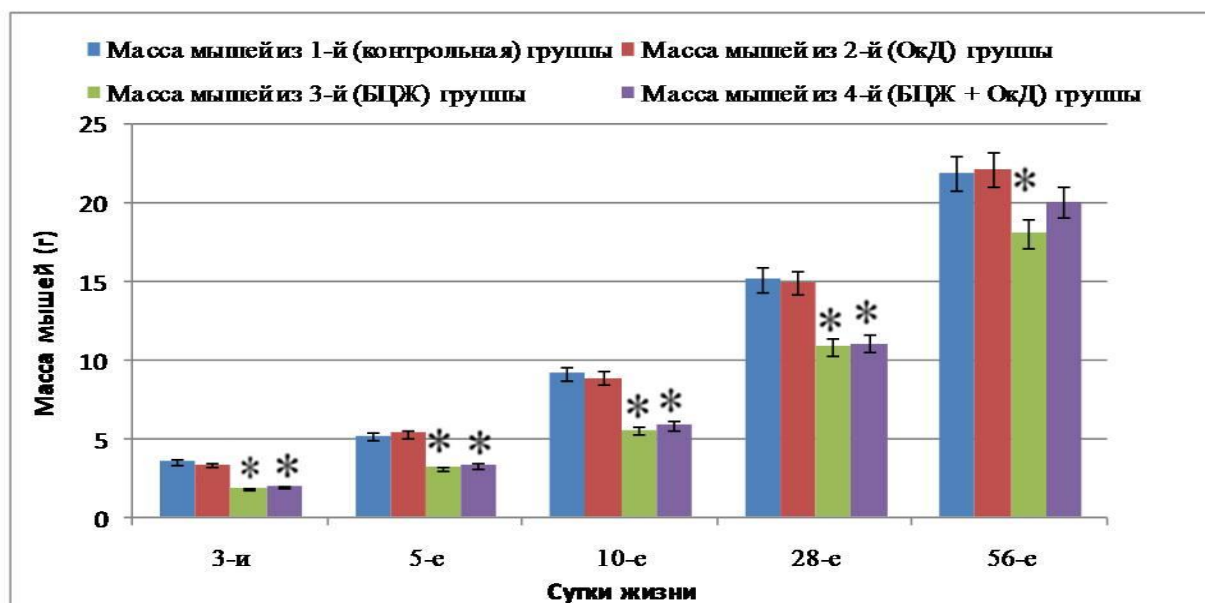
Для электронномикроскопического исследования образцы печени объёмом 1 мм³ в количестве 2-3 от одного животного фиксировали в растворе параформа при температуре 4 °С, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации, заключали в эпоксидные смолы с использованием компонентов из набора SPI-PON 812 KIT (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 (НИИКЭЛ – филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

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 ± 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

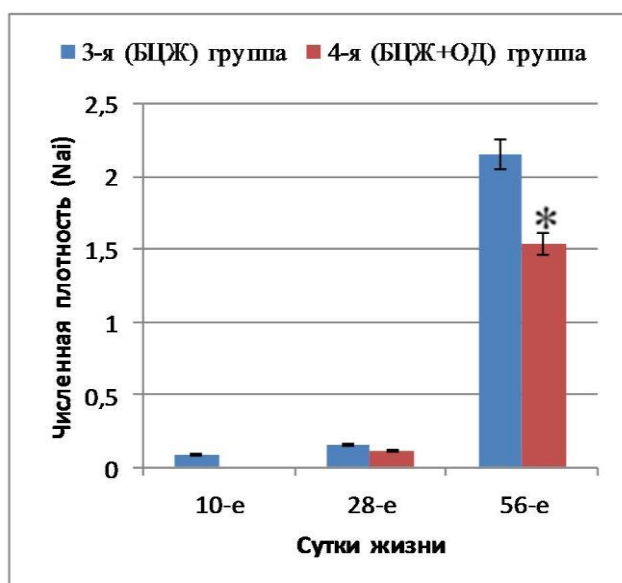
Динамика изменения массы мышей линии C57Bl/6 в условиях БЦЖ-гранулематоза и коррекции окисленным декстраном. Начиная с 3-х суток эксперимента наблюдается двукратная разница в массе между мышатами из 1-й (контрольной) группы и 3-й (БЦЖ) группы с сохраняющейся тенденцией вплоть до 56-х суток жизни мышей. При введении ОД у мышей из 4-й (БЦЖ + ОД) группы наблюдается аналогичная картина в виде дефицита массы тела, который сохраняется до 28-х суток жизни. Однако на 56-е сутки жизни достоверной разницы в массе между мышами из 1-й (контрольной) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп нет (Рисунок 1). 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 ОД на 2-е сутки после рождения не приводит к скорой коррекции массы тела у мышей с БЦЖ-гранулематозом.



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (контрольной) группы ($p < 0,05$).

Рисунок 1 – Масса (г) мышей линии C57Bl/6

Морфологические особенности гранулематозного воспаления в печени новорожденных мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном. У мышей из 3-й группы (БЦЖ) 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 (Рисунки 2 и 3).



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы ($p < 0,05$).

Рисунок 2 – Динамика численной плотности (Nai) гранулём в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и применении окисленного декстрана

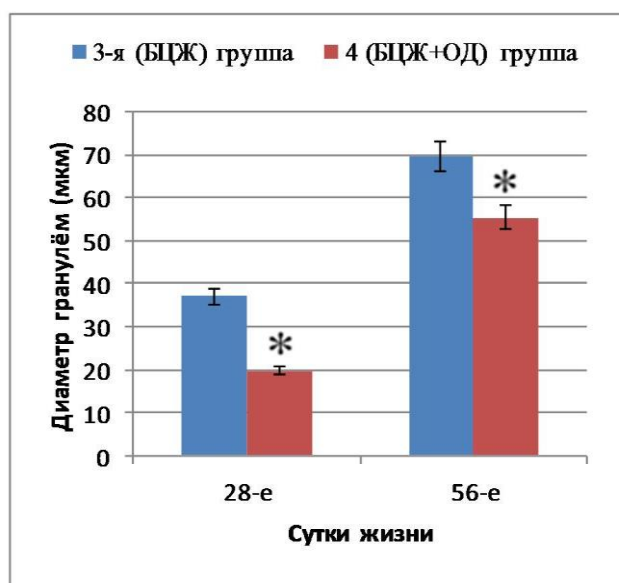


Рисунок 3 – Динамика изменения диаметра гранулём (мкм) в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и применении окисленного декстрана

Отсроченное появление гранулём (на 10-е сутки) после введения на 1-е 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* (Надеев А. П. и др., 2014). Вероятно, что *M. tuberculosis* персистируют в клетках Купфера без образования гранулём. В этой связи проведено электронномикроскопическое исследование клеток Купфера. Показано, что у мышей из 3-й группы (БЦЖ) на 5-е сутки эксперимента в клетках Купфера наблюдалось увеличенное количество вакуолей, а также определялись вторичные фаголизосомы, содержащие *M. tuberculosis*.

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 (Tsafaras G. P., 2020). 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 (Nyati K. K et al., 2017; Ge Y., Huang M., Yao Y. M., 2020).

Кроме того, полный фагоцитоз *M. tuberculosis* резидентными и рекрутированными макрофагами затруднён, а у новорожденных мышей с дефицитом массы тела и невозможен (Helmo F. R., 2018; Khan N., 2016). Микобактерия туберкулёза (Mtb) и родственные виды, такие как *M. marinum*, предотвращают нормальное формирование фаголизосом. Несколько эффекторов позволяют Mtb модулировать созревание фагосом, подрывая нормальную антимикробную способность лизосомального аппарата.

Одним из наиболее важных механизмов бактериальной персистенции в макрофаге является система секреции Mtb ESX-1 типа VII. Система секреции ранней секреторной антигенной мишени ESX-1 выделяет ряд эффекторов, включая такие факторы патогенности, как пептиды ESAT-6 и CFP-10. Фактор вирулентности ESAT-6 участвует в разрыве мембраны фагосомы. Повреждение фагосомы имеет решающее значение для выживания, а также поддержания и усиления воспалительной реакции. 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 (Upadhyay S., 2018; Weiss G., 2015).

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 гранулемам.

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 (Mosser D., 2008). В условиях БЦЖ-гранулематоза макрофаги поляризуются преимущественно по M2 пути, что приводит в дальнейшем к трансформации этих клеток в эпителиоидные клетки (Ильин Д. А., 2020) и образованию эпителиоидноклеточных гранулём.

При применении ОД 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.

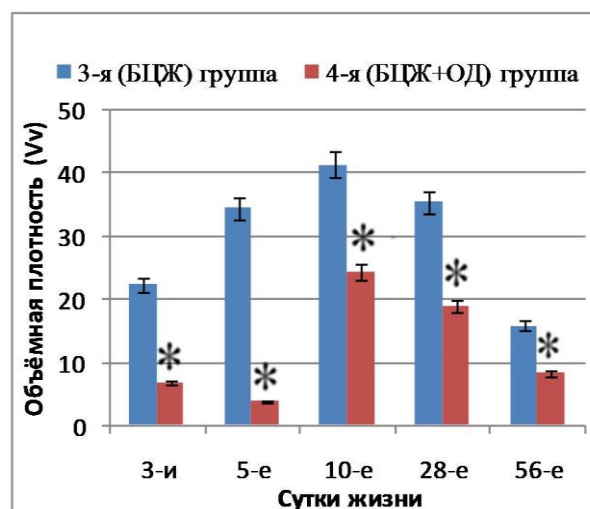
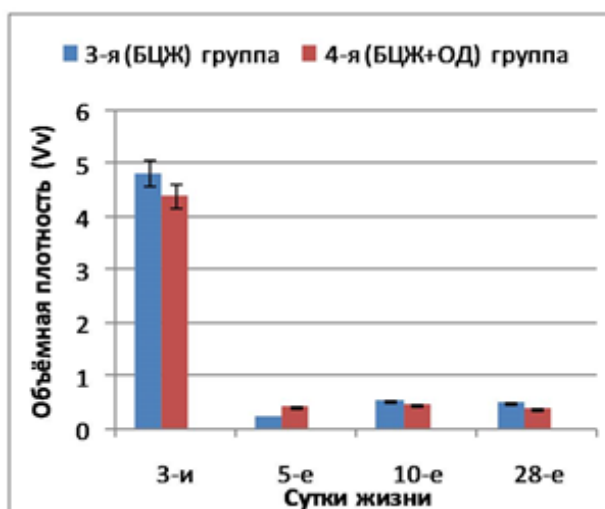
Клетки Купфера являются резидентными макрофагами и гранулёмобразующими клетками. Окисленный декстран способствует ускорению процесса фаголизосомного слияния путём усиления NO-синтетазной активности, преобладанию классически-активированных макрофагов и элиминации возбудителя и тем самым приводит к уменьшению гранулёмогенеза. Также описан такой процесс, как экспрессия катепсинов В и D макрофагами *in vitro* при исследовании влияния липосомальной формы конъюгированного декстрана и изониазида (декстразида) (Нещадим Д. В., 2017). 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 (Nakagaki B. N., 2018). 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 ОД и продолжительной персистенции микобактерий в клетках.

Деструктивные изменения в печени мышей линии C57Bl/6 в условии БЦЖ-гранулематоза и его коррекции окисленным декстраном. При морфологическом исследовании отмечали, что у мышей, которым вводили раствор вакцины БЦЖ независимо от коррекции ОД, 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 (Рисунок 4). 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 (Рисунок 5).



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы ($p < 0,05$).

Рисунок 4 – Объёмная плотность (Vv) дистрофических изменений в гепатоцитах у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана

Рисунок 5 – Объёмная плотность (Vv) некротических изменений в гепатоцитах у мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана

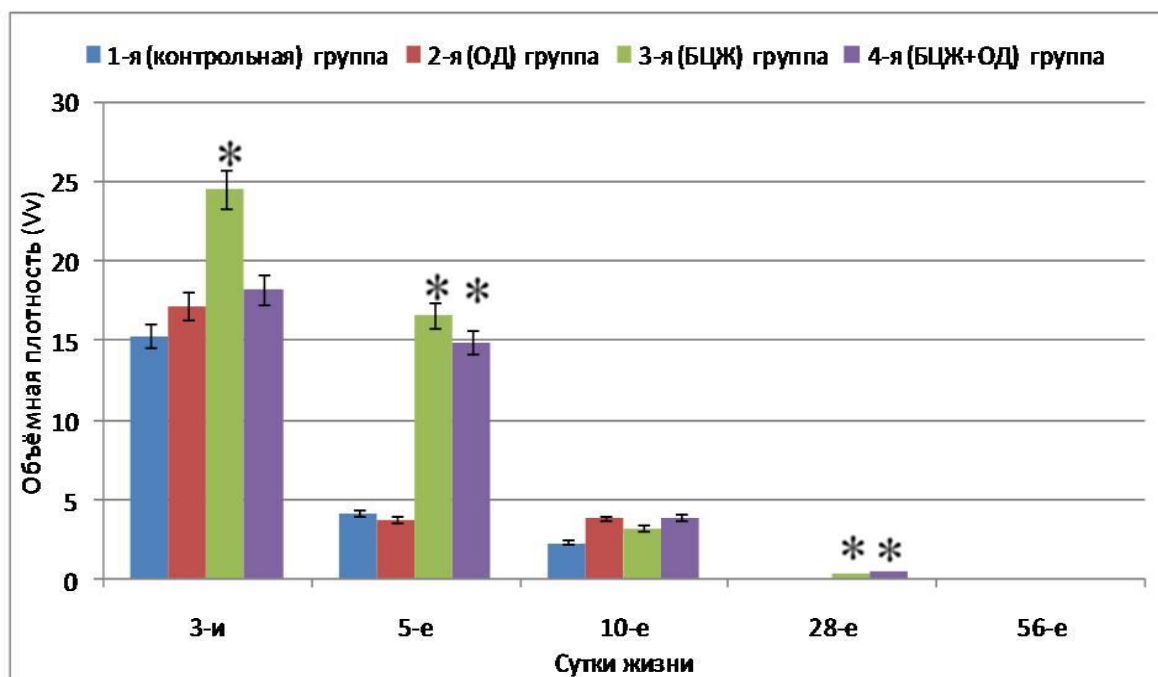
Деструктивные изменения (дистрофические изменения и некроз гепатоцитов) в паренхиме печени связаны с токсическим воздействием микобактерий и замедленным процессом формирования гранулём (Mohareer K., 2018). Так в исследовании наблюдается обратная пропорциональная связь – при появлении гранулём выраженность 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.

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 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.

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 (Шкурупий В. А., 2021).

Морфологические изменения и реакция островков кроветворения при БЦЖ-гранулематозе печени мышей линии C57Bl/6 и при коррекции окисленным декстраном. 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 (контрольной) 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 (Рисунок 6).



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (контрольной) группы ($p < 0,05$).

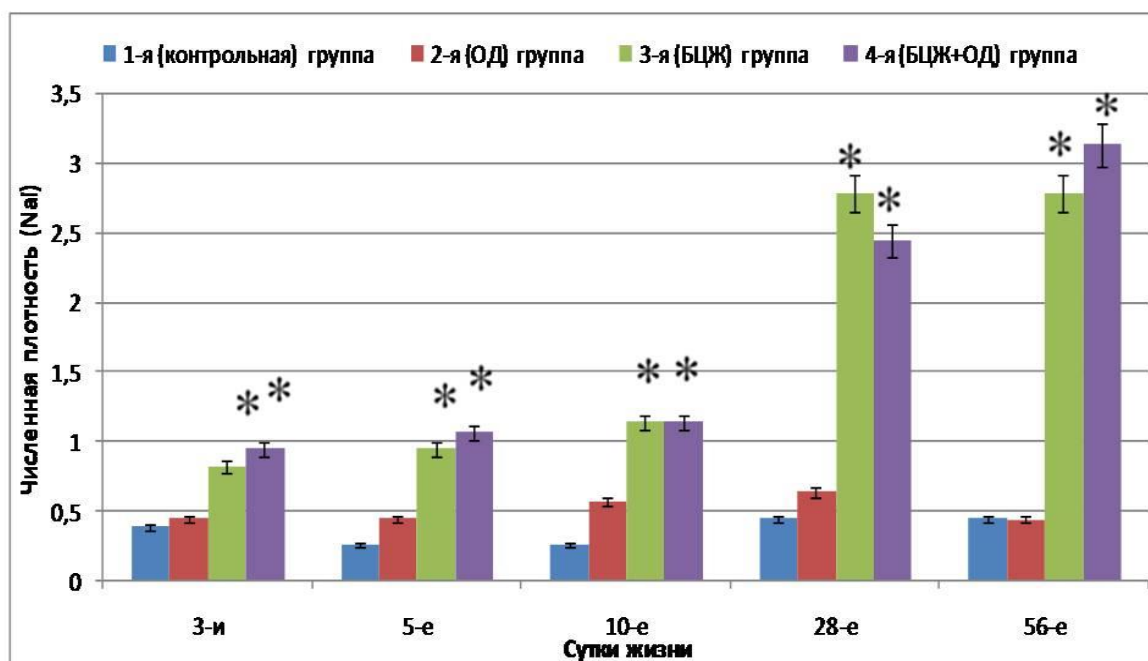
Рисунок 6 – Объёмная плотность (Vv) очагов экстрамедуллярного кроветворения в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана

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 (Jong E., 2017). 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). 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 (Deping M., 2019).

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 (Kim C. H., 2010). 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 (Craig C. et al., 2004).

Особенности и динамика репаративной регенерации гепатоцитов мышей линии C57Bl/6 в условиях гранулематозного гепатита. При оценке процессов регенерации у мышей из 3-й (БЦЖ) и 4-й (БЦЖ + ОД) групп отмечали статистически значимое увеличение числа двухъядерных гепатоцитов на 28-е и 56-е сутки жизни, увеличение числа гепатоцитов с фигурами митоза на 56-е сутки жизни. Однако наблюдалась статистически значимое увеличение экспрессии Ki-67 на всём протяжении эксперимента (Рисунок 7).



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 1-й (контрольной) группы ($p < 0,05$).

Рисунок 7 – Динамика численной плотности (Nai) гепатоцитов с положительной экспрессией Ki-67, мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и при применении ОД ($p \leq 0,05$)

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

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 (Sun X., 2018). Также было показано, что при выключении клеток Купфера и повреждении гепатоцитов скорость восстановления ткани печени существенно замедлялась. Начало регенерации печени обусловлено действием таких цитокинов, как TNF,

NFKB и IL-6. Цитокин TNF (фактор некроза опухоли) связывается с рецепторами клеток Купфера, что приводит к активации и секреции IL-6. Интерлейкин-6 действует на гепатоциты, активируя деление клетки (Fujiyoshi M., 2011).

Как было описано ранее, размеры и количество гранулём в печени мышей прогрессивно увеличиваются 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-м 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 (DiFazio R. M., 2016). 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 IL-10 влияют на способность фибробластов к пролиферации. Цитокины IL-4, IL-13 и TGF β стимулируют экспрессию коллагена-I на периферии гранулём. Факторы преобразователей сигналов и активаторов транскрипции STAT1, STAT3 и NF κ B также относятся к важным медиаторам фибропластического процесса в гранулёмах. Макрофаги с преобладанием фактора STAT1 локализуются как в центре гранулём, так и на периферии и вне гранулём. Макрофаги с преобладанием фактора STAT3 были расположены в центральной и периферической зонах, а макрофаги NF κ B+ располагались только в центре гранулём (Gieseck R. L. et al., 2016).

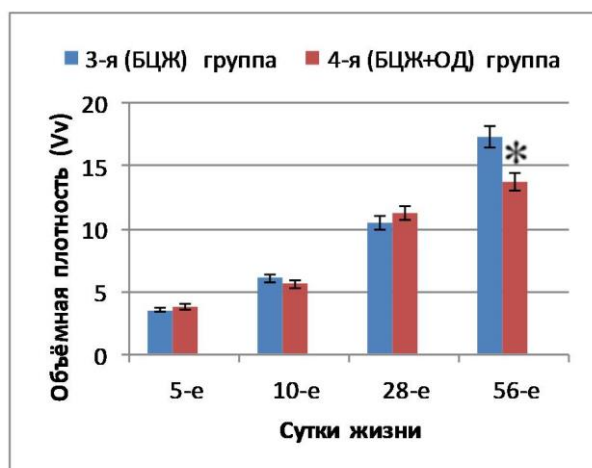
Фибробласты синтезируют компоненты внеклеточного матрикса преимущественно в ответ на цитокины TGF- β 1 или IL-4/IL-13. Каждый из этих цитокинов может продуцироваться отдельными составляющими гранулёмы клетками: моноцитами, резидентными макрофагами, атипичными моноцитами, морфологически напоминающими гранулоциты; CD4+, CD8+ Т-клетками (DiFazio R. M. et al, 2016).

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 провоспалительных 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 (Mosser D., Edwards J., 2008).

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

декстраном. Начиная с 28-х 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 ОД отмечается статистически значимое снижение объёма ретикулярных и коллагеновых волокон на месте гранулём на 56-е сутки жизни мышей (Рисунки 8 и 9).



Примечание: (*) обозначены достоверные отличия средних величин в сравнении с величиной аналогичного показателя у мышей 3-й (БЦЖ) группы ($p < 0,05$).

Рисунок 8 – Объёмная плотность (Vv) ретикулярных волокон в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана

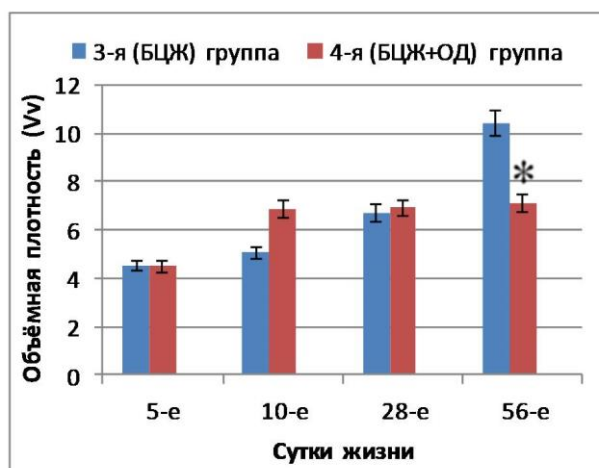


Рисунок 9 – Объёмная плотность (Vv) коллагеновых волокон в печени мышей линии C57Bl/6 при введении вакцины БЦЖ и окисленного декстрана

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 ИК-10, в частности. Так известно, что IL-1 непосредственно активирует дендритные клетки печени, что приводит к стимулированию фиброгенеза в печени (Kisseleva T., Brenner D., 2021).

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 провоспалительных медиаторов, направленная на поддержание воспаления в

тканях с целью уничтожения и элиминации возбудителя. Тогда как противовоспалительные медиаторы секретируются преимущественно макрофагами 2-го типа (Ильин Д. А., Шкурупий В. А., 2020). Основными цитокинами, участвующими в фибропластическом процессе, являются TGF, IL-4, IL-10, IL-13, стимулируя экспрессию коллагена-I в фибробластах на периферии гранулём (DiFazio R. M., 2016). В этой связи можно предположить, что причиной позднего развития фиброза в печени является отсроченный воспалительный гранулематозный процесс.

Применение ОД 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 (Кожин П. М., 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что, начиная с 3-х суток эксперимента, наблюдается двукратная разница в массе между мышатами из 1-й (контрольной) группы и 3-й (БЦЖ) группы с сохраняющейся тенденцией вплоть до 56-х суток жизни мышей. При введении ОД у мышей из 4-й (БЦЖ + ОД) группы наблюдается аналогичная картина в виде дефицита массы тела, который сохраняется до 28-х суток жизни. Однако на 56-е сутки жизни достоверной разницы в массе между мышами из 1-й (контрольной) 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 ОД на 2-е сутки после рождения не приводит к скорой коррекции массы тела у мышей с БЦЖ-гранулематозом.

У мышей из 3-й группы (БЦЖ) 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 C57Bl/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 атака-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 (Tsafaras G. P., Ntontsi P.,

Xanthou G., 2020; Kraft J. D., Horzempa J., Davis C. et al., 2013; Nakagaki B. N., Mafra K., de Carvalho É. et al., 2018).

При применении ОД 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 ОД, наблюдаются дистрофические и некротические изменения гепатоцитов. На 3-и сутки жизни у мышей в печени наблюдалась диффузная крупнокапельная жировая дистрофия гепатоцитов, сохраняющаяся до 1-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. Окисленный декстран, 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 двухъядерных гепатоцитов на 28-е и 56-е сутки жизни, увеличение числа гепатоцитов с фигурами митоза на 56-е сутки жизни.

Однако наблюдалась статистически значимое увеличение экспрессии Ki-67 на всём протяжении эксперимента.

Полученные результаты можно объяснить тем, что на протяжении первых 28-х 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 (Donne R. et al., 2021).

Начиная с 2-х 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 ОД 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 (Ильин Д. А., Шкурूपий В. А., 2020; DiFazio R. M., Mattila J. T., Klein E. C. et al., 2016).

Применение ОД 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 (Кожин П. М., Чечушков А. В., Зайцева Н. С. и др., 2019).

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 и гранулём.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Динамика признаков гранулематозного воспаления печени после введения вакцины БЦЖ у мышей различного возраста / А. П. Надеев, **А. А. Абышев**, Е. В. Овсянко [и др.] // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология**. – 2021. – Т. 190, № 6 – С. 63–68.

2. Структурные изменения в печени мышей при БЦЖ-гранулематозе и применении окисленного декстрана в возрастной динамике / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев, М. А. Дудин, А. Б. Логинова // **Journal of Siberian Medical Sciences**. – 2022. – Т. 6, № 2. – С. 62–73.

3. Надеев, А. П. Исследование морфогенеза гранулём в печени мышей в различные возрастные периоды и при применении окисленного декстрана / А. П. Надеев, **А. А. Абышев**, И. О. Маринкин // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2023. – Т. 175, № 1. – С. 112–116.

4. **Абышев, А. А.** Особенности гранулематозного воспаления у мышей в различные возрастные периоды / **А. А. Абышев** // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины : материалы 5-й Международной морфологической научно-практической конкурс-конференции студентов и молодых ученых, посвященной 80-летию со дня рождения и 50-летию научно-педагогической деятельности Заслуженного деятеля науки РФ, академика РАН, профессора В. А. Шкурупия. – Новосибирск, 2020. – С. 22–25.

5. **Абышев, А. А.** Особенности БЦЖ-гранулемогенеза в печени мышей в возрастной динамике / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Актуальные вопросы современной медицинской науки и практики : сборник работ научно-практической конференции с Международным участием. – Новосибирск, 2020. – С. 24–29.

6. **Абышев, А. А.** Морфологические особенности и структурная организация печени при гранулематозном гепатите у мышей в различные возрастные периоды / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Бородинские чтения : сборник материалов 2-й Международной

научно-практической конференции, посвященной 85-летию Новосибирского государственного медицинского университета. 2 тома. – Новосибирск, 2020. – С. 322–331.

7. **Абышев, А. А.** Возрастная динамика фибропластического процесса в печени при экспериментальном гранулематозном гепатите / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Современная патологическая анатомия : научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития : материалы 4-го съезда патологоанатомов Республики Беларусь с Международным участием. – Минск, 2020. – С 12–16.

8. **Абышев, А. А.** Морфогенез туберкулёзного гранулематоза в печени у мышей, инфицированных в неонатальный период / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Всероссийская научная конференция с Международным участием, посвященная памятной дате института (60-летию НИИ морфологии человека им. академика А. П. Авцына) : сборник материалов. – Москва, 2021. – С. 5–7.

9. **Абышев, А. А.** Динамика БЦЖ-гранулематоза в печени у мышей в различные возрастные периоды / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Лимфология: от фундаментальных исследований к медицинским технологиям : сборник материалов 14-й Международной научно-практической конференции памяти академика Ю. И. Бородина. – Новосибирск, 2021. – С. 15–18.

10. **Абышев, А. А.** Экстрамедулярное кроветворение в печени мышей при БЦЖ-гранулематозном воспалении и применении окисленного декстрана в возрастной динамике / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // Бородинские чтения : сборник материалов 3-й Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию академика РАН Ю. И. Бородина. – Новосибирск, 2022. – С. 21–28.

11. **Абышев, А. А.** Динамика репаративной регенерации гепатоцитов у мышей при гранулематозном гепатите и его коррекции окисленным декстраном в возрастном аспекте / **А. А. Абышев**, А. П. Надеев // 6-й съезд Российского общества патологоанатомов : материалы съезда. – Новосибирск, 2022. – С. 4–6.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ОД	– окисленный декстран
КК	– клетки Купфера
Vv	– объёмная плотность структур
Nai	– численная плотность профилей структур в площади среза
Mtb	– Микобактерия туберкулёза
IL	– интерлейкин