

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина»

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт иммунологии и физиологии
Уральского отделения Российской академии наук

УДК: 616-092

На правах рукописи

ШАФИГУЛЛИНА ЗЛАТА АЛЕКСАНДРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ
ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Данилова Ирина Георгиевна,
доктор биологических наук, доцент

Екатеринбург – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1 – СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РЕГЕНЕРАТОРНОМ ПОТЕНЦИАЛЕ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ НОРМЫ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ (обзор литературы)	15
1.1 – Специфика диффузного токсического повреждения печени при воздействии тетрахлорметана.....	15
1.2 – Особенности регенерации печени в норме и при токсическом повреждении	20
1.2.1 – Паренхиматозные клетки печени и их роль в регенерации	22
1.2.2 – Значение апоптоза и белков теплового шока молекулярной массой 60 и 70 кДа в регенерации печени.....	24
1.2.3 – Роль синусоидальных эндотелиальных клеток, резидентных лимфоцитов и тучных клеток в регенерации печени.....	28
1.2.4 – Роль макрофагов в регенераторных процессах печени	33
1.2.5 – Регуляция регенерации печени факторами роста и цитокинами	39
ГЛАВА 2 – МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных.....	47
2.2 – Моделирование диффузного токсического повреждения печени и способа его коррекции.....	48
2.3 – Исследование биохимических показателей крови	50
2.4 – Оценка гематологических показателей экспериментальных животных	50
2.5 – Гистологическое исследование ткани печени.....	51
2.6 – Иммуногистохимическое исследование ткани печени экспериментальных животных	54
2.7 – Оценка апоптоза в ткани печени экспериментальных животных методом TUNEL.....	58
2.8 – Иммуноферментные методы анализа	58

2.8.1 – Исследование содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных.....	59
2.8.2 – Исследование содержания цитокинов в ткани печени экспериментальных животных.....	59
2.10 – Статистические методы анализа, использованные в работе для обработки экспериментальных данных.....	61
ГЛАВА 3 – ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПЕЧЕНИ НА РАННИХ СТАДИЯХ ДИФFUЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ.....	62
3.1 – Структурные изменения в печени при воздействии тетрахлорметана ..	62
3.2 – Структурные изменения в печени при коррекции токсического повреждения	65
3.3 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени в норме при воздействии тетрахлорметана	66
3.4 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени при коррекции токсического повреждения	68
3.5 – Характеристика альтеративных процессов и апоптоза в ткани печени при токсическом повреждении	69
3.6 – Характеристика альтеративных процессов в ткани печени при коррекции токсического повреждения	71
3.7 – Продукция белков теплового шока 60 и 70 кДа в норме и при токсическом повреждении печени.....	71
3.8 – Продукция белков теплового шока 60 и 70 кДа при коррекции токсического повреждении печени.....	74
3.9 – Коллаген в ткани печени в норме при токсическом повреждении тетрахлорметаном	75
3.10 – Коллаген в ткани печени при коррекции токсического повреждения .	76
Список статей, опубликованных по материалам главы 3.....	78

ГЛАВА 4 – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ЕГО КОРРЕКЦИИ	79
4.1 – Биохимические показатели экспериментальных животных в норме и при токсическом воздействии тетрахлорметана	79
4.2 – Биохимические показатели экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения	82
4.3 – Изменение гематологических показателей у крыс в норме и при токсическом воздействии тетрахлорметана	83
4.4 – Изменение гематологических показателей у крыс при коррекции токсического повреждения	84
Список статей, опубликованных по материалам главы 4.....	88
ГЛАВА 5 – РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СТРОМЫ ПЕЧЕНИ В РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ	89
5.1 – Синусоидальные эндотелиальные клетки в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном	89
5.2 – Синусоидальные эндотелиальные клетки при коррекции токсического повреждения печени	91
5.3 – Макрофаги в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном	91
5.4 – Макрофаги при коррекции токсического повреждения печени	92
5.5 – Тучные клетки в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном	93
5.6 – Тучные клетки при коррекции токсического повреждения печени тетрахлорметаном	95
5.7 – CD 45 ⁺ - и CD 3 ⁺ -лейкоциты в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном	96

5.8 – CD 45 ⁺ - и CD 3 ⁺ -лейкоциты при коррекции токсического повреждения печени.....	98
Список статей, опубликованных по материалам главы 5.....	100
ГЛАВА 6 – ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ.....	101
6.1 – Цитокиновый профиль плазмы крови экспериментальных животных в норме и при токсическом повреждении	101
6.2 – Цитокиновый профиль плазмы крови экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения	103
6.3 – Цитокиновый профиль печени экспериментальных животных в норме и при токсическом повреждении.....	103
6.4 – Цитокиновый профиль печени экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения	105
6.5 – Концентрация фактора стволовой клетки в крови в норме и при токсическом повреждении	105
6.6 – Концентрация фактора стволовой клетки в крови при коррекции токсического повреждении	107
6.7 – Концентрация фактора стволовой клетки в печени при коррекции токсического повреждении	107
6.8 – Концентрация фактора стволовой клетки в печени при коррекции токсического повреждении	108
Список статей, опубликованных по материалам главы 6.....	109
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ.....	117
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	118
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121
ПЕРЕЧЕНЬ ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	149

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Патологии печени занимают ведущее место в структуре гастроэнтерологической смертности. В экономически развитых странах заболевания печени входят в число шести основных причин смерти пациентов, составляя 15-20 случаев на 100 тыс. населения [4]. Применение широкого спектра токсичных веществ в промышленных процессах, таких как производство красок, обезжиривание, обработка металлов, обслуживание и производство в авиационной и автомобильной промышленности, возможные аварии на химических объектах, вероятность террористических актов с применением высокотоксичных соединений, рост числа бытовых интоксикаций определяют необходимость исследования регенераторных процессов печени при токсическом повреждении и поиск новых подходов для терапии заболеваний печени.

К числу самых известных высокотоксичных химических агентов относится тетрахлорметан (CCl_4), который является гепатотропным ядом и потенциальным канцерогеном (IARC группа 2B). На сегодняшний день, несмотря на введенные ограничения по использованию CCl_4 , он применяется в промышленности как растворитель масел, жиров, каучука, битумов, смол, а также для производства менее разрушительных хладагентов [6, 12] и анализа водных сред на нефтепродукты. CCl_4 способен сохраняться в тропосфере до 30-50 лет, а период его химического полураспада в воде при $25^\circ C$ составляет 7000 лет [231]. Токсическое воздействие CCl_4 , в зависимости от дозировки, способно приводить к различным повреждениям печени, включая некроз гепатоцитов, фиброз, цирроз печени и гепатокарциному [191, 185]. В связи с тем, что повреждение печени CCl_4 приводит не только к деструкции гепатоцитов перивенозной зоны, но и носит диффузный характер [18], вовлекая в процесс непаренхиматозные клеточные элементы и внеклеточный матрикс, его можно

считать лучшей репрезентативной экспериментальной моделью для изучения стромально-паренхиматозных взаимодействий и их роли в регенерации.

При CCl_4 -интоксикации сохранившиеся гепатоциты являются основным регенераторным потенциалом. Вместе с этим, регуляция деструктивных и пролиферативных процессов в поврежденной печени во многом зависит от функционального состояния непаренхиматозных клеток [158, 245]. Роль данных клеток в регенерации печени изучена недостаточно, в литературе не представлены данные о их количественном изменении на ранних сроках токсического повреждения. Известно, что синусоидальные эндотелиальные клетки, лимфоциты, тучные клетки, макрофаги являются неотъемлемыми участниками воспалительной реакции [243], развивающейся в ответ на действие гепатотропного яда. Макрофагам печени, обладающим онтогенетической и функциональной гетерогенностью, принадлежит ключевая роль в поддержании гомеостаза и иммунологической толерантности органа в условиях физиологической нормы, а также в регуляции различных стадий патологического процесса при токсическом повреждении [226]. Острое токсическое повреждение печени независимо от вида токсиканта всегда сопровождается макрофагальной инфильтрацией [113]. Установлено, что на начальных этапах токсического повреждения печени преобладают M1-подобные макрофаги, обеспечивающие санацию очага воспаления, за счет фагоцитоза и привлечения нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов. Завершающие стадии воспалительного процесса сопровождаются переходом макрофагов к M2-подобному фенотипу, что способствует ангиогенезу и регенерации [154, 156, 162]. Несмотря на противоположные функции подмножеств макрофагов печени в прогрессировании заболевания или его регрессии, они являются перспективной мишенью для новых терапевтических подходов в гепатологии. В качестве агента, изменяющего активность макрофагов, может быть выбрана натриевая соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона (АФГ, аминофталгидразид натрия), идентификационный номер в PubChem 9794222.

АФГ изменяет функционально-метаболическую активность макрофагов, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов [21].

Таким образом, определение количественного соотношения непаренхиматозных клеток в ткани печени, таких как макрофаги, лейкоциты, тучные и синусоидальные эндотелиальные клетки, а также оценка локального и системного уровня биологически активных медиаторов может иметь важное значение при разработке эффективных стратегий терапии токсических повреждений.

Цель исследования – охарактеризовать регенераторные процессы в печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекции.

Задачи исследования:

1. Определить регенераторную стратегию гепатоцитов при действии гепатотропного яда тетрахлорметана.

2. Выявить характер альтеративных изменений и реакцию белков теплового шока массой 60 и 70 кДа в гепатоцитах при диффузном токсическом повреждении печени.

3. Оценить реакцию клеточного компонента стромы ($CD45^+$, $CD3^+$ лейкоцитов, F4/80 макрофагов, синусоидальных эндотелиальных и тучных клеток) в регуляции регенераторных процессов печени при диффузном токсическом повреждении.

4. Провести сравнительный анализ особенностей локального и системного цитокинового профиля при диффузном токсическом повреждении печени.

5. Оценить возможность коррекции регенераторных процессов в печени аминофталгидразидом натрия при ее токсическом повреждении.

Научная новизна. В рамках данного исследования впервые на ранних стадиях токсического повреждения печени CCl_4 и его коррекции путем воздействия на макрофаги аминофталгидразидом натрия (АФГ) проведена комплексная морфометрическая оценка стромально-паренхиматозных изменений и представлена динамика количественного изменения основных

непаренхиматозных клеток ($CD3^+$, $CD45^+$ лейкоциты, тучные клетки, синусоидальные эндотелиальные клетки, макрофаги F4/80).

Установлено, что повреждающее действие гепатотропного яда в ранние сроки характеризуется увеличением индекса альтерации, апоптозом гепатоцитов, накоплением гранул белков теплового шока в цитоплазме клеток печени. Механизмы регенерации печени проявляются в виде компенсаторно-приспособительных реакций, которые выражаются в повышении метаболической активности сохранившихся гепатоцитов, усилении внутриклеточной регенерации за счет увеличения количества двуядерных гепатоцитов и клеточной регенерации, характеризующейся увеличением митотически делящихся гепатоцитов.

Подтверждено, что увеличение количества непаренхиматозных клеток печени, таких как $CD3^+$, $CD45^+$ лейкоциты, тучные клетки, сопровождается развитием острой воспалительной реакции и усилением фиброгенеза. Синусоидальные эндотелиальные клетки и макрофаги печени выступают в роли мишени токсического воздействия.

Впервые проведен сравнительный анализ локального и системного цитокинового профиля в ранние сроки после воздействия гепатотропного яда. В ответ на токсическое повреждение CCl_4 на локальном уровне (в ткани печени) наряду с увеличением количества макрофагов и синусоидальных клеток возрастает концентрации провоспалительных цитокинов $IL-1\alpha$, $IL-18$, $TNF-\alpha$, тогда как на системном уровне (плазма крови) воспалительная реакция развивается за счет повышенной продукции $TNF-\alpha$. Подавление выработки противовоспалительного цитокина $IL-10$ на системном уровне компенсируется путем повышения локальной концентрации данного цитокина. Диффузное повреждение печени сопровождается выбросом фактора стволовой клетки в системный кровоток предположительно в результате повышенного синтеза данного ростового фактора гепатоцитами и печеночными макрофагами, что необходимо для привлечения стволовых клеток из костного мозга к регенерирующему органу.

Воздействие на макрофаги АФГ при CCl_4 -интоксикации способствует увеличению числа макрофагов (F4/80) и синусоидальных эндотелиальных клеток в ткани печени, уменьшает количество очаговых некрозов гепатоцитов, снижает степень фиброза и инфильтрации ткани лейкоцитами $CD3^+$, $CD45^+$. Действие аминоталгидразида (АФГ), обладающего свойством модуляции активности моноцитов-макрофагов и антиокислительной активностью, сопровождается нормализацией биохимических показателей, а также снижением концентрации провоспалительных цитокинов $TNF-\alpha$ и $IL-18$ в плазме крови и уменьшением уровня $IL-6$ и $IFN-\gamma$ в ткани печени. Применение АФГ оказывает протективное действие на гепатоциты при воздействии CCl_4 , что особенно выражено на поздних сроках эксперимента и проявляется в уменьшении числа TUNEL-позитивных гепатоцитов, а также в увеличении количества клеток с гранулами белков теплового шока HSP60, обладающих цитопротекторной функцией.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют общепринятые представления о механизмах регенерации печени на ранних сроках после воздействия гепатотропного яда. Практическая значимость работы обусловлена новыми данными об изменении количественного соотношения непаренхиматозных клеток печени на ранних стадиях диффузного токсического повреждения. Материалы работы могут быть включены в качестве дополнительных клинико-диагностических методов, а также для разработки подходов коррекции токсического повреждения печени, основанных на изменении морфофункционального состояния макрофагов. Теоретические и практические аспекты диссертационной работы могут быть использованы в образовательном процессе для подготовки специалистов медико-биологического профиля.

Положения, выносимые на защиту:

1. При диффузном токсическом повреждении печени усиление процессов альтерации сопровождается возрастанием показателей клеточной и внутриклеточной регенерации, а также повышением метаболической активности

сохранившихся гепатоцитов. Уменьшение количества синусоидальных эндотелиальных клеток и макрофагов печени, которые являются реактивным компонентом стромы, свидетельствует о том, что данные типы клеток выступают в роли мишени токсического воздействия.

2. При интоксикации CCl_4 апоптоз является одним из механизмов гибели гепатоцитов, о чем свидетельствует увеличение количества TUNEL-позитивных клеток по мере возрастания срока воздействия токсиканта. Увеличение содержания HSP70 в гепатоцитах на 3 сутки и HSP60 на 7 сутки при воздействии токсиканта можно рассматривать как адаптивную реакцию, предотвращающую избыточный апоптоз гепатоцитов.

3. В ответ на токсическое повреждение на локальном уровне (в ткани печени) иммунный ответ обусловлен увеличением концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-18, TNF- α , тогда как на системном уровне (плазма крови) воспалительная реакция развивается за счет повышенной продукции TNF- α . Подавление выработки противовоспалительного цитокина IL-10 на системном уровне компенсируется путем повышения локальной концентрации данного медиатора.

4. Применение метода коррекции, с использованием аминофталгидрида, способствует снижению лейкоцитарной инфильтрации, нивелирует воспалительные процессы в печени за счет влияния на секреторную активность иммунокомпетентных клеток, уменьшая концентрацию провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-18 в плазме крови и IL-6, IFN- γ в гомогенатах, что снижает апоптоз, фиброз, тяжесть холестаза и приводит к нормализации синтеза белка.

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе курса «Патохимия, диагностика» на кафедре медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», а также в научных разработках лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН.

Достоверность полученных результатов. Теоретические заключения, положенные в основу работы, выведены на основании анализа большого объёма современной научной литературы по исследуемому вопросу, что определяет направление исследования. Степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом выборки, использованием современных высокоинформативных методов (биохимические методы исследования, иммуноферментный анализ, иммуногистохимическое окрашивание) и высокотехнологичного оборудования, а также адекватных критериев для статистической обработки результатов. Полученные результаты не противоречат данным, представленным в независимых источниках другими авторами. Научные положения и выводы, сформулированные в работе, соответствуют заявленной цели и задачам.

Личный вклад автора. Соискатель степени кандидата биологических наук Шафигуллина З. А. принимала непосредственное участие в выполнении всех этапов диссертационного исследования. Экспериментальная часть, поиск и анализ литературы по теме исследования, статистическая обработка результатов, написание и оформление диссертации выполнено автором самостоятельно. Результаты исследования в виде публикаций в научных периодических изданиях и докладов на конференциях представлены совместно с соавторами.

Апробация работы. Основные положения и результаты исследования доложены на I Международной (71 Всероссийской) научно-практической конференции молодых учёных и студентов «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения» (Россия, г. Екатеринбург, 2016 г.), «Первой Всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Россия, г. Санкт-Петербург, 2017 г.), XVI Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Россия, г. Санкт-Петербург, 2017 г.), V съезде Российского общества патологоанатомов (Россия, Челябинск, 2017 г.), XI Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2019» (Россия, г. Пермь, 2019 г.), 2020 Уральском

Симпозиуме по Биомедицинской Инженерии, Радиоэлектронике и Информационным Технологиям (2020 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology (USBREIT)) (Россия, г. Екатеринбург, 2020 г.), Международной конференции «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» (Россия, г. Екатеринбург, 2020 г.), Второй всероссийской научной конференции «Токсикология и радиобиология XXI века» (Россия, г. Санкт-Петербург, 2020), Научно-практической конференции с международным участием «Путь в науку», (Россия, г. Москва, 2020), Научно-практической конференции с международным участием «Применение высоких инновационных технологий в профилактической медицине» (Республика Узбекистан, г. Андижан, 2020). Результаты диссертационного исследования были апробированы на VI Международном интеллектуальном конкурсе «Discovery Science: University – 2017» (Россия, Москва, 2017 г.) и отмечены дипломом победителя, представлены на конкурсе работ молодых ученых и специалистов 2019 г. (Организаторы: редакция журнала «Токсикологический вестник» и учредитель журнала «Токсикологический вестник» – ФБУЗ РПОХБВ Роспотребнадзор; Россия, г. Москва, 2019 г.) и отмечены дипломом за лучшую работу в области лекарственной токсикологии.

Публикации. Всего по теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 1 статья (Q1), индексируемая в базе данных Web of Science, 2 статьи, индексируемые в базе данных Scopus, 6 статей в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ, 3 – тезисы докладов российских и международных конференций.

Конкурсная поддержка. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90012 и бюджетной программы ИИФ УрО РАН № Гос. регистрации – АААА-А18-118020590107-0.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 151 странице печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания экспериментальных животных и методики эксперимента, 4 глав с результатами собственных исследований, заключения, выводов и списка использованной

литературы, включающего 250 источников, среди которых 44 русскоязычных и 206 англоязычных. Работа содержит 16 таблиц и 10 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность к.б.н., старшему научному сотруднику ИИФ УрО РАН Гетте И. Ф. за совместное проведение биохимических исследований, д.м.н., профессору УГМУ Сенцову В. Г. за помощь в дизайне модели токсического повреждения, д.м.н., профессору Абидову М. Т. за предоставление аминофталгидразида натрия, используемого при коррекции токсического повреждения печени. Особую благодарность автор выражает ведущему научному сотруднику ИИФ УрО РАН, к.м.н., доценту Медведевой С. Ю. за неоценимую помощь в моделировании диффузного токсического повреждения и описании патологических изменений печени.

ГЛАВА 1 – СОВРЕМЕННОЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О РЕГЕНЕРАТОРНОМ ПОТЕНЦИАЛЕ ПЕЧЕНИ В УСЛОВИЯХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ НОРМЫ И ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ (обзор литературы)

В экономически развитых странах заболевания печени входят в число шести основных причин смерти пациентов в возрасте от 35 до 60 лет, составляя приблизительно 14-30 случаев на 100 тысяч населения [4]. К числу частых патологий печени относятся острые токсические поражения, осложняющиеся развитием печеночной недостаточности при отравлении гепатотоксичными ядами, приеме больших доз анальгезирующих, противовоспалительных, антибактериальных, антиметаболических и других лекарственных препаратов. Все это определяет необходимость поиска новых резервов, а также методов коррекции, направленных на поддержание структурной целостности и функциональной стабильности печени.

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению регенерации печени [30, 169], изменения в органе, которые определяют характер восстановительных процессов на ранних сроках токсического повреждения, остаются недостаточно изученным.

1.1 – Специфика диффузного токсического повреждения печени при воздействии тетрахлорметана

Существует большое количество путей токсического воздействия, что связано с разнообразием потенциальных токсикантов, а также с множеством структур и функций, которые они нарушают. Токсикант, достигший мишени, может напрямую вступать с ней во взаимодействие, вызывая клеточную дисфункцию, а также способен изменять биологическое окружение, воздействуя на молекулы, органеллы, клетки или органы.

Проявление токсичности включает 4 основных этапа. Сначала токсикант доставляется к цели или целям и взаимодействует с эндогенными молекулами-мишенями, вызывая изменения функций клетки и/или структур, которые запускают восстановительные механизмы на молекулярном, клеточном и/или тканевом уровнях. Воздействия токсиканта может превышать репаративные возможности и вызывать такие процессы, как некроз, канцерогенез, фиброз, нарушение регуляции апоптоза. Патологические состояние печени, обусловленные действием химических веществ различной природы, можно классифицировать как цитостатические и холестатические. Цитостатические повреждения печени проявляются некрозом, стеатозом, канцерогенезом; холестатические – нарушением секреции желчи и развитием желтухи.

Специфика токсического повреждения печени зависит от вида токсиканта, дозы и продолжительности его воздействия, а также от структурно-функциональной неоднородности органа. В соответствии с реально существующими условиями кровообращения в паренхиме выделяют 3 зоны печеночных клеток в ацинусе: 1 зона состоит из перипортальных клеток, 2 зона – промежуточная и 3 зона из перивенозных / центрлобулярных клеток. Гепатоциты, локализованные в перипортальной зоне (рядом с портальным трактом), получают наиболее оксигенированную и содержащую больше количество питательных веществ кровь. Соответственно, у этих клеток лучше развиты органеллы и высокая ферментативная активность [39].

В гепатоцитах первой зоны осуществляется пиноцитоз и поглощение нутриентов из портальной крови, интенсивнее протекает метаболизм протеинов и синтез плазменных белков, осуществляется экскреция холевых кислот и билирубина. Перивенозные гепатоциты по сравнению с другими клетками дольки обладают высокой активностью изоферментов P-450, в связи с чем преимущественно они ответственны за биотрансформацию ядов, в следствии которой образуется большое количество реакционно-активных метаболитов. Ферментные системы, обеспечивающие конъюгацию и антиоксидантную защиту в этих клетках менее развиты. Поэтому повреждение ксенобиотиками

чаще всего имеет центрлобулярную локализацию и затрагивает гепатоциты перивенозной зоны [222].

На сегодняшний день существует большое количество экспериментальных моделей повреждения печени, обусловленных действием токсичных веществ, к числу которых относится D-галактозамин, ацетаминофен (парацетамол), тетрахлорметан (четырёххлористый углерод), тиоацетамид, конканавалин-А и липополисахарид. Среди токсических моделей широкое распространение получила модель токсического повреждения печени, индуцированная введением CCl_4 [70, 168]. Установлено, что для крыс полулетальная доза (LD50) гепатотропного яда при внутрибрюшинном введении составляет 728,62 мг/кг [66]. CCl_4 представляет собой бесцветную тяжелую летучую жидкость, плохо растворим в воде. Относится к галогенированным углеводородам и является потенциальным канцерогеном (IARC группа 2B) второго класса опасности из пяти [248].

В зависимости от применяемой дозировки CCl_4 способен приводить к различным повреждениям печени, включая некроз гепатоцитов, фиброз, цирроз печени и гепатокарциному [243]. Гепатит, вызванный воздействием CCl_4 , сопровождается снижением всех функций органа: антитоксической, белковой, АТФ-синтетической и холестатической [27, 35].

Гепатотоксический эффект CCl_4 (рисунки 1) обусловлен аутокаталитическим перекисным окислением липидов (ПОЛ), возникающим вследствие воздействия свободных радикалов (CCl_3^* и CCl_3OO^* – трихлорметильный и трихлорметилперокси радикал), образуемых при метаболизме этого соединения в эндоплазматическом ретикулуле (ЭПР) печени под влиянием комплекса оксидаз, состоящего из флавопротеинов, НАДФН-зависимой Р-450 редуктазы, НАДН-цитохром b5 редуктазы и оксидазы цитохрома Р-450. Биотрансформация CCl_4 осуществляется под влиянием цитохромов (СУР)2Е1, СУР2В1, СУР2В2, СУР3А [120].

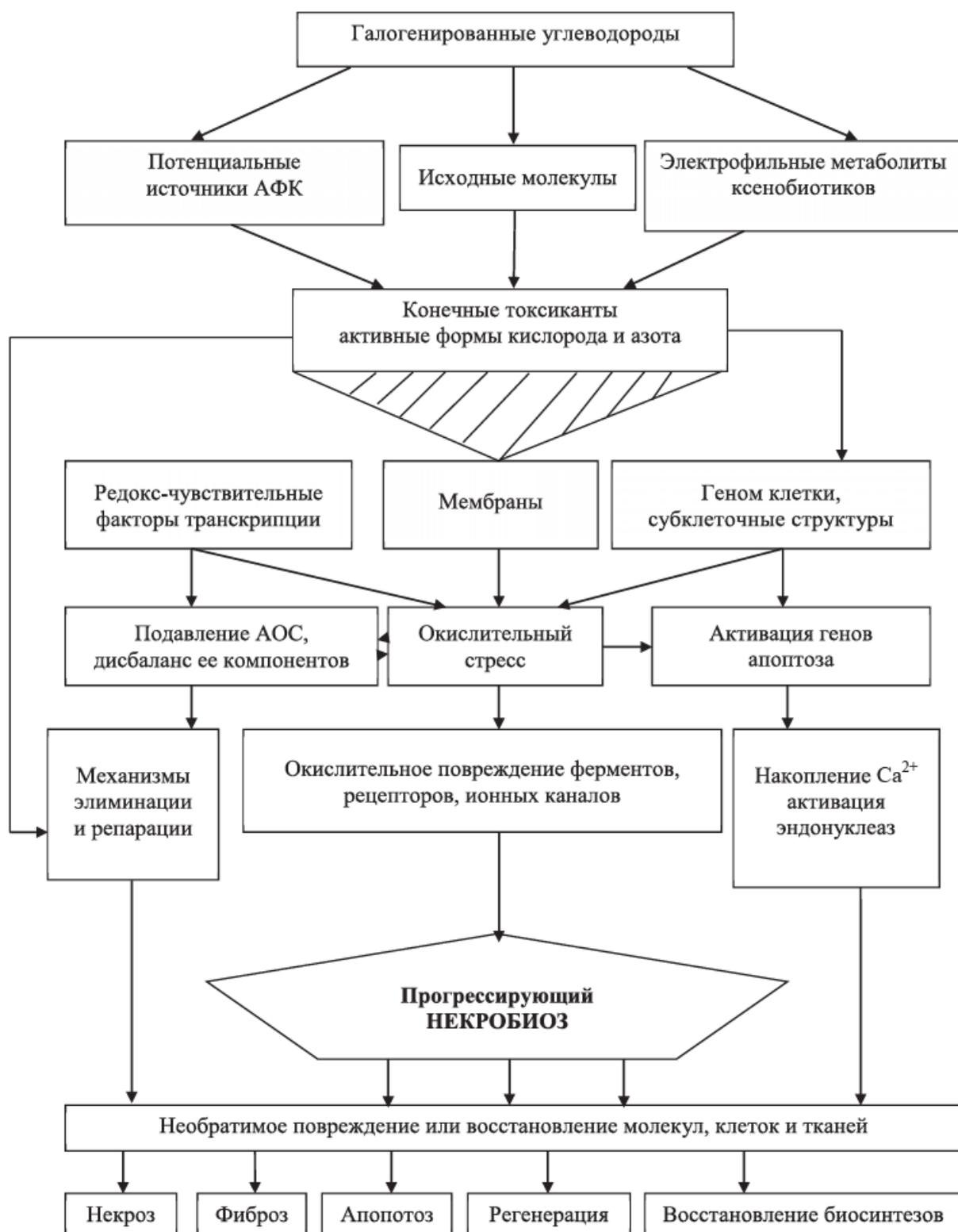


Рисунок 1 – Схема патогенного действия галогенированных углеводородов (Мышкин В.А. и др, 2016 г) [41]

Примечание: АФК – активные формы кислорода, АОС – антиоксидантная система.

Процесс ПОЛ ведет к распаду внутриклеточных мембран ЭПР, митохондрий и лизосом, высвобождению активных ферментов, денатурации белков с последующей гибелью клетки. Свободные радикалы непосредственно

повреждают ферментативные системы [28, 120], а также оказывают прооксидантное действие, что приводит к структурной и функциональной перестройке биологических мембран, повышению их проницаемости для ионов Na^+ , Ca^{2+} , K^+ с последующим пространственным разобщением окислительных цепей. Деструкция ЭПР вызывает массовый выход ионов Ca^{2+} и накопление их в цитозоле, что способствует активации кальций-зависимых фосфолипаз и протеаз, которые разрушают мембраны эритроцитов, приводят к гибели гепатоцитов и других клеток печени.

Вызванное CCl_4 повреждение печени приводит к некрозу, белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в центральной зоне почечной дольки, где максимальна активность зависимых от цитохрома P-450 монооксигеназ и преобладает продукция повреждающих метаболитов гепатотоксина [26]. Так как при воздействии CCl_4 повреждается вся паренхима печени и в патологический процесс вовлечены компоненты стромы такой характер повреждения принято считать диффузным [18].

Неотъемлемым компонентом патогенеза токсических повреждений печени является воспалительная реакция [38]. С одной стороны она может служить фактором, усугубляющим тяжесть течения заболевания, а с другой – ограничивает степень повреждения клеток. Воспаление представляет собой эволюционно сформировавшуюся защитно-приспособительную реакцию, необходимую для поддержания жизнедеятельности. С помощью воспаления обеспечивается локализация и элиминация патологического агента. Воспалительная реакция реализуется за счет сложного комплекса взаимосвязанных процессов. Активация тканевых тучных клеток или их аналогов в крови – базофильных лейкоцитов определяет остроту воспалительной реакции и ее местные проявления (вазодилатацию, усиление проницаемости сосудов и пр.), в то время как секретируемые макрофагами [113] и другими клетками медиаторы (IL-1, IL-6, TNF- α), наряду с местными проявлениями, включают острофазный ответ (лейкоцитарная инфильтрация, образование острофазных белков, стимуляция иммунной системы). Цитокины макрофагов и

эндотелиоцитов IL-1, IL-6, TNF- α , действуя как мембранные рецепторы, усиливают экспрессию генов, кодирующих белки острой фазы. «Положительные» белки острой фазы способствуют уменьшению повреждения тканей и запускают процессы регенерации. Одним из механизмов их действия является ингибирование лизосомальных ферментов. К «отрицательным» белкам острой фазы относятся альбумин, транстиретин, трансферритин, некоторые формы цитохрома P-450 и глутатион-S-трансферазы. Перечисленные белки играют важную роль в детоксикации, а иногда и в усилении токсичности ксенобиотиков, поэтому они влияют на концентрацию и определяют место накопления химических агентов в острую фазу.

Повышенная генерация свободных радикалов при токсическом гепатите, индуцированном CCl₄, всегда сопровождается повреждением клеточных элементов (эндотелиоцитов, миоцитов) сосудов печени и последующими нарушениями гемодинамики и реологических свойств крови [40]. Особенно чувствительны к повреждению эндотелиальные синусоидальные клетки печени.

Таким образом, повреждение печени CCl₄ является многофакторным процессом и включает в себя свободнорадикальные, метаболические, воспалительными и иммунные механизмы.

1.2 – Особенности регенерации печени в норме и при токсическом повреждении

Печень относится к числу органов, в которых в физиологической норме наблюдается клеточная и внутриклеточная форма регенерации [24].

В физиологических условиях продолжительность жизни дифференцированных гепатоцитов исключительно велика, они делятся редко – на 30 тысяч клеток приходится 1 митоз. В норме в печени среднесуточный митотический индекс составляет всего 0,022 %. Вместе с тем, гепатоциты обладают способностью к самоподдержанию на протяжении всей жизни,

обновление происходит медленно, но постоянно. Часть клеток делится атипично (двуядерные гепатоциты составляют 20 %). При отсутствии стимуляции роста, гепатоциты в течение жизни делятся 1-2 раза.

Систематическое изучение регенерации печени млекопитающих позволило выделить две основные модели данного процесса. Первая модель «текущей печени», предполагает наличие клеток-предшественников в области портальных трактов [141, 101]. Эти гипотетические клетки способны дифференцироваться как в холангиоциты, замещающие клетки в желчных путях, так и в гепатоциты, которые продвигаются от перипортальной зоны в направлении центральной вены и тем самым восполняют естественную убыль функционирующих клеток. Согласно второй модели, при регенерации печени в митотический цикл вступают все ее клетки и тем самым происходит восполнение тканей органа [141].

Оценка репаративных процессов в ткани печени при интоксикации CCl_4 показала, что восстановление органа начинается уже через 6 часов после введения токсиканта [243]. Процесс восстановления печени осуществляется в основном за счет пролиферации и полиплоидизации гепатоцитов, при этом непаренхиматозные клетки также играют немаловажную роль [34]. В ответ на повреждение запускаются многочисленные сигнальные пути, связанные с продукцией цитокинов, хемакинов, ядерных рецепторов и факторов роста, индуцируется активность генов, которые не экспрессируются в норме [165]. Первыми повышается продукция про- и противовоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10, которые регулируют вступление гепатоцитов в митотический цикл, а после увеличивается экспрессия факторов роста (HGF, EGF, SCF и др.), обеспечивающих прохождение митотического цикла. После повреждения печени в плазме повышается уровень урокиназы, которая запускает каскад протеолитических реакций, что приводит к деградации межклеточного матрикса печени и последующему высвобождению HGF [168]. Процесс деградации межклеточного матрикса регулируется матриксными металлопротеиназами: MMP-9, MMP-12 и MMP-13 [198, 91].

Нарушение ремоделирования внеклеточного матрикса, при токсическом повреждении, может приводить к усилению синтеза фибриллярных матриксных коллагенов и относительной недостаточности коллагенолитических матриксных протеиназ, что создает условия для прогрессирования фиброза. Нарушение обмена веществ между кровью синусоидов, гепатоцитами и синусоидальными эндотелиальными клетками, уменьшение количества функционирующих гепатоцитов и повышение нагрузки на оставшиеся гепатоциты, десинхронизирует их митотическую активность. В результате усиливается апоптоз сохранившихся гепатоцитов и усугубляется формирование патологических циклов метаболизма в печени, повышается риск развития необратимых изменений [59].

1.2.1 – Паренхиматозные клетки печени и их роль в регенерации

Гепатоциты являются основными функциональными клетками печени, которые обладают высоким пролиферативным потенциалом, могут восстанавливать массу и одновременно выполнять все функции печени, необходимые для поддержания гомеостаза организма [171]. Они составляют от 60 до 80 % всех клеточных элементов печени [210] и формируют паренхиму органа. У человека и крысы гепатоциты имеют неправильную многоугольную форму и часто содержат два ядра. Большинство клеток полиплоидные. Ядра содержат 1-2 ядрышка. Цитоплазма гепатоцитов зернистая и окрашивается не только кислыми, но и основными красителями, содержит большое количество органелл. Прочная механическая связь между клетками обеспечивается за счет комплексов межклеточных соединений. Гепатоциты с большим количеством митохондрий и развитой эндоплазматической сетью синтезируют альбумин, факторы свертывания крови и другие сывороточные белки. Среди продуктов гепатоцитов выделяют желчные кислоты, амфипатические продукты метаболизма холестерина. В дополнение к синтетической активности

гепатоциты играют важную роль в процессах детоксикации благодаря обширному арсеналу детоксифицирующих ферментов (в совокупности называемых ферментами Р-450), которые распознают и модифицируют широкий спектр химических веществ. Помимо переработки токсинов и лекарств, гепатоциты выполняют и другие метаболические функции, включая синтез глутамина, образование мочевины и глюконеогенез.

В большинстве случаев поражения печени, вызванных действием токсикантов, резекцией или острыми вирусными заболеваниями, гепатоциты являются основным типом клеток для пролиферации и регенерации печени. Первый уровень защиты – это покоящиеся (стабильные), зрелые гепатоциты. Гепатоциты обладают низким уровнем репликации (преимущественно находятся в фазе G0), однако в ответ на стимулы, могут подвергаться интенсивному делению и, следовательно, обеспечивать восстановление ткани. Второй уровень защиты – популяция резервных клеток-предшественников, которая также находится с покоящемся состоянии, но активируется, в том случае, когда повреждение серьезное или зрелые гепатоциты больше не способны к делению из-за старения [176].

В печени физиологические и репаративные регенераторные процессы осуществляются как в форме клеточного деления гепатоцитов преимущественно перипортальной зоны ацинуса (зона 1), так и внутриклеточной регенерации, приводящей к компенсаторной гипертрофии гепатоцитов. Для регенерирующей печени характерны также процессы полиплоидизации, которые осуществляются посредством ацитокинетического митоза и бимитоза, а также в результате эндомитоза. В настоящее время предполагают, что повышение плоидности гепатоцитов печени является механизмом защиты наследственного материала от окислительного стресса [55]. При большинстве экстремальных воздействий на организм отмечается снижение митотической активности гепатоцитов и одновременный рост внутриклеточных восстановительных процессов, проявляющийся в увеличении количества двуядерных и полиплоидных клеток [22].

Кроме гепатоцитов к числу паренхиматозных клеток относятся холангиоциты, они представляют собой гетерогенную динамичную популяцию эпителиальных клеток, образующую трехмерную сеть желчных протоков [183]. Холангиоциты, выстилающие внутрипеченочные желчные протоки, образуются из гепатобластов, которые также являются клетками-предшественниками гепатоцитов [227]. При регенерации печени пик пролиферации холангиоцитов наблюдается лишь через несколько часов после гепатоцитов. Показано, что при токсическом повреждении резко увеличивается количество клеток с фенотипом холангиоцитов (дуктулярные клетки), которые вероятнее всего происходят из гепатоцитов. Дуктулярные клетки редко дифференцируются в зрелые гепатоциты, а как правило дают начало билиарным эпителиальным клеткам [50]. Холангиоциты играют важную роль в регуляции локальных иммунных реакций при взаимодействии с иммунными клетками через экспрессию молекул адгезии, продукцию цитокинов и других медиаторов. Способность холангиоцитов продуцировать основные митогены – фактор роста гепатоцитов (HGF) и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), имеет важную роль при регенерации печени [170].

1.2.2 – Значение апоптоза и белков теплового шока молекулярной массой 60 и 70 кДа в регенерации печени

Разнообразный набор метаболических нарушений, токсических поражений и воспаление приводит к повреждению и развитию заболеваний печени. Общей чертой этих поражений является активация апоптотической и / или некротической гибели клеток [137]. Апоптотическая гибель гепатоцитов играет важную роль в патогенезе заболеваний печени, вызванных действием токсикантов, к числу которых относится CCl_4 [58]. Согласно ряду проведенных исследований, апоптоз гепатоцитов является первым клеточным ответом на

токсическое повреждение и считается одним из основных способов гибели клеток при заболеваниях печени [57, 71, 148].

Апоптоз морфологически характеризуется конденсацией хроматина, фрагментацией ДНК, формированием в цитоплазме полостей и апоптотических телец. Апоптотические тельца в конечном итоге распознаются и удаляются путем фагоцитоза макрофагами или другими окружающими клетками. В нормальной печени человека и крысы апоптотические тельца обнаруживаются преимущественно в гепатоцитах перивенозной области (зона 3) [64]. Биохимически апоптоз сопровождается такими событиями, как экспозиция фосфатидилсерина на внешнем монослое плазматической мембраны, повышение проницаемости мембраны митохондрий с последующим высвобождением белков, обычно находящихся в межмембранном пространстве, и активация семейства цистеиновых протеаз (каспаз).

На сегодняшний день, выделяют внешний и внутренний апоптоз, основой различий между ними служат биохимические и функциональные критерии. Внешний путь апоптоза (внешний апоптоз) [164] относится к сигнальному пути, запускаемому связыванием определенного класса трансмембранных рецепторов (называемых рецепторами смерти) с их родственными лигандами. Рецепторы смерти включают Fas (известный как CD95), TNF- α -рецептор 1 (TNF-R1) и рецепторы смерти 4 и 5 (DR4 и DR5, также известные как TRAIL-R1 и TRAIL-R2), каждый из них повсеместно экспрессируется в печени в различной степени. Их лиганды (FasL / CD95L, TNF- α и TRAIL) в основном экспрессируются клетками иммунной системы и играют фундаментальную роль в элиминации трансформированных или поврежденных гепатоцитов.

Внутренний путь апоптоза (внутренний апоптоз) [164], может быть, запущен различными индукторами внутриклеточного стресса, включая повреждение ДНК, окислительный стресс, ультрафиолетовое и гамма-облучение, токсины, отсутствие факторов роста и стресс эндоплазматического ретикулума. Независимо от природы инициирующего стимула или

внутриклеточной органеллы, из которой они могут возникать, все эти внутриклеточные сигнальные каскады приводит к дисфункции митохондрий.

Апоптоз в норме обеспечивает утилизацию поврежденных или стареющих клеток в зрелых тканях, а также отвечает за ремоделирование тканей в процессе развития. Уравновешивая митоз, апоптоз играет важную роль в обеспечении гомеостаза ткани печени во время нормального обмена клеток.

Значимость апоптоза в регулировании объема печени продемонстрирована многими экспериментальными исследованиями. Установлено, что у мышей с дефицитом рецептора Fas/CD95, являющегося основным медиатором апоптоза в печени, наблюдается выраженная гиперплазия печени [218]. Регресс гиперплазии печени в различных экспериментальных моделях происходит за счет апоптоза [57].

Было показано, что апоптоз способствует регенерации печени за счет высвобождения сигналов роста, которые стимулируют пролиферацию клеток-предшественников. Действительно, у мышей, лишенных каспазы 3 или каспазы 7, двух ключевых регуляторов апоптоза, наблюдается нарушение регенерации печени [60].

Особый интерес представляет оценка взаимосвязей между состоянием апоптоза и локальным уровнем белков теплового шока в поврежденной печени. Молекулы шаперонов (белки теплового шока / heat shock proteins, HSP) активно синтезируются в ответ на денатурацию белков как в норме, так и при других стресс-воздействиях на клетку [107], включая токсическое повреждение [38]. HSP классифицируют в зависимости от их молекулярной массы, что отражается в названии. HSP60, HSP70 являются наиболее широко изученными среди белков теплового шока, относящихся к подсемейству шаперонинов [146]. Данные белки способны возвращать другим белкам нативную конформацию (HSP70 начинает процесс сворачивания белков (фолдинг), а комплекс HSP60 завершает фолдинг), могут усиливать протеолиз, уменьшать апоптоз и участвовать в транспорте других белков [107].

Молекула HSP70 представляет собой димер, обладает способностью формировать высокоолигомерные комплексы со многими структурами в клетке и имеет по меньшей мере 8 изоформ, набор и концентрация которых зависят от типа клетки и определяется видом стрессорного воздействия.

HSP70 считается антиапоптотическим, поскольку способен связываться с некоторыми проапоптотическими молекулами, включая цитохром C и активирующий апоптотическую протеазу фактором 1 (Apaf 1) [78]. HSP70 выступает в роли эндогенного ингибитора апоптоза и инактивирует апоптоз индуцирующий фактор (AIF) высвобождающийся из митохондрий, тем самым предотвращая каспазо-независимую гибель клеток [117].

В некоторых случаях истощение HSP70 является достаточным для запуска апоптоза путем активации каспазы-3 в отсутствие какого-либо дополнительного стрессового воздействия [202].

До недавнего времени HSP70 считался типично внутриклеточным белком, но в настоящее время обнаружено, что разные типы клеток способны секретировать его во внеклеточную среду [79].

К основным механизмам транспорта HSP70 относят транслокацию через плазматическую мембрану и высвобождение, связанное с липидными везикулами, эндолизосомный путь и пассивное высвобождение после гибели клеток от некроза. Внеклеточный HSP, по-видимому, находится в мембраносвязанной и безмембранной формах. Также имеются сведения о том, что внеклеточный HSP70 (eHsp70) может действовать как эндогенный сигнал биологической опасности (DAMP), для иммунной системы. eHsp70 обладает активностью, регулирующей активность шаперона и цитокинов (шаперокин), и может стимулировать иммунные и воспалительные реакции, приводящие к стерильному воспалению и распространению уже существующего воспаления [98].

При воздействии «стрессорного» фактора внутриклеточное содержание HSP70 может увеличиваться в десятки раз и составлять до 5% от содержания всех клеточных белков [1]. Имеются данные о том, что к экспрессии HSP70

способен широкий спектр клеток, в том числе гепатоциты, лимфоциты и макрофаги [143].

HSP60 является молекулярным шапероном, который участвует в фолдинге и сборке митохондриальных белков, а также облегчает протеолитическую деградацию неправильно свернувшихся или денатурированных белков. Этот белок кодируется ядерной ДНК и синтезируется в виде большого предшественника, содержащего N-концевую последовательность, необходимую для переноса в митохондрии, а затем расщепляется на митохондриальном матриксе до зрелой формы. Кроме митохондрий, HSP60 присутствует на цитолемме [221]. HSP60 считают проапоптотическим, однако Chandra и соавторы [75] описали двойную роль данного белка. Митохондриальный HSP60 обладает антиапоптотической функцией, тогда как цитозольный – способствует как процессам антиапоптоза, так и проапоптоза. Ряд авторов отмечает, что цитозольное накопление HSP60 представляет собой обычное явление во время индукции апоптоза [75].

1.2.3 – Роль синусоидальных эндотелиальных клеток, резидентных лимфоцитов и тучных клеток в регенерации печени

В условиях физиологической нормы и при патологическом изменении в регуляции регенерации печени принимают участие все ее структурные элементы, включая непаренхиматозные клетки (синусоидальные эндотелиальные клетки, макрофаги, резидентные лимфоциты), а также клетки соединительной ткани и внеклеточный матрикс [34].

Синусоидальные эндотелиальные клетки печени. Эндотелиальные клетки выстилают печеночные синусоиды. Данные клетки отличаются от сосудистых эндотелиальных клеток своими уникальными морфологическими характеристиками, такими как отсутствие базальной мембраны и наличием множества пор (фенестр) [92]. Это обеспечивает быстрый обмен питательными

веществами и макромолекулами с близлежащими гепатоцитами через пространство Диссе. Изменение диаметра фенестр коррелируют с несколькими повреждениями печени и может приводить к нарушению функционирования печени [69]. Эндотелиальные клетки печени выполняют роль «барьера» в печеночных синусоидах, обеспечивают фильтрацию, эндоцитоз, презентацию антигенов и привлечение лейкоцитов к месту повреждения [208].

Также эндотелиальные клетки поддерживают гемодинамику печеночных капилляров, активно реагируя на изменяющийся внутрипеченочный кровоток и давление. Паракринная передача сигналов между эндотелиальными клетками и гепатоцитами имеет решающее значение для поддержания нормального функционального состояния паренхимы [174].

Синусоидальные эндотелиальные клетки признаны ранними регуляторами прогрессирования фиброза печени. Повреждение печени, способствующие развитию фиброза, приводит к резкому изменению фенотипа эндотелиальных клеток. Потеря эндотелиальными клетками фенестр и появление базальной мембраны наблюдается на ранних стадиях фиброза печени и называется капилляризацией. De Lever L. D. и его коллеги доказали, что капилляризация предшествует началу фиброза [80]. Некоторые секреторные изменения, такие как потеря активности эндотелиальной синтазы оксида азота и сверхэкспрессия эндотелина-1, также сопровождают фиброз и опосредуют портальную гипертензию в печени [200]. Кроме того, капилляризованные эндотелиальные клетки способствуют накоплению внеклеточного матрикса в фиброзной печени в виде синтеза коллагена и фибронектина. На фиброз также влияет изменение функции синусоидальных эндотелиоцитов с толерогенной на провоспалительную и иммуногенную, это явление способствует как усилению воспалительной реакции, так и изменению внутрипеченочного иммунитета [127].

Резидентные лимфоциты печени. Резидентные лимфоциты печени служат первой линией защиты в ответ на инфекцию и неинфекционные стимулы, играют важную роль в иммунной регуляции и поддержании гомеостаза печени. Лимфоциты печени, как правило, оказывают защитное или патологическое

действие, продуцируя антимикробные или гомеостатические эффекторные молекулы, взаимодействуя с другими иммунными клетками. Резидентные лимфоциты участвуют в патогенезе воспалительных заболеваний печени, таких как гепатит, фиброз, цирроз и неалкогольная жировая дистрофия печени [242, 175].

Печень содержит 2-15 млн лимфоцитов в расчете на 1 г ткани. Выделяют несколько типов тканевых резидентных лимфоцитов печени [242, 175]: резидентные Т-клетки памяти ($CD8^+T_{RM}$ клетки), натуральные киллеры (НК-клетки), врожденные лимфоидные клетки (ILC), гамма-дельта Т-клетки ($\gamma\delta T$ -клетки) и натуральные киллерные Т-клетки (NKT-клетки, rit -клетки), В-лимфоциты. В-лимфоциты составляют только 5% от общего количества лимфоцитов.

Активированные $CD8^+T_{RM}$ клетки проявляют эффекторные функции, включая цитолитическую активность и секрецию провоспалительных цитокинов, таких как $IFN-\gamma$ и $TNF-\alpha$. Исследования показали, что важное подмножество $CD8^+T_{RM}$ -клеток локализовано в печени, где они патрулируют сосудистую сеть и обеспечивают защиту от проникновения патогенов [187]. Клетки $CD8^+T_{RM}$ в печени человека и мыши имеют сходные фенотипические признаки. $CD69$ и $CD103$ являются двумя ключевыми маркерами, экспрессируемыми клетками T_{RM} в различных нелимфоидных тканях.

ILC представляют собой семейство врожденных лимфоцитов (НК-клетки, ILC1s, ILC2s, ILC3s и LTi-клетки), не имеющих антигенспецифических рецепторов, которые отражают фенотипы и функции Т-клеток. Они обеспечивают защиту клеток печени от патогенов, участвуют в поддержании гомеостаза и восстановлении поврежденных тканей [149].

НК и NKT клетки составляют около 50% всех внутрипеченочных лимфоцитов. При активации НК и NKT клетки играют главную роль в устойчивости к вирусной инфекции, регуляции врожденных и адаптивных иммунных реакций. Резидентные НК-клетки печени выполняют важную роль в ингибировании или ограничении фиброза печени, обеспечивая утилизацию активированных звездчатых клеток печени [249, 250].

$\gamma\delta$ T-клетки составляют 3-5% от общего количества лимфоцитов печени и 15-25% от общего числа T-клеток печени [241]. $\gamma\delta$ T-лимфоциты имеют общие CD маркеры как с T-лимфоцитами (CD3, CD8), так и с NK клетками (CD56). К цитокинам, синтезируемым $\gamma\delta$ T-лимфоцитами, относятся: IL-1,6, IL-17, ГМ-КСФ и TNF- α , а также IFN- γ , IL-2, IL-7, IL-13, IL-4, IL-10 [10]. $\gamma\delta$ T-клетки образуют долгоживущие популяции клеток памяти при локальном воспалении или инфекции [125]. Резидентные $\gamma\delta$ T-клетки могут обеспечивать защиту поврежденных тканей от инфекционных патогенов, поддерживать гомеостаз, но при определенных обстоятельствах, их присутствие может усиливать местное воспаление [138].

Тучные клетки печени. Тучные клетки печени преимущественно локализованы в портальной области, включая печеночную триаду и портальные тракты. Было показано, что тучные клетки в печени крысы и человека в основном связаны с соединительной тканью, прилегающей к печеночным артериям [133]. Согласно литературным данным, обнаружена популяция тучных клеток, которые накапливаются вблизи больших внутripеченочных желчных протоков и внутripеченочных перибилиальных желез, так называемые «перибилиальные тучные клетки» [95]. Также описана популяция синусоидальных тучных клеток, которые могут происходить из миелоидных клеток костного мозга [62].

Тучные клетки способны продуцировать и секретировать многочисленные цитокины, хемокины, факторы роста и ангиогенные факторы, опосредующие множественные провоспалительные, противовоспалительные и / или иммунорегуляторные эффекты в зависимости от ситуации. Среди прочего, тучные клетки синтезируют и секретируют: TNF- α , IL-1 β , IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-13, CCL5, TGF- β 1 и FGF [167, 67, 102].

Исследования цирроза, фиброза, гепатита и других холангиопатий показывают, что гистологически количество печеночных тучных клеток обычно увеличивается по мере развития заболеваний, что свидетельствует о значительной роли данных клеток в заболеваниях печени [102].

Доказано, что тучные клетки способствуют капилляризации, привлекая другие клетки, продуцирующие компоненты матрикса печени, таким образом увеличивая секрецию цитокинов и других медиаторов во время прогрессирования фиброза печени [220]. В ряде работ отмечается, что тучные клетки могут оказывать иммуномодулирующее действие на другие клетки, тем самым усиливая или подавляя функциональную активность иммунокомпетентных клеток печени, предотвращая ослабление гепатобилиарной функции во время прогрессирования заболевания или действуя в качестве первого эффектора во врожденном иммунном ответе [163, 51].

Было показано, что количество тучных клеток печени увеличивается в фиброзной ткани по сравнению с нормальной тканью печени и способствуют прогрессированию фиброза через высвобождение профиброгенных медиаторов, таких как гистамин, триптаза, гепарин и bFGF (основной фактор роста фибробластов) [89]. Индуцированное тучными клетками высвобождение bFGF может способствовать ремоделированию внеклеточного матрикса путем взаимодействия со звездчатыми клетками печени.

На экспериментальной модели фиброза, вызванного CCl₄, авторы обнаружили увеличение числа тучных клеток в области портальных трактов, которое постепенно возрастало по мере прогрессирования фиброза (с 4 до 12 недель). После лечения антиоксидантом силимарином наблюдается снижение экспрессии портальных тучных клеток, что связано с активацией печеночных звездчатых клеток и TGF- β 1 [52].

При моделировании частичной гепатэктомии показано, что на 3 день после повреждения количество тучных клеток возрастает за счет мигрирующей популяции с целью компенсации резидентных печеночных тучных клеток. Этот факт подтверждает присутствие тучных клеток в регенерирующей печени [193]. Согласно анализу литературных данных, на сегодняшний день имеет мало информации о тучных клетках печени, как о союзниках регенераторного процесса, в то время как для других органов описана способность тучных клеток экспрессировать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, Vascular endothelial

growth factor) VEGFR2, VEGF3, обеспечивать ангиогенез и ремоделирование поврежденной ткани [236, 47].

1.2.4 – Роль макрофагов в регенераторных процессах печени

Состав популяции макрофагов печени представлен резидентными макрофагами (клетками Купфера), берущими свое начало от эритро-миелоидных клеток-предшественников желточного мешка [181, 228], а также из отдельных популяций инфильтрирующих макрофагов, то есть из циркулирующих моноцитов, происходящих из костного мозга, перитонеальных макрофагов и моноцитов селезенки [108, 135]. Доказано, что перитонеальные макрофаги перемещаются из брюшной полости в паренхиму печени путем миграции через мезотелиальный слой, который покрывает печень и проникает глубоко в поврежденные ткани [238].

Кроме костного мозга и брюшной полости, резервуаром моноцитов также является селезенка [121]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что макрофаги селезенки могут способствовать секреции хемокина CCL2 (C-C motif ligand 2) макрофагами печени, что, в свою очередь, способствует привлечению моноцитов и установлению M1-доминантного фенотипа макрофагов и, таким образом, увеличивает тяжесть фиброза печени [225]. При этом не установлено отличаются ли фенотипически и функционально мигрирующие в печень моноциты селезенки от моноцитов, происходящих из костного мозга.

В нормальных физиологических условиях популяция макрофагов печени в основном представлена клетками Купфера, локализованными вдоль синусоидов печени, предпочтительно около перипортальных областей [48], небольшое количество макрофагов моноцитарного происхождения располагается преимущественно в областях портальной триады [178, 157]. В исследовании Sierro F. в соавторстве с коллегами [45] описана популяция «капсулярных макрофагов печени», пополнение пула которых в стационарных условиях

осуществляется за счет циркулирующих моноцитов крови. Данные макрофаги способны к нейтрализации бактерий, поступающих из перитонеальной полости и способствуют привлечению нейтрофилов к фиброзной оболочке печени. Таким образом, печень содержит две отдельные, неперекрывающиеся ниши, занятые отдельными резидентными популяциями макрофагов, обеспечивающих иммунный надзор в двух точках входа патогенов.

Резидентные макрофаги печени являются самой большой популяцией фагоцитирующих мононуклеаров в организме млекопитающих и составляют приблизительно 80% от общего числа макрофагов и около 20% от непаренхиматозных клеток печени [116]. Клетки Купфера располагаются между эндотелиальными клетками печени или на их поверхности. Они имеют многочисленные отростки, которые проникают в пространство Диссе через цитоплазму эндотелиоцитов. Распределение макрофагов в ткани печени неравномерно, в ацинусах печени клетки Купфера локализованы в соотношении 4:3:2, в перипортальной зоне, промежуточной и центрлобулярной соответственно. Клетки Купфера локализованные в зоне 1 (перипортальные) наиболее крупные, имеют высокую фагоцитарную активность и продуцируют повышенное количество лизосомальных ферментов [179], TNF- α , PGE2 (простагландин E2) и IL-1, тогда как клетки в промежуточной и центрлобулярной областях имеют меньшие размеры и производят больше супероксид-аниона [63].

Продолжительность жизни клетки Купфера у млекопитающих в среднем составляет 3,8 дней [63]. Однако Vouwens L. и др. [68] в эксперименте на крысах показали, что продолжительность жизни клеток Купфера может составлять от нескольких недель до 14 месяцев. Более того, в пересаженной печени человека донорские резидентные макрофаги сохранялись в течение 1 года [204]. На основании вышесказанного можно заключить, что продолжительность жизни клеток Купфера, может быть, обусловлена видовыми различиями.

Несмотря на мнение, что клетки Купфера являются фиксированными тканевыми макрофагами печени, есть свидетельства того, что они обладают

способностью мигрировать вдоль синусоидальных стенок со средней скоростью $4,6 \pm 2,6$ (SD) микрон / мин [151]. Большой размер и частая локализация клеток Купфера в местах ветвления синусоидов, а также их миграция вдоль эндотелиальной поверхности препятствуют кровотоку, усиливая взаимодействие между клетками крови и непаренхиматозными клетками печени [104].

Популяция макрофагов печени, обладающая онтогенетической и функциональной гетерогенностью, является центральным звеном в регуляции гомеостаза [142], а также патологического процесса при токсическом повреждении. Именно макрофаги обеспечивают двухфазный ответ на поступление патогенного стимула: первоначальный деструктивный ответ, после которого следует разрешение / восстановление ткани. Продукция различных медиаторов и особенности локализации макрофагов определяют характер взаимодействий с различными паренхимными и непаренхиматозными клетками печени, что позволяет контролировать функциональное состояние органа в целом.

Известно, что патологические эффекты CCl_4 вызывают высвобождение DAMP, что на начальных этапах приводит к активации клеток Купфера в направлении провоспалительного фенотипа и запускает каскад воспалительных реакций. Клетки Купфера секретируют большое количество хемокинов и цитокинов, что приводит к привлечению нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов в область воспаления. Резидентные макрофаги печени продуцируют широкий спектр хемокинов: CXС-хемокиновый лиганд 1 (CXCL1), CXCL2 и CXCL8 (IL-8). CXCL1, CXCL2 (MIP-2) и CXCL8 привлекают нейтрофилы через хемокиновые рецепторы CXCR1 и CXCR2. Инфильтрация очага воспаления нейтрофилами усиливает высвобождение активных форм кислорода и протеаз, что приводит к некрозу гепатоцитов [161]. Параллельно макрофаги печени, гепатоциты и звездчатые клетки секретируют фактор стимулирующий хемотаксис моноцитов – CCL2 (C-C motif ligand 2, MCP-1), за счет чего циркулирующие моноциты $CCR2^+Ly6C^+$, пополняют локальный пул макрофагов [51]. На экспериментальной модели фиброза, вызванного CCl_4 , показано, что инфильтрация моноцитов $Ly-6C^{hi}$ приводит к 3-х или 5-кратному увеличению

числа макрофагов в печени [113]. После трансмиграции в печень моноциты Ly-6C^{hi} дифференцируются в макрофаги Ly-6C⁺, которые поддерживают воспаления и фиброгенез. Кроме CCL2, хемокины CCL1 и CCL25 стимулируют миграцию провоспалительных моноцитов / макрофагов через CCR8 и CCR9 рецепторы соответственно [73, 72]. Мигрировавшие в печень макрофаги костномозгового происхождения остаются доминирующей популяцией только в течение первых 72 часов после повреждения. Через 96 часов они полностью элиминируются и заменяются клетками Купфера [194]. Поддержание популяции клеток Купфера происходит как за счет самообновления, контролируемого специфическими факторами транскрипции – репрессивного фактора активации макрофагов (Maf) [147], так и за счет циркулирующих моноцитов, обладающих потенциалом для дифференцировки [110]. Исследования последних лет показывают, что преднамеренное истощение популяции резидентных макрофагов, а также блокирование поступления моноцитов крови препятствует регенерации гепатоцитов [77, 128].

Образующиеся при токсическом воздействии CCl₄ DAMP, запускают продукцию TNF-а тканевыми макрофагами печени, что способствует секреции многих других медиаторов воспаления, включая IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ [155]. IFN- γ значительно увеличивает выработку медиаторов воспаления макрофагами. Клетки Купфера активированные IFN- γ , экспрессируют многочисленные провоспалительные цитокины (IL-6 и TNF- α). Хотя эти провоспалительные сигналы могут привести к усилению воспаления и повреждению печени, имеются сведения, что IL-6 и TNF- α в малых концентрациях индуцируют деление непаренхиматозных клеток, которые продуцируют HGF (фактор роста гепатоцитов), повышают чувствительность гепатоцитов, а также ингибируют апоптоз клеток печени. Кроме того, IL-6 способствует пролиферации клеток печени через сигнальный преобразователь и активатор сигнального пути транскрипции 3 (STAT3) [211].

Pradere J. P. с коллегами [112] показали, что макрофаги печени способствуют выживанию миофибробластов, а секретлируемые тканевыми

макрофагами TNF- α , IL-1 β , IL-6 повышают выживаемость активированных звездчатых клеток печени [247]. Активированные звездчатые клетки и миофибробласты печени проявляют профиброгенную активность, поскольку они могут повышать уровни белков внеклеточного матрикса [111]. Karlmark K. R. и др. [177] на модели хронического повреждения печени показали, что CCR2 играет решающую роль в миграции моноцитов Ly6C^{hi} и способствует активации звездчатых клеток через TGF- β . TGF- β является мощным стимулятором синтеза белков внеклеточного матрикса. Помимо TGF- β , фактор роста тромбоцитов (PDGF), экспрессируемый в макрофагах печени, способствует фиброгенезу печени, а также пролиферации и активации звездчатых клеток [234]. Ly-6C^{hi} являются профиброгенными и провоспалительными макрофагами и могут быть переключены на основе сигналов микроокружения на макрофаги Ly-6C^{lo}, которые обладают антифиброзным и противовоспалительным действием [65]. В то же время, блокирование миграции макрофагов моноцитарного происхождения с использованием антитела против CCR2 или генетическая делеция CCR2 замедляет восстановление ткани печени [114].

На завершающих стадиях воспалительного процесса активность макрофагов, обладающих преимущественно провоспалительным фенотипом, сменяется M2-подобными макрофагами, которые инфильтрируют очаг повреждения. Резидентные макрофаги печени также приобретают противовоспалительный фенотип. В совокупности тканевые и мигрировавшие в печень макрофаги обеспечивают восстановление гомеостаза, подавляя влияние M1 макрофагов и продукцию цитотоксических медиаторов воспаления, а также стимулируя восстановление тканей [152]. M2-подобные макрофаги печени проявляют гепатопротекторный эффект способствуя апоптозу M1 макрофагов и повышают устойчивость гепатоцитов к запрограммированной клеточной гибели [74].

Регуляторные M2 макрофаги печени характеризуются экспрессией IL-10, IL-18 и TGF- β , которые противодействуют цитотоксическим, провоспалительным явлениям и способствуют регенерации ткани прямо или косвенно, индуцируя производство дополнительных противовоспалительных, стимулирующих рост и

ангиогенных медиаторов, включая IL-4, IL-13, липоксины, резольвины, протектины и VEGF- α [145, 186, 205].

Высвобождаемый M2-подобными макрофагами TNF- α в малых дозах на завершающих этапах воспалительной реакции, играет важную роль в антиоксидантной защите и в инициации восстановления тканей. TNF- α может действовать как мощный митоген, стимулирующий пролиферацию гепатоцитов после острого повреждения [201]. TNF- α также стимулирует макрофаги и другие клетки к выработке медиаторов, способствующих восстановлению, включая TGF- β , фактор роста соединительной ткани, VEGF- α , MMP-9, IL-6 [53]. TGF- β 1, секретируемый M2-подобными макрофагами печени, не способствует прогрессированию фиброза, так как влияние макрофагов на процесс фиброгенеза регулируется общими уровнями различных цитокинов [145].

Истощение или блокирование миграции макрофагов M2 в очаг воспаления задерживает восстановление и / или усугубляет повреждение и развитие фиброза, вызванного гепатотоксикантами. Например, у мышей с нокаутом по IL-10 или IL-13 усиливается гепатотоксический эффект CCl₄ [145]. IL-10 подавляет экспрессию транскрипционного фактора NF- κ B, продукцию провоспалительных цитокинов Th1-клетками, макрофагами, нейтрофилами и фиброгенез.

Во время регресса фиброза мигрировавшие в печень Ly6C^{hi} макрофаги дифференцируются в «восстанавливающие» Ly6C^{lo}, которые посредством продукции матриксных металлопротеиназ: MMP-9, MMP-12 и MMP13 [91, 198, 217] способны разрушать внеклеточный матрикс, а также подавлять выработку провоспалительных цитокинов, хемокинов и способствовать апоптозу активированных звездчатых клеток. Макрофаги печени являются основным источником CXCL9, который обладает антифибротическим действием [56]. CX3CR1, секретируемый макрофагами, является основным регулятором дифференцировки и выживания моноцитов в печени и также препятствует прогрессированию фиброза [222].

Таким образом, фенотипическая и функциональная гетерогенность печеночных макрофагов зависит от стадии патогенного процесса и играет решающую роль в определении баланса между механизмами прогрессирования и разрешения повреждения тканей как при острых, так и при хронических повреждениях печени.

1.2.5 – Регуляция регенерации печени факторами роста и цитокинами

Активация, пролиферация, миграция, дифференцировка и выживание клеток в регенерирующей печени контролируются большим количеством факторов роста и цитокинов, которые экспрессируются в месте повреждения или достигают ткани печени через систему кровообращения.

IL-1 – один из центральных медиаторов воспалительного процесса, который запускает синтез других цитокинов, белков острой фазы, стимулирует клеточные и гуморальные реакции [244]. В основном секретируется моноцитами, макрофагами (в том числе резидентными макрофагами печени – клетками Купфера), эпителиальными клетками, синовиальными клетками и хондроцитами [223].

Семейство цитокинов интерлейкина-1 (IL-1) включает 11 членов: IL-1 α , IL-1 β , антагонист рецептора IL-1 (IL-1Ra), IL-18, IL-33 и IL-1F5-IL-1F10. Биология IL-1F5-IL-1F10 менее хорошо охарактеризована, чем биология IL-1, IL-18 и IL-33. IL-1 α и IL-1 β функционируют как провоспалительные цитокины, в то время как IL-1R α является противовоспалительным цитокином [86].

Члены семейства IL-1 широко вовлечены в патологический процесс при различных заболеваниях, включая гепатоцеллюлярную карциному и печеночную недостаточность, а также в регенерацию печени.

У человека доминирующей формой секреторного IL-1 является IL-1 β . IL-1 β представляет собой секреторный цитокин, осуществляющий свое действие как локально, так и на системном уровне. У мышей и крыс, напротив,

стимулированные макрофаги продуцируют главным образом IL-1 α и гораздо меньшие количества IL-1 β .

IL-1 α продуцируется главным образом активированными макрофагами, а также нейтрофилами, эпителиальными клетками и эндотелиальными клетками [83]. IL-1 α в основном активен в качестве внутриклеточного предшественника или в его мембранно-ассоциированной форме; только небольшая часть этого белка активна в секретируемой форме [84]. Доказано, что после апоптических стимулов предшественник IL-1 α транслоцируется в ядро, где он связывается с хроматином и не высвобождается из клеток [85]. Однако при высвобождении из некротических клеток IL-1 α служит «сигналом опасности» и индуцирует стерильное воспаление [126]. Имеются данные о том, что сверхэкспрессия IL-1 α индуцирует апоптоз [184]. IL-1 α , так и IL-1 β играют важную роль в развитии и ускорении воспаления и апоптоза, вызванных молниеносным гепатитом [132].

Члены семейства IL-1 способствуют активации клеток врожденной иммунной системы, таких как нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, тучные клетки и естественные клетки-киллеры, также выполняют важные функции по активации и усилению функции поляризованных Т-клеток [209].

В тучных клетках IL-1 индуцирует высвобождение гистамина, которое, в свою очередь, вызывает вазодилатацию и местное воспаление [19].

IL-1 оказывает стимулирующее действие на метаболизм соединительной ткани. Показано, что IL-1 стимулирует пролиферацию фибробластов и увеличивает продукцию ими простагландинов, ростовых факторов и ряда цитокинов, включая колониестимулирующие факторы, интерлейкины и интерфероны. Под влиянием IL-1 в клетках соединительной ткани увеличивается синтез коллагена и коллагеназы, а также других ферментов, включая нейтральные протеазы и металлопротеазы [29, 31, 32].

IL-6 – плеiotропный цитокин, синтезируется фибробластами, моноцитами, макрофагами, Т-клетками и эндотелиальными клетками. Синтез и секреция IL-6 индуцируется при воспалительных состояниях, например, при стимуляции Toll-подобного рецептора TLR-4 липополисахаридом или при

стимуляции клеток другими цитокинами, такими как IL-1, IL-2, TNF- α . IL-6 является ключевым медиатором, координирующим иммунный и острофазный воспалительный ответы. IL-6 играет центральную роль в восстановлении нормальной функции печени после повреждения [216].

IL-6 участвует в регуляции созревания антителообразующих клеток и продукции ими иммуноглобулинов. Основное действие IL-6 связано с участием в дифференцировке В-лимфоцитов, их созревании и преобразовании в плазматические клетки, секретирующие иммуноглобулины, а также в стимуляции пролиферации Т-лимфоцитов, их активации в реакциях костномозгового гемопоэза. IL-6 считают важнейшим медиатором острой фазы воспаления поскольку он индуцирует синтез острофазных белков: фибриногена, альфа1-антихемотрипсина, С-реактивного белка, гаптоглобина, сывороточного амилоида А.

Принято считать, что IL-6 высвобождается в кровотоки, поглощается печенью, и гепатоциты распознают IL-6 как стимул для начала производства белков острой фазы. Согласно другим представлениям, когда повреждение направлено непосредственно на печень, именно резидентные иммунные клетки, такие как клетки Купфера (печеночные макрофаги), служат основным источником IL-6. Иммунные клетки печени считаются основными поставщиками IL-6, который впоследствии сигнализирует гепатоцитам в поврежденной печени о продукции белков острой фазы, помогая восстановить функцию печени [216, 119].

IL-18 – цитокин с плеiotропной активностью, является членом семейства IL-1, способен усиливать ответы Т-хелперов-1 и цитотоксическую активность естественных клеток-киллеров. IL-18 продуцируют клетки Купфера, макрофаги, В-клетки и дендритные клетки. IL-18 усиливает провоспалительный иммунный ответ, повышая выработку различных цитокинов, таких как IL-1, IL-6 и TNF [206].

Было показано, что IL-18 является мощным индуктором продукции IFN- γ Т-клетками и NK-клетками и действует как костимулирующий фактор для активации Т-клеток. Кроме того, IL-18 усиливает активность NK-клеток в

селезенке и печени, а также цитотоксичность Т-хелперов-1 [88]. Зафиксировано, что у человека при острой печеночной недостаточности, вызванной передозировкой ацетаминофена, отмечается повышенный уровень IL-18 в сыворотке крови [61, 160].

IL-18 играет ключевую роль в регуляции апоптоза гепатоцитов и повреждении печени *in vivo* через Fas-зависимый путь. IL-18 индуцирует экспрессию Fas-лиганда на NK и CD4⁺T-клетках, при этом избыточная экспрессия IL-18 приводит к повышенной экспрессии Fas на гепатоцитах [206].

Фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α) представляет собой плейотропный провоспалительный цитокин, который играет важную роль в ряде заболеваний печени благодаря способности индуцировать экспрессию воспалительных и цитотоксических медиаторов. TNF- α продуцируется главным образом моноцитами/макрофагами, а также широким спектром других типов клеток, включая гепатоциты, лимфоидные клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки, фибробласты и нейрональные клетки [237]. Данный цитокин может запускать множественные сигнальные пути, вовлеченные в воспаление, пролиферацию и апоптоз. TNF- α также участвует в росте клеток, сопровождая процесс заживления во многих системах органов и влияет на восстановление печени после гепатотоксического повреждения, способствует регенерации после частичной гепатэктомии. TNF- α является известным митогеном для гепатоцитов [230]. Имеются данные о том, что TNF- α защищает печень от повреждений [232] и предотвращает фиброз, подавляя экспрессию коллагена альфа-1 цепи типа 1 (COL1A1) в звездчатых клетках печени [229].

Доказано, что ингибирование продукции TNF- α замедляет регенерацию печени после частичной гепатэктомии и токсического повреждения [130]. TNF- α регулирует начальную фазу регенерации печени после повреждения, усиливая митогенные эффекты печеночного фактора роста (HGF) *in vivo* и *in vitro* и стимулируя продукцию IL-6, который активизирует STAT 3 [233]. Чрезмерная продукция TNF- α после 90% гепатэктомии приводит к нарушению микроциркуляции в ткани печени и угнетает регенераторные процессы [203].

Интерферон гамма (IFN- γ) – единственный интерферон II типа, является провоспалительным цитокином, обладающим противовирусным и иммуномодулирующим действием. В печени действие IFN- γ выходит за рамки иммунной модуляции и включает регуляцию апоптоза гепатоцитов, их клеточного цикла при заболеваниях печени [54, 115].

IFN- γ вызывает апоптоз во многих типах клеток, включая гепатоциты. IFN- γ ингибирует пролиферацию свежеизолированных гепатоцитов [54] и некоторых клеточных линий, происходящих из гепатоцитов [122].

Установлено, что при токсическом воздействии ацетаминофена IFN- γ поддерживает некроз гепатоцитов за счет усиления образования оксида азота [134, 46]. Было показано, что инъекция IFN- γ ингибирует синтез ДНК в регенерирующей печени через 40 часов после частичной гепатэктомии [214]. Гепатоциты не являются существенными продуцентами IFN- γ . Этот цитокин секретируется преимущественно активированными Т-клетками, натуральными киллерами (NK) и NKT-клетками, а также В-клетками [65], которые либо находятся в печени, либо мигрируют в нее в ответ на воспаление и повреждение [190]. При повреждении печени и развитии воспалительной реакции гепатоциты увеличивают экспрессию трансмембранного рецептора IFN- γ , что, по-видимому, повышает их чувствительность к стимуляции IFN- γ [235]. В печени IFN- γ также активирует рецептор к IFN- γ , экспрессируемый на непаренхиматозных клетках, к их числу относятся резидентные макрофаги (клетки Купфера), которые в свою очередь запускают как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [76].

Трансформирующий фактор роста-бета 1 (TGF- β 1) является ключевым регулятором нормальной физиологии и патологических процессов печени, участвует во всех стадиях прогрессирования заболевания, от начального повреждения печени через воспаление и фиброз до цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы.

Сигнальные пути, инициируемые TGF- β 1, играют важную роль в регуляции различных клеточных процессов, включая пролиферацию,

дифференцировку, миграцию или гибель клеток, которые важны для поддержания гомеостаза печени [219].

TGF- β 1 оказывает цитостатическое и проапоптотическое действие на зрелые гепатоциты [197], способствует дифференцировке печени во время эмбриогенеза и физиологической регенерации. Нарушение выработки TGF- β может привести к гиперпролиферативным расстройствам и раку [90, 219].

TGF- β 1 считается наиболее мощным печеночным профиброгенным цитокином, вырабатываемым активированными мезенхимными клетками при хроническом поражении печени [196]. Клетки Купфера и рекрутированные макрофаги являются основным источником TGF- β . Активированные звездчатые клетки, и в меньшей степени, синусоидальные эндотелиальные клетки печени, также способны к синтезу TGF- β [90, 219].

Доказано, что высокий уровень TGF- β приводит к трансдифференцировке покоящихся звездчатых клеток печени в миофибробласты и массовой гибели гепатоцитов, что способствует развитию фиброза печени и последующего цирроза [219]. Миофибробласты являются основным источником накопления белка внеклеточного матрикса и важными медиаторами фиброгенеза. TGF- β также опосредует процесс эпителиально-мезенхимального перехода в гепатоцитах, который может прямо или косвенно способствовать увеличению популяции миофибробластов.

IL-10 является плеоморфным цитокином с различными фенотипическими эффектами. Известно, что IL-10 продуцируется почти всеми видами активированных иммунных клеток, включая В-клетки, тучные клетки, гранулоциты (нейтрофилы, базофилы, эозинофилы), макрофаги, дендритные клетки и подмножества Т-клеток [213]. В печени IL-10 синтезируется гепатоцитами, синусоидальными эндотелиальными клетками, клетками Купфера, звездчатыми клетками и резидентными лимфоцитами [131].

В первую очередь, IL-10 считается противовоспалительным цитокином. IL-10 является мощным регулятором отрицательной обратной связи, влияет на контроль и разрешение воспаления с помощью аутокринных и паракринных

механизмов. Существует два механизма, с помощью которых IL-10 ограничивает воспалительные реакции: ингибирование презентации антигена дендритными клетками и ингибирование активации и инфильтрации макрофагов в место повреждения, с вторичным эффектом ослабления экспрессии провоспалительных цитокинов [213]. IL-10 ингибирует синтез макрофагами таких провоспалительных цитокинов, как TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 и GM-CSF [123] и способен предотвращать дифференцировку моноцитов крови в тканевые макрофаги и дендритные клетки [31].

Считается, что IL-10 ингибирует апоптотические сигнальные пути, такие как путь p38 MAPK (митоген-активируемая протеинкиназа), через STAT3, тем самым ограничивает гибель ткани и дисфункцию органов после травмы [124].

Основными мишенями для воздействия IL-10 являются макрофаги. Принято выделять классически (M1) или альтернативно (M2) активированные макрофаги. M1 индуцируются антигенами, такими как липополисахарид клеточной стенки бактерий или цитокинами – IFN- γ , TNF- α , чтобы в конечном итоге продуцировать провоспалительный оксид азота (NO) и активные формы кислорода в качестве защитных механизмов. M2 активируются IL-4 / IL-13 и IL-10 в ответ на повреждение, они способствуют регенерации, ослабляют воспаление и стимулируют формирование нового внеклеточного матрикса. Однако при восстановлении тканей M2 (и косвенно, IL-10) могут способствовать выработке коллагена и, в конечном итоге, фиброзу за счет привлечения и активации фибробластов [224].

Фактор стволовой клетки (SCF) – трансмембранный белок, который ферментативно отщепляется от поверхности клетки во время травмы или воспаления и играет важную роль в восстановлении печени после токсического повреждения [212]. Установлено, что печень в норме содержит значительное количество как мембрансвязанного, так и растворимого SCF. Наряду с гепатоцитами к синтезу SCF в печени способны эндотелиоциты и макрофаги печени [96, 182]. SCF продуцируется фибробластами, стромальными клетками и эндотелиальными клетками. SCF действует синергетически с другими

гемопоэтическими факторами роста, стимулирует рост и дифференцировку различных предшественников, включая предшественники тучных клеток [192].

SCF является гематопоэтическим фактором, индуцирующим созревание и дифференцировку лейкоцитов. Помимо регуляции пролиферации гемопоэтических стволовых клеток, SCF участвует в воспалительных заболеваниях, ремоделировании тканей, включая фиброз, в регенерации печени после повреждения. Предполагают, что SCF может служить защитным фактором в тканях, которые восприимчивыми к токсическим повреждениям [212].

ГЛАВА 2 – МЕТОДИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 – Общая характеристика экспериментальных животных

Эксперимент по моделированию токсического повреждения печени был выполнен на 90 половозрелых (3 месяца) крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. Все манипуляции с животными проведены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС. На проведение исследования получено разрешение комиссии по биоэтике Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» (протокол №2 от 21.10.2020 г.) и этического комитета Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол № 01/19 от 18.12.2019 г.).

Крысы содержались в стандартных условиях вивария Института иммунологии и физиологии УрО РАН социальными группами по 5 голов в пластиковых клетках, предназначенных для мелких грызунов. В помещениях поддерживался постоянный температурный режим +20-22°C, а также естественная смена дня и ночи. Животным был обеспечен свободный доступ к пище и воде, в качестве корма использовали стандартный рацион – комбикорм для лабораторных мышей и крыс Дельта Фидс, ЛБК 120 С-19 (БиоПро, Россия).

Санитарная обработка клеток проводилась ежедневно в одно и тоже время (утренние часы), дезинфекция осуществлялась еженедельно. В опыты брали только здоровых животных, прошедших не менее чем двухнедельную акклиматизацию к лабораторным условиям.

Животные были разделены на 9 экспериментальных групп, по 10 крыс в каждой. Первую группу составляли здоровые животные (интактная группа). Во вторую, третью и четвертую группы входили животные, которым однократно, внутрибрюшинно вводили раствор тетрахлорметана (CCl₄) на оливковом масле.

Продолжительность действия гепатотоксиканта в этих группах составляла 3, 7 и 14 суток соответственно. Пятая, шестая и седьмая экспериментальная группа – крысы, подвергавшиеся однократному внутрибрюшинному введению масляного раствора CCl_4 и внутримышечным инъекциям аминофталгидразида на протяжении 3, 7 и 14 суток. Восьмую группу (контроль 1) составляли животные, которым внутримышечно вводили воду для инъекций. Девятая группа (контроль 2) была представлена животными, которым внутрибрюшинно вводили стерильное оливковое масло.

2.2 – Моделирование диффузного токсического повреждения печени и способа его коррекции

Для создания модели токсического повреждения печени использовали 50% раствор тетрахлорметана (CCl_4 , четырёххлористый углерод, ГОСТ 20288-74, АО «ЭКОС-1») на стерильном оливковом масле, который вводили животным экспериментальных групп однократно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/100 г массы тела, что составляет 68,6 % от LD50 (72,9 мг/100 г) [66].

CCl_4 является одним из старейших и наиболее широко используемых гепатотоксикантов для экспериментальной индукции повреждения печени у лабораторных животных [70]. Однократное введение CCl_4 , приводящее к острому и обратимому повреждению печени, является общепризнанной экспериментальной моделью для изучения регенераторных процессов в данном органе [26].

Коррекция токсического повреждения печени у экспериментальных животных включала инъекции натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона (аминофталгидразид натрия, АФГ). Внутримышечное введение АФГ из расчета 2 мг/кг массы тела, предварительно растворенного в воде для инъекций, осуществляли один раз в день, на протяжении 3, 7 и 14 суток.

АФГ обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Его основные фармакологические эффекты обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов и восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции [136, 166].

Выбор метода коррекции обусловлен тем, что макрофаги являются ключевой клеточной популяцией, регулирующей регенераторные процессы в печени. Это связано с особенностями локализации макрофагов в органе, высокой метаболической активностью, а также их способностью продуцировать широкий спектр цитокинов. Присущая макрофагам функциональная пластичность позволяет им в отличие от других непаренхиматозных клеток печени участвовать как в регуляции гомеостаза, так и в процессах воспаления и регенерации [181, 195].

В исследовании на культурах макрофагов было подтверждено, что АФГ способен воздействовать на данный тип клеток, изменяя их морфологию, ядерно-цитоплазматическое соотношение, пролиферативную активность и цитокиновую продукцию [21]. В ряде экспериментальных работ показано влияние модулятора активности макрофагов на репаративную регенерацию почек [8], частичное восстановление количества β -клеток в островках Лангерганса поджелудочной железы [13, 180], блокирование выраженного системного воспаления при экспериментальном панкреонекрозе [20], смену экссудативно-деструктивной фазы воспаления на пролиферативно-клеточную при остром коронарном синдроме и инфаркте миокарда [172].

К группам с CCl_4 -воздействием и с применением АФГ были сформированы две контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы масляного раствора внутривнутрибрюшинно и внутримышечно воду для инъекций соответственно.

Животных опытных групп выводили из эксперимента через 3, 7, 14 суток после двенадцатичасового голодания передозировкой золетила (15 мг/кг), предварительно взяв кровь из хвостовой вены. После эвтаназии, для проведения

исследования, у всех экспериментальных животных были взяты образцы ткани печени.

2.3 – Исследование биохимических показателей крови

Биохимическое исследование плазмы крови крыс включало определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) (К.Ф.2.6.1.2), аспаратаминотрансферазы (АСТ) (К.Ф.2.6.1.1), щелочной фосфатазы (К.Ф.3.1.3.1.), содержание общего билирубина, общего белка, альбумина, мочевины и креатинина с использованием стандартных наборов реактивов фирмы Витал Диагностикс (Санкт-Петербург, Россия) на приборе DU 800 Beckman Coulter (USA). У экспериментальных животных рассчитывали коэффициент де Ритиса [94] и альбумин-глобулиновый коэффициент [129].

2.4 – Оценка гематологических показателей экспериментальных животных

Общий анализ периферической крови проводился на гематологическом анализаторе Biocode Hysel Celly 70, адаптированном для ветеринарных исследований.

Забор крови у крыс осуществлялся из хвостовой вены в специально предназначенные пластиковые пробирки, обработанные гепарином в качестве антикоагулянта. Анализировали следующие параметры:

1. WBC – концентрация лейкоцитов, г/л;
2. PLT – концентрация тромбоцитов, Т/л;
3. LYM – концентрация лимфоцитов, г/л;
4. GRN – концентрация гранулоцитов, г/л;
5. MID – концентрация средних клеток, Т/л;
6. RBC – концентрация эритроцитов, Т/л;

7. HGB – концентрация гемоглобина, г/дл;
8. MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг;
9. MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл;
10. HCT – гематокритный показатель, %;
11. PDW – ширина распределения тромбоцитов по объему;
12. RDW – ширина распределения эритроцитов по объему;
13. PCT – тромбокритный показатель, %;
14. MCV – средний объем эритроцитов, фл;
15. MPV – средний объем тромбоцитов, фл;
16. LYM% – процентное содержание лимфоцитов;
17. MID% – эозинофилы, базофилы, моноциты;
18. GRN% – процентное содержание гранулоцитов.

2.5 – Гистологическое исследование ткани печени

Образцы ткани печени фиксировали в 10 % нейтральном формалине 24 часа при комнатной температуре. После восьмичасовой часовой промывки в холодной водопроводной воде фрагменты органов подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия). Процедура включает дегидратацию в этаноле возрастающей концентрации 50 %, 70 %, 95 %, 100 %, затем обезжиривание в ксилоле и пропитку материала в парафине.

Далее проводилась заливка образцов в парафин с помощью автоматического процессора Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). После заливки кусочки органов фиксировали на стандартные гистологические кассеты, затем на санном микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия) изготавливали гистологические срезы толщиной 3-4 мкм.

Окрашивание гистологических срезов гематоксилином и эозином проводили с использованием автоматизированной системы Leica ST 5010 (Leica

Microsystems, Германия). Со срезов удаляли парафин, для этого стекла помещались трижды в ксилол, затем в 96 % спирт и его в растворы с постепенным снижением концентрации до полностью водного раствора [11, 43]. Данная пробоподготовка применялась перед иммуногистохимическим окрашиванием.

Для исследования морфологического строения ткани печени применялся гистологический метод окраски гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Анализ изображений проводили на световом микроскопе Leica DM2500 с видеокамерой Leica DFC420, при помощи программ Leica Application Suite (V4) (Leica Microsystems, Германия), ВидеоТест Морфология 5.0 (Видеотест, Россия).

2.5.1 – Оценка регенераторных процессов в печени

Морфометрические исследования печени включали определение: индекса альтерации ‰, митотического индекса ‰, количества двуядерных гепатоцитов в 1 мм² среза.

Для расчета митотического индекса определяли отношение среднего числа митозов к среднему числу клеток в одном срезе и умножали на 1000. Измеренный показатель выражали в промилле [23].

Индекс альтерации рассчитывали, как отношение количества гепатоцитов с модифицированной структурой к общему количеству гепатоцитов. Клетки с признаками некроза или апоптоза считались модифицированными. Показатель выражали в промилле.

Количество двуядерных гепатоцитов определяли и выражали как количество клеток в 1 мм² среза (N/мм²).

Оценка всех вышеперечисленных параметров производилась при увеличении микроскопа в 1000 раз в 40 полях зрения.

2.5.2 – Определение синусоидальных эндотелиальных клеток

Подсчет количества синусоидальных эндотелиальных клеток печени проводили на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином в 40 полях зрения при увеличении микроскопа $\times 1000$. Полученные результаты выражали в виде количества клеток на 1 мм^2 среза.

2.5.3 – Определение тучных клеток

Тучные клетки в ткани печени выявляли при окраске препаратов толуидиновым синим [81], подсчитывали их количество в единице площади в двадцати полях зрения при увеличении $\times 1000$. Для оценки функциональной активности тучных клеток измеряли интенсивность окрашивания толуидиновым синим сульфатированных гликозаминогликанов в составе секреторных гранул цитоплазмы с помощью программы ВидеоТест «Морфология» 5.0, показатель выражали в единицах оптической плотности.

2.5.4 – Оценка площади коллагена в ткани печени экспериментальных животных

Для выявления коллагена в ткани печени проводили окрашивание гистологических срезов пикросириусом красным (Picro Sirius stain kit, ab 150681) (Abcam, Великобритания). Данный краситель применяется для визуализации коллагеновых волокон I и III типа. Оценка площади коллагена выполнена с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 710 (ZEISS, Германия) при увеличении $\times 400$, программы Zen 2010 и стандартного набора фильтров FITC and Rhodamine (here: «FITC»: Ex: 450-490 nm, Em: 500-550 nm, «Rhodamine»: Ex: 538-562 nm, Em: 570-640 nm) [82]. Получали изображения в формате jpg. Далее с помощью программы ImageJ

(Wayne Rasband, США) проводили вычисление площади коллагена и выражали в процентах от общей площади ткани.

2.6 – Иммуногистохимическое исследование ткани печени экспериментальных животных

Иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ) применялось для идентификации пролиферирующих Ki-67⁺ гепатоцитов, F4/80⁺ макрофагов печени, CD3⁺, CD45⁺ клеток, HSP60⁺ и HSP70⁺ гепатоцитов. Для проведения исследования были использованы антитела, приведенные в таблице (таблица 1).

Для идентификации вышеперечисленных антигенных детерминант (таблица 1) применяли непрямой пероксидазный метод окрашивания [42]. Процедура окрашивания одинакова для всех идентифицируемых антигенов.

Образцы ткани печени экспериментальных животных фиксировались в 10% нейтральном формалине (за исключением фрагментов ткани для выявления CD3⁺, CD45⁺ клеток, для этого применяли цинковый фиксатор) в течение 24 часов, после чего проводилась их гистологическая обработка по стандартной методике с последующей заливкой в парафин и изготовлением гистологических срезов толщиной 3-4 мкм. Срезы помещали на предметные стёкла с адгезивным покрытием Superfrost Plus (Thermo Scientific, США). После высушивания их подвергали депарафинизации, дегидратации и промывке в фосфатно-солевом буфере с Tween 20 (PanReac AppliChem GmbH, Германия), pH 7,6 (PBS + Tween 20).

Фиксация образцов ткани в формалине приводит к изменению трехмерной структуры тканевых белков, при этом может происходить модификация антигенных эпитопов и/или изменение электростатического взаимодействия, что делает невозможным взаимодействие эпитопа антигена с паратопом антитела [7]. Поэтому, до нанесения первичных антител рекомендуется применять демаскировку. В нашем исследовании, основываясь на рекомендациях

производителя антител, был применен метод термической демаскировки путем кипячения в цитратном буфере (pH 6,0) при 95°C в течение 20 минут.

Таблица 1 – Перечень антител, применяемых для проведения иммуногистохимического исследования печени экспериментальных животных

Выявляемый антиген	Первичное антитело: клон, производитель, разведение	Вторичное антитело: клон, производитель, разведение
Ki-67	Purified Mouse Anti-Human Ki67 клон В 56, BD Pharmingentm, США, 1:50	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences, США, 1:50
F4/80	F4/80 Polyclonal Antibody, PA5-21399, Thermo Fisher Scientific, США, 1:200	Biotin Goat Anti-Rabbit IgG, Thermo Fisher, Scientific, США, 1:50
CD3	Purified Mouse Anti-Rat CD3 клон G 4.18, BD Pharmingentm, США, 1:30	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences, США, 1:50
CD45	Purified Mouse Anti-Rat CD45 клон OX-1, BD Pharmingentm, США, 1:30	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences, США, 1:50
HSP60	Mouse anti shock protein 60 (hsp60) клон LK1, Merck Millipore, США, 1:50	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences, США, 1:50
HSP70	HSP 70 (3A3): sc-32239, клон 3A3, Santa Cruz Biotechnology, Inc., США, 1:50	Biotin Goat Anti-Mouse Ig (Multiple Adsorption), поликлональное, BD Biosciences, США, 1:50

Примечание: в левой колонке представлены сокращенные названия клеточных антигенов.

Для минимизации фонового окрашивания проводили блокировку активности эндогенной пероксидазы путём нанесения на срезы на 7 минут 3 % раствора пероксида водорода и последующего, после промывки, нанесения на 30 минут протеинового блока на основе бычьего сывороточного альбумина.

Следующий этап включал инкубацию с первичными антителами в течение 60 минут при 37°C во влажной камере. Остаток не связавшихся реагентов

отмывали в буфере PBS + Tween 20 (3 раза по 5 минут) и после проводили инкубацию с вторичными антителами в течение 60 мин при 37°C во влажной камере, затем повторяли промывку в буфере PBS + Tween 20 (3 раза по 5 минут).

После осуществлялась инкубация с стрептавидин-пероксидазой хрена (SAv-HRP) во влажной камере при 37°C 30 минут. SAv-HRP – фермент для маркировки биотинилированных первичных или вторичных антител. Стрептавидин имеет очень высокое сродство к биотину, конъюгированному с вторичным антителом, а пероксидаза хрена служит в качестве фермента для изменения цвета в различных субстратах.

Для визуализации антигенреактивных клеток использовали тест-систему Novolink TM Polymer Detection System (Novocastra Lab. Ltd), включающую хромогенный субстрат 3,3-диаминобензидин (DAB) в забуференном растворе. DAB-позитивные клетки идентифицировали по коричневому окрашиванию. Для исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контроля. После окрашивания DAB (5 минут) промывали в дистиллированной воде 5 минут, окрашивали гематоксилином (7 минут) и промывали в водопроводной воде 5 минут. Завершающим этапом было обезвоживание в спиртах и просветление в ксилоле, заключали препараты под покровные стекла с использованием монтирующей среды Shandon Consul-Mount (Thermo Scientific).

2.6.1 – Анализ срезов, окрашенных с применением антител к Ki-67

Количественную оценку Ki-67⁺ гепатоцитов проводили в 40 полях зрения при увеличении микроскопа в 1000 раз с последующим пересчетом на 1 мм² среза (N/мм²). Ki-67 является ядерным антигеном, который присутствует в клетках на всех стадиях клеточного цикла кроме периода G₀, что позволяет использовать его в качестве маркера пролиферации гепатоцитов (показателя клеточной регенерации).

2.6.2 – Анализ срезов, окрашенных с применением антител к F4/80

Выявление макрофагов в ткани печени проводили методом ИГХ с применением антител к F4/80, экспрессия которого характерна для мембран тканевых макрофагов, главным образом для макрофагов печени [103, 153, 173]. Оценивали количество F4/80⁺ клеток в ткани печени при увеличении x1000 в 40 полях зрения в пересчёте на 1 мм² среза.

2.6.3 – Анализ срезов, окрашенных с применением антител к CD3 и CD45

Определение количества лейкоцитов в ткани печени включало подсчет клеток, несущих общий лейкоцитарный антиген (CD45⁺). Для оценки вклада Т-лимфоцитов в развитие воспалительной реакции был произведен подсчет CD3⁺ клеток ткани печени экспериментальных животных. Подсчет клеток проводили при увеличении x1000 в 40 полях зрения с последующим перерасчетом на 1 мм² среза.

2.6.4 – Анализ срезов, окрашенных с применением антител к HSP60 и HSP70

Количество HSP60⁺ и HSP70⁺ гепатоцитов оценивали в 40 полях зрения при увеличении микроскопа x400 с последующим пересчетом на 1 мм² среза. Проводили оценку функциональной активности HSP60⁺ и HSP70⁺ гепатоцитов путём измерения оптической плотности цитоплазмы окрашенной области клеток. Величину оптической плотности выражали в относительных единицах. Количество клеток и оптическую плотность цитоплазмы оценивали при помощи программы ВидеоТест Морфология 5.0 (Видеотест, Россия).

2.7 – Оценка апоптоза в ткани печени экспериментальных животных методом TUNEL

Метод TUNEL (TdT-mediated nick and labeling) основан на обнаружении свободных 3'-ОН концов в разорванных молекулах фрагментированной ДНК с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT).

Апоптотическую активность гепатоцитов оценивали с помощью метода иммунофлюоресцентного окрашивания с использованием набора Click-iT™ TUNEL AlexaFluor™ 594 Imaging Assay, for microscopy & HCS, C10618 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США). Окрашивание осуществляли согласно протоколу производителя. Ядра окрашивали DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, США). Заключительные этапы включали обезвоживание в спиртах, просветление в ксилоле.

Количество вступивших в апоптоз гепатоцитов оценивали с использованием конфокального микроскопа LSM710 Carl Zeiss. Для ядерного красителя DAPI длина волны возбуждения была 405 нм, испускания 430-450 нм, для Alexa fluor 594 длина волны возбуждения – 590 нм испускания – 615 нм. Количество исследуемых клеток рассчитывали на единицу площади среза.

2.8 – Иммуноферментные методы анализа

С помощью иммуноферментного метода анализа (ИФА) в плазме крови экспериментальных животных определяли содержание IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α и SCF, в ткани печени – IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ и SCF. Иммуноферментный анализ (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) представляет собой лабораторный иммунологический метод выявления антигенов в исследуемом образце, в основе которого лежит образование комплекса «антиген – антитело» [33].

2.8.1 – Исследование содержания цитокинов в плазме крови экспериментальных животных

Концентрацию IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α и SCF в плазме крови экспериментальных животных определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием прибора Lazurite Automated Elisa System (Dunex Technologies Inc., США) по стандартному протоколу.

Предварительно у экспериментальных животных производили забор крови из хвостовой вены в специально предназначенные пластиковые пробирки, обработанные гепарином в качестве антикоагулянта. Затем полученные образцы центрифугировали с использованием Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия) в течение 15 минут при +4°C на скорости 5000 оборотов в минуту. Полученный супернатант распределяли по 200 мкл в микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф», замораживали и хранили до использования при -80°C. Плазму для анализа размораживали непосредственно перед проведением ИФА.

Перечень наборов для проведения твердофазного ИФА, использованных в работе, приведен в таблице (*таблица 2*).

2.8.2 – Исследование содержания цитокинов в ткани печени экспериментальных животных

В ткани печени экспериментальных животных оценивали концентрацию следующих цитокинов: IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ и SCF.

После извлечения печень промывали, затем помещали в фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH 7,6 (Эко-Сервис, Россия) из расчета 1 мл раствора на 1 мг органа. Все процедуры проводили на льду для предотвращения протеолиза. Ткань дезагрегировали с использованием автоматизированной системы для дезагрегации тканей BD Medimachine (Becton Dickinson, США). Суспензию пропускали через фильтр falcon, BD Bioscience, размером пор 50 мкм, затем

центрифугировали 30 минут при 4°C и 15000 оборотах в минуту, собирали супернатант и разводили в 2 раза PBS. Полученный супернатант распределяли по 200 мкл в микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф», замораживали и хранили до использования при -80°C.

Концентрацию цитокинов в гомогенатах печени определяли методом ИФА согласно стандартным протоколам исследования с применением специальных наборов (таблица 2) и прибора Lazurite Automated Elisa System.

Таблица 2 – Наименование наборов для ИФА, применяемых в исследовании

Определяемое вещество	Наименование набора для ИФА, производитель
IL-6	Rat IL-6 ELISA Kit BMS625/ BMS625 TWO / BMS625 TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IL-10	Rat IL-10 Platinum ELISA BMS629/BMS629 TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IL-18	Rat IL-18 ELISA Kit KRC2341, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
TNF- α	Rat TNF-alpha Platinum ELISA BMS622 TWO/BMS622TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
SCF	Rat Stem cell factor/mast cell growth factor (SCF/MGF) ELISA KIT (CUSABIO BIOTECH CO., LTD, China).
IL-1 α	Rat IL-1 alpha Platinum ELISA BMS627/ BMS627TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
IFN- γ	Rat IFN gamma Platinum ELISA BMS621 TWO/BMS621TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США
TGF- β 1	Rat TGF- β 1 Platinum ELISA BMS623/3/BMS623/3TEN, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, США

Примечание: IL – интерлейкин, TNF- α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли альфа, SCF (stem cell factor) – фактор стволовой клетки, IFN- γ (interferon gamma) – интерферон гамма, TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) – трансформирующий фактор роста бета 1.

2.10 – Статистические методы анализа, использованные в работе для обработки экспериментальных данных

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программного обеспечения OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation, США) с применением непараметрического критерия Краскела-Уоллеса для множественных сравнений (непараметрический метод сравнения трех или более независимых групп). Данный статистический подход был выбран в связи с отсутствием нормального распределения в исследуемых выборках. Для проверки статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0,05$).

ГЛАВА 3 – ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПЕЧЕНИ НА РАННИХ СТАДИЯХ ДИФФУЗНОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ

Повреждение печени при действии гепатотропных ядов характеризуется рядом особенностей, что в большей мере определяется структурно-функциональной неоднородностью органа. Известно, что гепатоциты перивенозной зоны по сравнению с другими клетками печеночной дольки обладают высокой активностью изоферментов Р-450, в связи с чем преимущественно они ответственны за биотрансформацию ядов, в следствии которой образуется большое количество реакционно-активных метаболитов [106]. Ферментные системы, обеспечивающие конъюгацию и антиоксидантную защиту в этих клетках менее развиты. Поэтому повреждение CCl_4 имеет центрлобулярную локализацию и затрагивает гепатоциты перивенозной зоны [139]. Сохранность неповрежденных гепатоцитов в условиях воздействия ксенобиотиков во многом зависит от целого ряда факторов, к числу которых относится: состояние микроокружения, соотношение процессов апоптоза и пролиферации, функциональная активность гепатоцитов, проявляющаяся в секреции ферментов и цитопротекторных белков [215].

3.1 – Структурные изменения в печени при воздействии тетрахлорметана

В ходе проведенного гистологического анализа установлено, что строение печени интактных животных соответствует гистологической норме. Печень представлена дольками, которые состоят из радиально расположенных печеночных балок, представляющих собой анастомозирующие тяжи печеночных клеток. Между балками видны синусоидные капилляры печени, выстланные эндотелиальными клетками. Гепатоциты с эозинофильной

цитоплазмой, мономорфными ядрами. Присутствует небольшое число двуядерных и митотически делящихся гепатоцитов, встречаются единичные гепатоциты с крупными полиморфными и гиперхромными ядрами (рисунк 2).

При гистологическом исследовании печени на 3 сутки после введения CCl_4 были отмечены признаки, характерные для острого токсического гепатита (очаговые некрозы гепатоцитов с перифокальной лимфо-лейкоцитарной инфильтрацией), также обнаружены выраженная диффузная вакуольная дистрофия гепатоцитов, анизоцитоз, анизонуклеоз (рисунк 2).

На 7 сутки в печени животных наряду с уменьшением признаков экссудативного воспаления наблюдали сохранение деструктивных процессов в виде очаговых некрозов по периферии печеночных долек (рисунк 2), полнокровия центральных вен и вен портальных трактов. Уменьшение признаков воспаления на 7 сутки, вероятно, является следствием значительного сокращения, по сравнению с предыдущим сроком, инфильтрации ткани печени лейкоцитами.

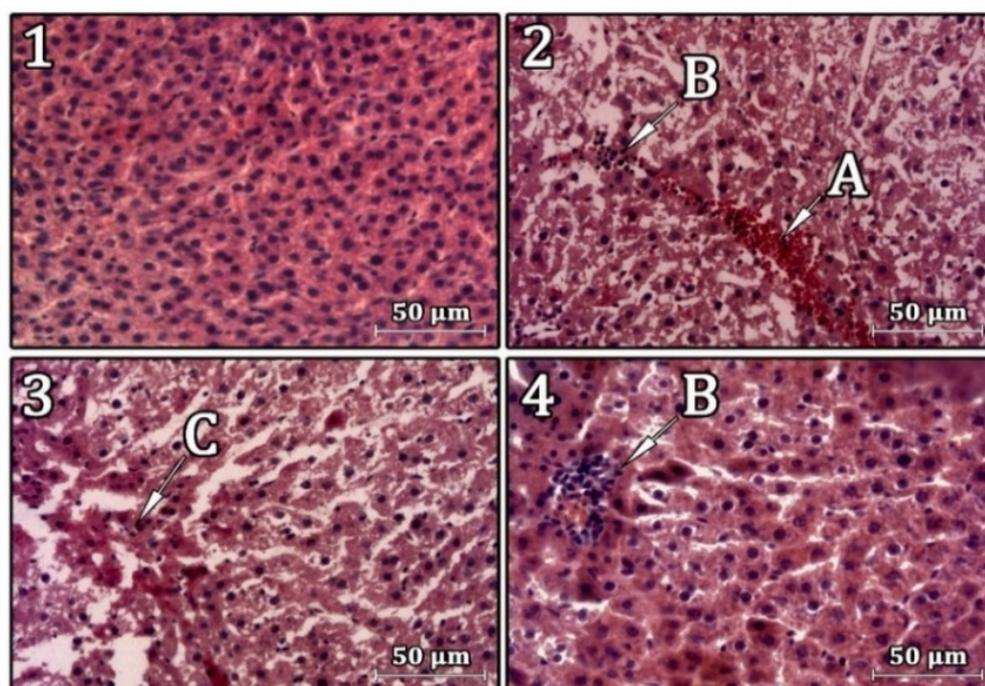


Рисунок 2 – Структура печени экспериментальных животных

Примечание: окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$; 1 – интактная; 2 – CCl_4 3 сутки, 3 – CCl_4 7 сутки, 4 – CCl_4 14 сутки; А – полнокровие, В – очаговая лимфо-лейкоцитарная инфильтрация, С – некроз гепатоцитов.

На 14 сутки после токсического воздействия CCl_4 балочное строение печени не нарушено. Отмечается очаговое полнокровие вен портальных трактов (*рисунок 2*). Характерна умеренная инфильтрация в области портальных трактов лимфоидными элементами без прорыва пограничной пластинки. Перипортально и в системе междолевых протоков отмечаются некрозы гепатоцитов. Признаки анизоцитоза и анизонуклеоза умеренно выражены, визуально отмечается большое количество двуядерных гепатоцитов. Выявлены признаки диффузной зернистой дистрофии гепатоцитов, как следствие нарушения белкового обмена. В синусоидальных пространствах определяются сегментоядерные лейкоциты. Мелкие очаговые инфильтраты в паренхиме органа представлены лимфоидными элементами (*рисунок 2*).

Таким образом, после внутрибрюшинного введения CCl_4 в печени происходят структурные изменения характерные для острого токсического гепатита. На ранние сроки эксперимента патологические изменения в ткани печени проявляются в виде единичных некрозов, признаков крупнокапельной вакуольной дистрофии, полнокровия центральных вен и вен портальных трактов. Обнаруженные морфологические изменения структуры печени, вероятно, обусловлены воспалительной реакцией, которая развивается практически сразу после введения токсиканта.

В более поздние сроки, после интоксикации CCl_4 , нарастают деструктивные процессы в печени. Характерно наличие многочисленных очаговых некрозов гепатоцитов с умеренной перифокальной инфильтрацией лимфоцитами и зернистая дистрофия гепатоцитов, которая является следствием нарушения белкового обмена. Признаки экссудативного воспаления выражены в меньшей степени.

3.2 – Структурные изменения в печени при коррекции токсического повреждения

На фоне применения аминоталгидазида (АФГ) на 3 сутки токсического воздействия сохраняются нарушения со стороны сосудов системы микроциркуляции в виде полнокровия центральных вен и вен портальных трактов, перипортально скапливаются лимфоциты, единичные макрофаги и полиморфноядерные лейкоциты. По периферии печеночных долек имеются очаговые некрозы гепатоцитов без перифокальной клеточной реакции (*рисунок 3*).

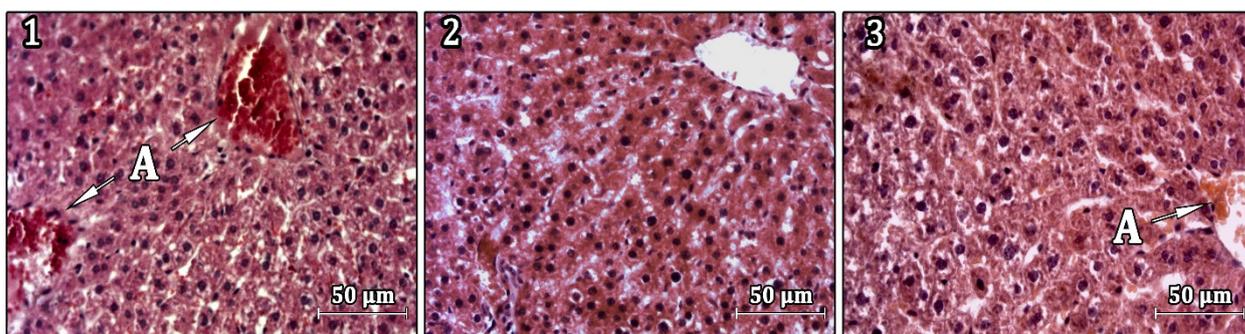


Рисунок 3 – Структурные изменения в печени экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения печени

Примечание: окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 200$; 1 – $\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 3 сутки; 2 – $\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 7 сутки, 3 – $\text{CCl}_4 + \text{АФГ}$, 14 сутки; А – полнокровие.

К 7 суткам эксперимента на фоне применения АФГ очаговые некрозы встречаются только на периферии дольки. Зернистость гепатоцитов сохраняется, гепатоциты с вакуолярной дистрофией не обнаруживаются (*рисунок 3*).

На 14 сутки после применения АФГ отмечается полнокровие центральных вен, части сосудов портальных трактов и синусоидных капилляров. Фокусы вакуолярной дистрофии гепатоцитов по периферии долек (*рисунок 3*). Балочное строение органа не нарушено. В части портальных трактов присутствуют единичные лимфоидные элементы. Гепатоциты с признаками некроза расположены по периферии печеночных долек (*рисунок 3*).

На основании анализа гистологических изменений в ткани печени у крыс с CCl_4 -индуцированной гепатотоксичностью, которым вводили АФГ,

установлено, что уже на 3 сутки эксперимента признаки токсического гепатита менее выражены, а в более поздние сроки, степень деструкции гепатоцитов была минимальна и выражалась в виде некроза и вакуолярной дистрофии единичных клеток, в паренхиме органа присутствовали очаговые скопления лимфоцитов и макрофагов.

3.3 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени в норме при воздействии тетрахлорметана

В ходе морфометрического анализа была проведена оценка числа двуядерных гепатоцитов, как одно из основных показателей внутриклеточной регенерации печени [150, 25]. После действия гепатотропного яда CCl_4 в печени экспериментальных животных на 3 и 7 сутки резко возрастает количество двуядерных гепатоцитов до $51,8 \pm 0,3 \text{ N/мм}^2$ и $51,5 \pm 0,3 \text{ N/мм}^2$ по сравнению с показателями интактной группы $15,4 \pm 1,4 \text{ N/мм}^2$ (таблица 3).

Через две недели после внутрибрюшинного введения CCl_4 количество двуядерных гепатоцитов возросло до $64,27 \pm 5,37 \text{ N/мм}^2$, что существенно превышает показатели интактных животных и на 24 % выше (таблица 3), чем в экспериментальных группах на 3 и 7 сутки.

Кроме процессов внутриклеточной регенерации при диффузном токсическом повреждении печени в ранние сроки наблюдается активация клеточной регенерации. На это указывает увеличение митотического индекса и количества пролиферирующих гепатоцитов (Ki-67^+) в единице площади, выявляемое путем специфического иммуногистохимического окрашивания ядер делящихся клеток (рисунок 4).

В ответ на введение токсиканта на 3 сутки в ткани печени резко возрастает митотический индекс, а также количество Ki-67^+ гепатоцитов. К 7 и 14 суткам митотический индекс снижается относительно группы CCl_4 , 3 сутки на 35 % и 42 % соответственно (таблица 3), но при этом значительно выше, чем у интактных

животных. Количество Ki-67⁺ гепатоцитов на 7 сутки достоверно снижается ($p < 0,05$) (таблица 3) по сравнению с показателями группы CCl₄, 3 сутки и не отличается от значений интактных животных. К 14 суткам количество пролиферирующих гепатоцитов остается пониженным.

Таблица 3 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени в динамике диффузного токсического повреждения и его коррекции

Экспериментальная группа	Измеряемый параметр		
	Двухядерные гепатоциты, N/мм ²	Митотический индекс, ‰	Ki-67 ⁺ гепатоциты, N/мм ²
Интактная	15,4±1,4	0,5±0,3	14,3±1,5
CCl ₄ , 3 сутки	51,8±0,3 ^a	43,7±0,2 ^a	47,6±10,9 ^a
CCl ₄ , 7 сутки	51,5±0,2 ^a	28,6±0,1 ^{a,b}	14,3±2,6 ^b
CCl ₄ , 14 сутки	64,27±5,37 ^{a,b,c}	25,3±1,7 ^{a,b}	10,61±1,82 ^b
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	69,2±0,2 ^{a,b,c}	55,1±0,2 ^{a,b,c,d}	23,4±9,8
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	43,3±0,5 ^{a,b,c,d,e}	23±0,2 ^{a,b,c,e}	5,2±1,3 ^{a,b,c,d}
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	48,36±3,23 ^{a,d,e}	18,4±1,2 ^{a,b,c,d,e}	7,8±1,46 ^{a,b,c}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 3 сутки; с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 14 сутки; e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 3 сутки.

Полученные данные позволяют заключить, что запуск регенераторных процессов в печени происходит сразу после введения CCl₄ и их интенсивность заметно снижается с увеличением срока воздействия токсиканта.

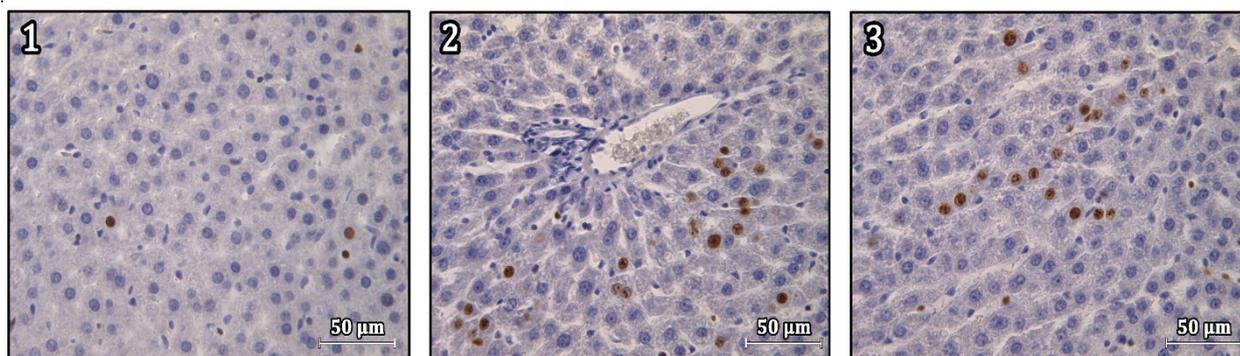


Рисунок 4 – Ki-67⁺ гепатоциты в ткани печени экспериментальных животных

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к Ki-67, увеличение $\times 400$; ядра пролиферирующих гепатоцитов имеют коричневый цвет; 1 – интактная группа; 2 – CCl_4 , 3 сутки; 3 – CCl_4 + АФГ, 3 сутки.

3.4 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени при коррекции токсического повреждения

При коррекции диффузного токсического повреждения печени на 3 сутки наблюдается увеличение количества двуядерных гепатоцитов по сравнению с соответствующей группой без лечения, однако к 7 и 14 суткам их количество достоверно снижается относительно показателей экспериментальных групп животных, подвергавшихся введению CCl_4 (таблица 3).

При введении АФГ на фоне токсического повреждения печени в ранние сроки эксперимента возрастает митотический индекс, что существенно превышает показатель животных интактной группы и группы CCl_4 , 3 сутки. В более поздние сроки исследования количество пролиферирующих гепатоцитов в ткани печени снижается, при этом значения митотического индекса поддерживаются на достаточно высоком уровне.

Применение АФГ при интоксикации CCl_4 снижает степень выраженности деструктивных процессов в гепатоцитах, способствует активации механизмов как клеточной, так и внутриклеточной регенерации только на ранние сроки эксперимента.

3.5 – Характеристика альтеративных процессов и апоптоза в ткани печени при токсическом повреждении

Программируемая клеточная гибель гепатоцитов играет важную роль в патогенезе заболеваний печени, вызванных различными этиологическими факторами, в том числе и при токсическом повреждении печени [87, 207, 240]. Для оценки степени апоптоза в ткани печени после интоксикации CCl_4 был использован метод TUNEL (маркировка концевых участков dUTP терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы) [37].

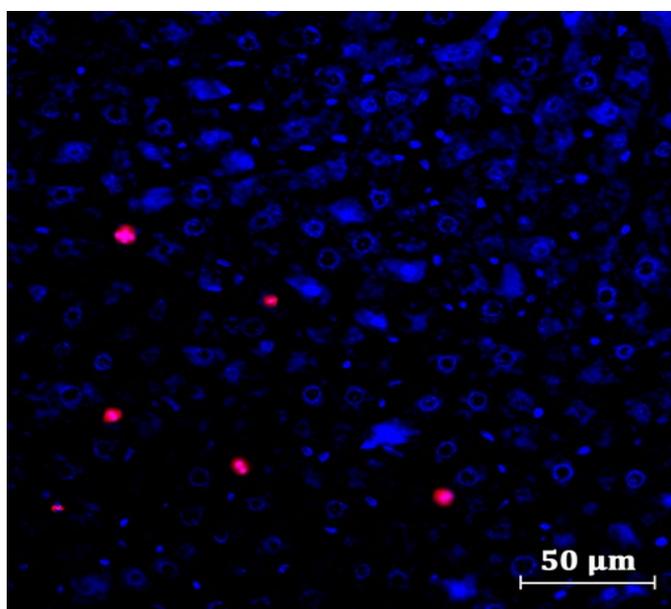


Рисунок 5 – Апоптоз гепатоцитов при токсическом повреждении печени CCl_4 на 7 сутки

Примечание: иммунофлуоресцентное окрашивание, увеличение $\times 400$; ядра TUNEL⁺ гепатоцитов красные.

Детекция апоптоза показала наличие TUNEL-позитивных клеток во всех исследуемых микропрепаратах печени экспериментальных животных (*рисунок 5*). У интактных крыс TUNEL-позитивные гепатоциты составляют $5,39 \pm 0,84$ N/мм² (*таблица 4*).

На 3 сутки после действия гепатотропного яда отмечается тенденция к увеличению числа TUNEL-позитивных гепатоцитов, что свидетельствует об усилении гибели клеток путем апоптоза. В более поздние сроки исследования, на 7 и 14 сутки, происходит увеличение числа апоптотических клеток

(таблица 4) в ткани печени экспериментальных животных по сравнению с показателями интактной группы. Установлено, что при увеличении срока воздействия токсиканта возрастает индекс альтерации.

Таблица 4 – Показатели деструктивных изменений в печени крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном (CCl₄) и на фоне его коррекции аминофталгидразидом (АФГ)

Экспериментальная группа	Измеряемый параметр	
	TUNEL ⁺ гепатоциты, N/мм ²	Индекс альтерации, ‰
Интактная	5,39±0,84	21,8±1,5
CCl ₄ , 3 сутки	7,08±0,92	333,2±0,95 ^a
CCl ₄ , 7 сутки	10,0±1,30 ^a	421,5±0,2 ^{a, b}
CCl ₄ , 14 сутки	12,93±1,33 ^{a, b}	436,7±0,8 ^{a, b, c}
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	6,65±0,95 ^d	253,5±0,9 ^{a, b, c}
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	7,69±1,04 ^d	447,3±0,5 ^{a, b, c, e}
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	8,16±1,0 ^{a, d}	357,9±1,3 ^{a, b, c, d, e, f}

Примечание: а – статистически значимые различия (p<0,05) с группой интактных животных; b – статистически значимые различия (p<0,05) с группой CCl₄, 3 сутки; c – статистически значимые различия (p<0,05) с группой CCl₄, 7 сутки; d – статистически значимые различия (p<0,05) с группой CCl₄, 14 сутки, e – статистически значимые различия (p<0,05) с группой CCl₄ +АФГ, 3 сутки, f – статистически значимые различия (p<0,05) с группой CCl₄ +АФГ, 7 сутки.

На основании результатов исследования можно заключить, что при интоксикации CCl₄ усиливаются альтеративные изменения в печени, при этом апоптоз клеток паренхимы является одним из механизмов гибели и выражается в увеличении числа TUNEL-позитивных гепатоцитов по мере возрастания срока токсического воздействия.

3.6 – Характеристика альтеративных процессов в ткани печени при коррекции токсического повреждения

Модуляция активности макрофагов АФГ на протяжении 3 и 7 суток при диффузном токсическом повреждении печени не приводят к снижению апоптотической гибели гепатоцитов, однако через 2 недели после применения АФГ количество TUNEL-позитивных гепатоцитов достоверно уменьшается (*таблица 4*) по сравнению с группой соответствующего срока без коррекции. На 3 и 14 сутки зафиксировано снижение индекса альтерации (*таблица 4*), при этом показатель существенно превышает значения интактной группы животных.

Таким образом, показано, что инъекции АФГ оказывают апоптозпротективное действие на гепатоциты в условиях токсического повреждения, вызванного CCl_4 .

3.7 – Продукция белков теплового шока 60 и 70 кДа в норме и при токсическом повреждении печени

При воздействии стрессорных факторов на организм, в том числе при токсическом воздействии происходит нарушение структуры белковых молекул. Противодействие нарушению структуры различных белков организма оказывают белки теплового шока (HSP) – класс консервативных белков, среди них наибольший интерес представляют HSP60 и HSP70.

Повреждение паренхимы печени при интоксикации CCl_4 приводит к изменению экспрессии белков теплового шока в гепатоцитах (*рисунок 6*). Установлено, что на 3 сутки после интоксикации CCl_4 количество гепатоцитов, содержащих гранулы HSP60 снижается на 52 % по сравнению с показателями интактных животных (*таблица 5*), однако оптическая плотность цитоплазмы резко возрастает, что может свидетельствовать о накоплении данного белка в клетках печени. Известно, что цитоплазматический HSP60 способен

образовывать комплекс с белками, ответственными за апоптоз и регулирует активность этих белков [159], а также способствует активации врожденного и адаптивного иммунного ответа на ранних стадиях воспалительного процесса.

Таблица 5 – Белки теплового шока в печени крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном (CCl₄) и на фоне его коррекции аминофталгидразидом (АФГ)

Показатель	Экспериментальная группа			
	Гепатоциты с гранулами HSP60, N/мм ²	Оптическая плотность гепатоцитов с гранулами HSP60, отн. ед.	Гепатоциты с гранулами HSP70, N/мм ²	Оптическая плотность гепатоцитов с гранулами HSP70, отн ед.
Интактная	42,68±4,57	0,1±0,003	25,17±4,50	0,33±0,004
CCl ₄ , 3 сутки	20,47±5,77 a	0,23±0,005 a	42,64±6,49 a	0,34±0,008
CCl ₄ , 7 сутки	77,02±9,21 a, b	0,17±0,003 a, b, e	30,16±5,54	0,34±0,008
CCl ₄ , 14 сутки	36,87±5,87 a, b, c, f	0,23±0,004 a, c, e, f	32,45±5,21 e	0,32±0,005 a, c
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	51,87±10,49 b	0,15±0,003 a, b	7,49±2,14 a, b, c	0,25±0,004 a, b, c, d
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	83,89±10,89 b	0,26±0,005 a, b, c, e	25,38±5,20 e	0,37±0,005 a, b, c, d, e
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	54,52±11,69 a, b, c, f	0,14±0,004 a, b, c, d, f	24,75±4,36 e	0,27±0,008 a, b, c, d, e, f

Примечание: HSP (heat shock proteins) – белки теплового шока; a – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; b – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 3 сутки; c – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 14 сутки, e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 3 сутки, f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ +АФГ, 7 сутки.

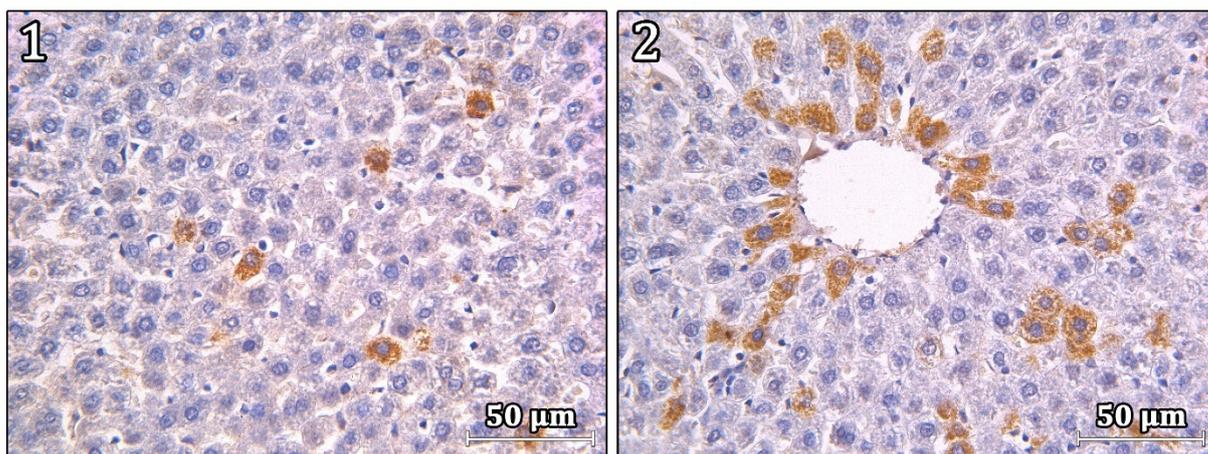


Рисунок 6 – HSP70⁺-гепатоциты в ткани печени экспериментальных животных

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание, увеличение $\times 400$; 1 – интактная группа, 2 – CCl_4 , 3 сутки; цитоплазма HSP70⁺-гепатоцитов имеет желто-коричневый цвет.

Противоположная картина отмечается на 7 сутки эксперимента, когда количество клеток с HSP60 возрастает на 73,4 % по сравнению с предыдущим сроком исследования, а оптическая плотность цитоплазмы снижена (*таблица 4*). Можно предположить, что решающая роль в поддержании регенераторного потенциала клеток паренхимы печени на 7 сутки после воздействия CCl_4 принадлежит HSP60 и выражается в увеличении количества гепатоцитов с содержанием гранул данного белка. Повышенный HSP60 выступает в качестве фактора, сдерживающего избыточный апоптоз гепатоцитов, в то время как уменьшение количества HSP60⁺-клеток (*таблица 5*) сопровождается резким увеличением степени апоптоза к 14 суткам.

Увеличение количества гепатоцитов с содержанием гранул HSP70 на 3 сутки (*таблица 5*) после введения токсиканта свидетельствует о повышении метаболической активности сохранившихся гепатоцитов. Именно HSP70 участвуют в начальных этапах восстановления нативной конформации белков и служат инициаторами регенерации. Повышенная продукция HSP70 вероятно защищает клетку от воздействия токсиканта и продуктов метаболизма, а также препятствует переходу начальных реакций апоптоза в необратимую стадию.

В зависимости от срока воздействия гепатотропного яда изменяется количество гепатоцитов продуцирующих тот или иной белок теплового шока. К 3 суткам после введения CCl_4 в ткани печени возрастает число HSP70^+ -гепатоцитов, а к 7 суткам – HSP60^+ -гепатоцитов.

3.8 – Продукция белков теплового шока 60 и 70 кДа при коррекции токсического повреждении печени

Модуляция активности макрофагов АФГ на ранних сроках токсического воздействия позволяет поддерживать высокую экспрессию HSP60 в гепатоцитах (*таблица 5*), что вероятно сдерживает активность белков, ответственных за апоптоз. Снижение показателей оптической плотности на 3 и 14 сутки коррекции токсического повреждения печени (*таблица 5*) может свидетельствовать о высвобождении данного белка во внеклеточное пространство либо путем «утечки», вызванной повреждением клеток или апоптозом, либо через активную секрецию [97]. Согласно последним литературным данным, внеклеточный HSP60 действует как иммуностимулятор для привлечения лейкоцитов к месту повреждения и тем самым модулирует местный воспалительный ответ. Также имеются данные о том, что экзогенный HSP60 стимулирует пролиферацию клеток в культуральной среде [97].

Применение АФГ на 3 сутки приводит к уменьшению числа гепатоцитов с гранулами HSP70 (*таблица 5*) не только относительно соответствующего срока без коррекции, но и по сравнению с показателями интактных животных. Оптическая плотность клеток с содержанием HSP70 изменяется аналогично показателям HSP60 .

Инъекции АФГ оказывают апоптозпротективное действие на гепатоциты при воздействии CCl_4 . Применение АФГ в ранних этапах токсического повреждения способствует увеличению количества гепатоцитов с гранулами HSP60 и снижению HSP70 , повышает концентрацию внеклеточной формы HSP60 и HSP70 .

3.9 – Коллаген в ткани печени в норме при токсическом повреждении тетрахлорметаном

Активация системных и локальных универсальных механизмов воспаления, направленных на элиминацию гепатотропных агентов и токсических продуктов метаболизма, в целом, опосредует нарушение тканевого гомеостаза печени и способствует прогрессии фиброгенеза [49, 144]. Для оценки степени фиброза в ткани печени проводили окрашивание гистологических срезов пикросириусом красным (*рисунок 7*). Данный краситель используется для выявления коллагена I и III типа [82].

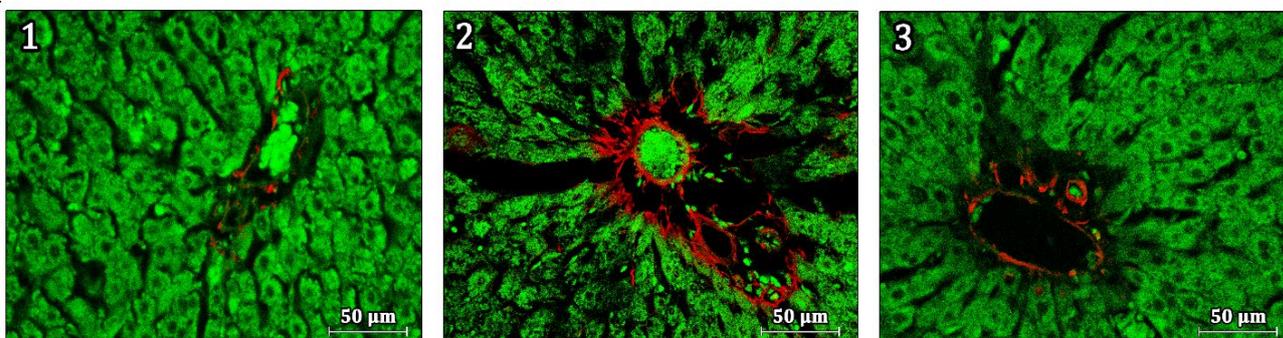


Рисунок 7 – Коллагеновые волокна в ткани печени экспериментальных животных

Примечание: окрашивание пикросириусом красным, увеличение $\times 400$; 1 – интактная группа; 2 – CCl_4 , 14 суток; 3 – CCl_4 +АФГ, 14 суток; красный цвет – волокна коллагена, зеленый – гепатоциты.

Исследование состояния ткани печени экспериментальных животных показало, что в норме площадь коллагена в ткани печени составляет $1,48 \pm 0,19\%$ (*таблица 6*). На 3 суток токсического воздействия CCl_4 отмечается увеличение площади, занимаемой коллагеном в 1,9 раза по сравнению с показателями интактных животных (*таблица 6*).

Данная картина характерна для 7 суток CCl_4 -интоксикации. К 14 суткам площадь коллагена возрастает практически в 5 раз (*таблица 6*) по сравнению с показателями интактных животных. Увеличение площади коллагена в поврежденной печени по мере возрастания срока токсического воздействия

свидетельствует о прогрессии фибротических изменений, возникающих в следствии некроза и апоптоза гепатоцитов.

Таблица 6 – Изменение площади коллагена в печени экспериментальных животных

Экспериментальная группа	Показатель
	Площадь коллагена, %
Интактная	1,48±0,19
CCl ₄ , 3 сутки	2,80±0,50 ^a
CCl ₄ , 7 сутки	2,86±0,46 ^a
CCl ₄ , 14 сутки	7,36±1,20 ^{a, b, c}
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	1,52±0,15 ^{b, d}
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	1,80±0,28 ^{b, d}
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	1,69±0,20 ^{b, d}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 3 сутки; с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 14 сутки.

3.10 – Коллаген в ткани печени при коррекции токсического повреждения

Показано, что модуляция активности макрофагов АФГ (в/м 2 мг/кг) приводит к снижению степени фиброза в регенерирующей печени уже на 3 сутки (*таблица 6*). Количество коллагена сохраняется на уровне физиологической нормы на протяжении 14 дней (*таблица 6*). Данный факт дает основание полагать, что АФГ за счет снижения степени деструктивных изменений сдерживает избыточный рост коллагена в поврежденной печени и тем самым препятствует развитию фиброза.

Резюме

Особенности регенераторного процесса в печени на ранних сроках после воздействия гепатотропного яда проявляются в увеличении митотической активности паренхиматозных клеток и одновременной активизацией внутриклеточных восстановительных процессов, сопровождающихся увеличением двуядерных гепатоцитов. Преобладающим типом регенерации в отдаленные сроки, на 14 сутки после внутрибрюшинного введения CCl_4 , является внутриклеточная регенерация. Регенераторный ответ гепатоцитов выражается в изменении продукции белков теплового шока 60 и 70 кДа. Увеличение количества гепатоцитов с содержанием гранул HSP70 на ранних сроках воздействия токсиканта может служить фактором, сдерживающим апоптоз гепатоцитов, в то время как уменьшение HSP60⁺ гепатоцитов напротив служит апоптотическим стимулом. Усиление деструктивных процессов, включая, избыточную апоптотическую гибель гепатоцитов, приводит к структурным изменениям стромы и процессам фиброгенеза, что выражается в увеличении площади коллагена.

На фоне модуляции активности макрофагов АФГ в условиях токсического повреждения печени только на ранних сроках возрастают показатели клеточной и внутриклеточной регенерации. В более отдаленные сроки эксперимента воздействие на макрофаги приводит к повышению метаболической активности клеток паренхимы, что выражается в увеличении количества HSP60⁺-гепатоцитов. Уменьшается выраженность деструктивных изменений паренхимы, что проявляется в снижении степени апоптоза гепатоцитов и отложения коллагена.

Список статей, опубликованных по материалам главы 3

1. Состояние соединительнотканых элементов при диффузном токсическом повреждении печени и его коррекции / С.Ю. Медведева, **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т 13 (22), № 2. – С. 861–863.

2. Иммуномодулирующее влияние аминоталгидразида на клетки печени при диффузном токсическом повреждении / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.Г. Сенцов, М.Т. Абидов // Токсикологический вестник. – 2019. – № 5 (158). – С. 39–44.

3. **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. doi: 10.22138/2500-0918-2020-17-4-313-322.

4. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, **Z.A. Shafigullina**, I.F. Gette, V.G. Sencov, S.Yu. Medvedeva, M.T. Abidov // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80. – 106124. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.

5. **Shafigullina, Z.A.** Immunological Regulation of Hepatocyte Apoptosis during Toxic Damage / **Z.A. Shafigullina**, I.G. Danilova // Proceedings – 2020 Ural Symposium on Biomedical Engineering, Radioelectronics and Information Technology, USBEREIT 2020. – 2020. – 9117693. P. 121–124. doi: 10.1109/USBEREIT48449.2020.9117693.

ГЛАВА 4 – ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

Проведение биохимического и гематологического анализа является необходимой процедурой входе медико-биологических исследований. Полученные показатели являются чрезвычайно важными для оценки влияния исследуемого вещества на органы и ткани, а также позволяют судить о корректности сформированной экспериментальной патологии.

Для оценки функционального состояния печени при различных заболеваниях (вирусный, токсический гепатит, цирроз, холестаз, опухоли) используется достаточно широкий комплекс биохимических показателей: определение активности ферментов АСТ, АЛТ, щелочной фосфатазы, концентрации общего билирубина, общего белка, альбумина и глобулина [12].

4.1 – Биохимические показатели экспериментальных животных в норме и при токсическом воздействии тетрахлорметана

Активность АСТ, АЛТ и щелочной фосфатазы оценивали в образцах сыворотки крови как маркеры повреждения мембраны гепатоцитов. На 3 и 7 сутки токсического воздействия обнаружено достоверное повышение активности сывороточного АЛТ, тогда как активность АСТ увеличилась только на 3 сутки после введения токсиканта (*таблица 7*). Увеличение активности АЛТ, содержащегося в гепатоцитах в большем количестве по сравнению с АСТ, свидетельствует о явлении цитолиза гепатоцитов. Дополнительным биохимическим критерием, подтверждающим повреждение гепатоцитов, является достоверное снижение коэффициента де Ритиса ниже единицы на 3 и 7 сутки эксперимента (*таблица 7*). В эти же сроки наблюдается повышение активности щелочной фосфатазы. Этот фермент локализован на мембране

гепатоцитов, обращенной в сторону желчного капилляра, и в норме должен экскретироваться в желчь [3]. Увеличение активности щелочной фосфатазы в плазме крови свидетельствует о развитии холестатического синдрома, при котором компоненты желчи задерживаются в печени и при нарушении целостности мембран гепатоцитов поступают в кровь. Развитие холестатического синдрома подтверждается увеличением количества общего билирубина также на 3 и 7 сутки после введения CCl_4 (таблица 7).

При сравнении содержания общего количества белка в группах крыс на 3, 7 и 14 сутки после введения токсиканта не было обнаружено достоверных отличий по сравнению с показателем интактной группы. В то же время было выявлено снижение содержания альбуминов в плазме крови на 3, 7 сутки и увеличение содержания глобулинов на 7 сутки эксперимента (таблица 7). Уменьшение количества альбуминов в плазме крови указывает на недостаточность белоксинтетической функции печени, что подтверждается снижением альбумино-глобулинового индекса на 3 и 7 сутки после введения CCl_4 (таблица 7). Избыточное количество глобулинов на 7 сутки (таблица 7) может быть следствием усиленной продукции белков острой фазы, участвующих в воспалительном процессе.

Отсутствие снижения уровня мочевины в плазме крови, свидетельствующее о достаточной активности орнитинового цикла, и отсутствие снижения продукции глобулинов, синтезирующихся преимущественно в печени, являются признаками сохранности части синтетических процессов в печени. Известно, что действие CCl_4 сопровождается поражением почек [38]. Следует отметить увеличение уровня мочевины на 3 и 7 сутки после введения CCl_4 (таблица 7) при неизменном содержании сывороточного креатинина, что можно расценивать как проявление в небольшой степени нарушения фильтрации в почечных клубочках.

Таблица 7 – Биохимические показатели экспериментальных животных в динамике диффузного токсического повреждения печени тетрахлорметаном (CCl₄) и его коррекции аминифталгидразидом (АФГ)

Измеряемый параметр	Экспериментальная группа						
	Интактная (а)	CCl ₄ , 3 сутки (b)	CCl ₄ , 7 сутки (c)	CCl ₄ , 14 сутки	CCl ₄ +АФГ, 3 сутки (d)	CCl ₄ +АФГ, 7 сутки (e)	CCl ₄ +АФГ, 14 сутки
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), мкмоль/мин·л	16,46±0,96	20,52±0,32 a	16,12±0,87 b	16,12±0,75	17,24±0,81 b	16,18±0,55	15,74±0,87
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), мкмоль/мин·л	12,93±0,88	21,04±0,68 a	17,56±0,34 a, b	12,40±0,57 b, c	15,80±0,57 ^a b	12,04±0,59 c	11,78±0,74
АСТ/АЛТ, усл. ед.	1,29±0,06	0,98±0,03 a	0,92±0,04 a	1,31±0,06 b, c	1,09 ±0,04 a	1,36±0,08 c	1,36±0,12
Щелочная фосфатаза, мкмоль/мин·л	69,7±3,9	128,2±2,9 a	108,8±11,5 a	76,0±8,1 b, c	96,7±5,5 a,b	85,6±12,0	68,6±4,7 d, e
Мочевина, ммоль/л	5,09±0,30	7,98±0,38 a	7,40±0,48 a	5,42±0,52 b, c	5,78±0,37 b	5,55±0,73	5,15±0,28
Креатинин, мкмоль/л	64,12±2,45	78,95±6,58	76,92±5,04	67,46±4,13	72,52±6,53	72,80±7,48	64,92±4,43
Общий белок, г/л	70,41±2,01	69,44±1,76	70,14±1,20	68,70±2,33	67,72±0,68	74,30±2,87	65,33±1,05
Альбумины, г/л	38,59 ±1,12	32,92±0,85 a	30,80±1,43 a	34,26 ±1,53 b, c	35,74±1,25	36,64±1,87 c	37,10±1,89
Глобулины, г/л	31,83 ±1,98	36,52±2,16	39,34±1,29 a, b	34,44±2,16	31,98±1,07	37,66±2,15	28,23±1,73
Альбумины/ Глобулины, у. е.	1,25±0,08	0,91±0,06 a	0,79±0,06 a	1,02±0,09	1,13±0,08	0,99±0,08 a, d	1,34±0,16 e
Общий билирубин, мкмоль/л	2,71±0,25	17,05±2,27 a	6,92±0,51 a, b	2,93±0,15 b, c	7,44±0,91 a, b	4,03±0,64 c	2,52±0,48 d, e

Примечание: а, b, c, d, e – статистически значимые различия (p<0,05) с группой (a), (b), (c), (d), (e) соответственно.

Данные биохимического анализа подтверждают, что при действии CCl_4 в дозе 50 мг/100 г массы тела у экспериментальных животных развивается токсический гепатит с умеренно выраженным воспалительным процессом, сопровождающимся развитием цитолиза, внутреннего холестаза, умеренным снижением синтетической функции печени и процесса фильтрации в почках.

4.2 – Биохимические показатели экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения

У крыс, получавших инъекции АФГ по сравнению с группой без лечения на 3 сутки эксперимента зафиксировано снижение активности АЛТ и коэффициента де Ритиса (*таблица 7*). К 7 суткам токсического воздействия на фоне применения АФГ эти показатели нормализовались, и их значения стали достоверно меньше, чем у нелеченых крыс группы CCl_4 , 7 сутки (*таблица 7*). Аналогичные изменения зафиксированы для активности щелочной фосфатазы и содержания билирубина после действия АФГ: повышение показателей на 3 сутки и снижение до уровня интактной группы на 7 сутки (*таблица 7*). Нормализацию активности аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и количества общего билирубина после применения АФГ можно оценить, как снижение выраженности цитолитического и холестатического синдромов.

Введение АФГ на фоне токсического воздействия CCl_4 сопровождалось нормализацией маркеров белкового обмена, за исключением сниженного на 7 сутки альбумино-глобулинового индекса. Содержание мочевины после действия АФГ также снизилось до уровня показателя интактных животных и на 3 сутки достоверно отличалось от значения соответствующей группы без лечения (*таблица 7*).

К 14 суткам после инъекций АФГ у животных, подвергавшихся воздействию CCl_4 , все исследованные биохимические показатели были на уровне интактных (*таблица 7*).

Таким образом, действие АФГ, обладающего свойством модуляции активности моноцитов-макрофагов и антиокислительной активностью, сопровождалось уменьшением выраженности цитолиза и холестаза и нормализацией белоксинтетической функции печени, а также нормализацией фильтрующей функции почек на 3-7 сутки действия токсиканта. АФГ уменьшает CCl_4 -индуцированное повышение уровней ферментов у экспериментальных животных, что свидетельствует о его мембраностабилизирующей активности.

4.3 – Изменение гематологических показателей у крыс в норме и при токсическом воздействии тетрахлорметана

Для оценки состояния организма в условиях токсического повреждения печени были изучены изменения, происходящие в периферической крови, которые определяли на 3, 7 и 14 сутки после воздействия CCl_4 . Установлено, что при токсическом воздействии CCl_4 по мере увеличения срока эксперимента возрастает количество эритроцитов и гематокритный показатель (*таблица 8*). Также на 3 сутки возрастает ширина распределения эритроцитов по объему и остается повышенной на 14 сутки (*таблица 8*) относительно показателей здоровых животных. Средний объем эритроцита оставался на уровне исходных величин. Содержание гемоглобина в крови увеличилось с $14,12 \pm 0,25$ г/л в исходе до $17,86 \pm 0,47$ г/л к 14 суткам эксперимента (*таблица 8*), при этом содержание гемоглобина в эритроцитах и средняя его концентрация существенно не изменились по сравнению с показателями интактной группы.

При интоксикации CCl_4 на 14 сутки зафиксировано снижение количества тромбоцитов и тромбокритного показателя (*таблица 8*). Такие показатели как усредненное значение объема тромбоцита, ширина распределения тромбоцитов по объему оставались в пределах одного уровня на протяжении всего периода исследования.

Содержание лейкоцитов в течение первых 3 суток токсического повреждения печени возросло в 2 раза по сравнению с показателями интактных животных и оставалось повышенным на 14 сутки (*таблица 8*). Увеличение количества лейкоцитов происходило за счет возрастания фракции лимфоцитов и средних клеток (к которым относятся моноциты, эозинофилы и базофилы): к 14 суткам количество первых повысилось с $6,64 \pm 0,58$ г/л до $13,52 \pm 3,94$ г/л, а вторых с $0,96 \pm 0,12$ г/л до $6,72 \pm 1,17$ г/л (*таблица 8*).

На 3 сутки после инъекций CCl_4 отмечалось увеличение абсолютного количества гранулоцитов до $4,16 \pm 0,62$ г/л по сравнению с интактными $1,38 \pm 0,14$ г/л, в более поздние сроки зафиксировано уменьшение содержания гранулоцитов до $0,5 \pm 0,16$ г/л (*таблица 8*).

4.4 – Изменение гематологических показателей у крыс при коррекции токсического повреждения

Применение АФГ при токсическом воздействии не оказывает влияния на количество эритроцитов, гематокритный показатель и ширину распределения эритроцитов по объему, также остается неизменным средний объем эритроцита и концентрация гемоглобина в нем по сравнению с показателями групп без коррекции.

Установлено, что АФГ способствует незначительному снижению концентрации лейкоцитарной фракции на 3 и 7 сутки эксперимента (*таблица 8*), но при этом значения выше, чем у интактных животных. Снижение количества лейкоцитов обусловлено уменьшением количества гранулоцитов в 3 раза (*таблица 8*) по сравнению с показателями интактной группы. Также зафиксировано снижение процентного содержания лимфоцитов в периферической крови экспериментальных животных на 7 сутки после инъекций АФГ и повышение числа средних клеток (MID) (*таблица 8*).

Таблица 8 – Гематологические показатели экспериментальных животных

Показатель	Экспериментальная группа						
	Интактная	CCl ₄ , 3 сутки	CCl ₄ , 7 сутки	CCl ₄ , 14 сутки	CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	CCl ₄ +АФГ, 14 сутки
WBC – лейкоциты, г/л	10,36±0,88	22,26±2,98 a	23,28±4,67 a	21,24±5,09 a	17,9±2,26 a	17,2±2,49 a	22,65±2,99 a
LYM – лимфоциты (абсолютное число), г/л	6,64±0,58	13,08±2,17	18,8±9,52	13,52±3,94 a,e	7,3±0,40	10,3±0,89 a,e	13,5±1,88 a,e
MID – смесь моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток (абсолютное число), Т/л	0,96±0,12	3,26±1,66	3,48±1,11 a	6,72±1,17 a,b,e	0,8±0,42	5,2±1,21 a,e	7,45±1,29 a,b,e
LYM% – лимфоциты, %	63,8±1,46	55,7±5,05	76,4±3,09 ^{a,b,e}	62,4±3,66 e	42,75±4,75 a	61,25±4,09 c	59,75±3,75 c
MID – смесь моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток, %	9,8±0,58	12,2 ±3,72	18,0±1,84 a,e	32,8±3,48 a,b,c,e	4,0±1,91 a	29,5±2,75 a,b,c,e	33,0±3,24 a,b,c,e
GRN – гранулоциты (абсолютное количество), Т/л	1,38±0,14	4,16±0,62 a	0,5±0,16 a,b,e	0,5±0,08 a,b,e	4,9±0,96 a	0,85±0,27 b,e	0,85±0,15 b,e
GRN% – гранулоциты, %	26,4±1,63	52,8±1,24 a	5,6±1,69 a,b,e	4,8±0,37 a,b,e	53,25±4,33 a	9,25±1,93 a,b,e	7,25±0,75 a,b,e
RBC – эритроциты, Т/л	7,55±0,14	8,55±0,18 a	8,77± 0,11 a,e	9,418±0,24 a,c,e,f	8,02±0,22	8,39±0,17 a	9,51±0,30 a,e
Hb – гемоглобин, г/дл	14,12±0,25	15,32±0,31 a	16,48±0,14 a,b	17,86±0,47 a,b,f	14,85±0,35	15,35±0,21 a,c	18,1±0,68 a,b,f
Nct – гематокритный показатель, %	39,9±0,82	45,32±0,96 a	47,46±0,66 a,e	50,84±1,11 a,b,c,e,f	43,6±0,91	45,55±0,38 a	51,475±1,77 a,e

Продолжение таблицы 8

Показатель	Экспериментальная группа						
	Интактная	CCl ₄ , 3 сутки	CCl ₄ , 7 сутки	CCl ₄ , 14 сутки	CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	CCl ₄ +АФГ, 14 сутки
MCV – средний объем эритроцита, фл	52,86±0,24	53,0±0,37	54,14±0,61	54,0±0,76	54,45±0,71	54,38±0,73	54,125±0,59
MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	18,7±0,08	17,92±0,14 a	18,8±0,28 b	18,98±0,28 b	18,5±0,17 b	18,33±0,35	19,0±0,13 b
MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	35,4±0,28	33,82±0,30 a	34,78±0,34 b	35,12±0,22 b	34,08±0,43 a	33,78±0,55	35,13±0,39
RDW – ширина распределения эритроцитов по объему, %	15,06±0,13	16,24±0,11 a	16,04±0,38	16,22±0,37 a	16,1±0,57 a	15,675±0,18 a,b	16,25±0,10 a,f
Plt – тромбоциты, Т/л	834,6±20,20	884,6±59,40	821,0±25,55	618,4±41,28 a,b,c,f	822,0±53,48	884,5±61,23	713,75±82,23
Pct – тромбокритный показатель, %	0,56±0,01	0,59±0,04	0,55±0,02	0,42±0,04 a,b,c,e,f	0,54±0,03	0,61±0,04	0,48±0,05
MPV – усредненное значение объема тромбоцита, фл	6,74±0,02	6,66±0,04	6,7±0,05	6,7±0,21	6,68±0,13	6,88±0,09	6,75±0,13
PDW – ширина распределения тромбоцитов по объему, %	11,18±0,06	11,06±0,09	11,22±0,12	11,58±0,24	11,1±0,21	11,15±0,27	11,3±0,15

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с интактной группой; b – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 3 сутки; c – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки; e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 3 сутки; f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 7 сутки.

Количество тромбоцитов и тромбоцитарные индексы на фоне применения иммуномодулятора оставались в пределах одного уровня на протяжении всего наблюдаемого периода (*таблица 8*).

Резюме

Согласно результатам биохимического анализа установлено, что ранних сроках после введения тетрахлорметана (CCl_4) развивается токсический гепатит, сопровождающийся развитием цитолиза, внутреннего холестаза, умеренным снижением синтетической функции печени и процесса фильтрации в почках. Через 14 суток с момента введения гепатотропного яда биохимические показатели снижаются относительно параметров группы CCl_4 3 сутки и соответствуют уровню интактных.

Действие аминофталгидазида (АФГ), обладающего свойством модуляции активности моноцитов-макрофагов и антиокислительной активностью, способствует уменьшению выраженности цитолиза и холестаза, восстановлению белоксинтетической функции печени, а также нормализации фильтрующей функции почек на 3-7 сутки действия токсиканта. АФГ уменьшает CCl_4 -индуцированное повышение уровней ферментов у экспериментальных животных, что свидетельствует о его мембраностабилизирующей активности.

Токсическое действие CCl_4 в ранние сроки эксперимента приводит к увеличению содержания лимфоцитов и гранулоцитов в периферической крови, что свидетельствует о развитии экссудативного воспаления. На 7 и 14 сутки действия CCl_4 реакция организма проявляется увеличением числа моноцитов и значительным снижением уровня гранулоцитов. Внутримышечное введение АФГ при токсическом гепатите приводит к увеличению содержания лимфоцитов, моноцитов и снижению процентного содержания гранулоцитов.

Список статей, опубликованных по материалам главы 4

1. Изменение функциональных показателей повреждения печени при экспериментальном токсическом гепатите и способ их коррекции / В.А. Черешнев, **З.А. Шафигуллина**, С.Ю. Медведева, И.Ф. Гетте, С.А. Бриллиант, И.Г. Данилова // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 12 (21), №4. – С. 785–787.

2. Accelerated liver recovery after acute CCl_4 poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, **Z.A. Shafigullina**, I.F. Gette, V.G. Sencov, S.Yu. Medvedeva, M.T. Abidov // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80. – 106124. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.

ГЛАВА 5 – РОЛЬ КЛЕТОЧНОГО КОМПОНЕНТА СТРОМЫ ПЕЧЕНИ В РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССАХ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

В регуляции регенерации и деструктивных изменений печени в условиях нормы, а также при патологии важная роль принадлежит непаренхиматозным клеткам. Популяция непаренхиматозных клеток включает синусоидальные клетки печени (приблизительно 50%), макрофаги (клетки Купфера) (приблизительно 20%), лимфоциты (приблизительно 25%), холангиоциты (приблизительно 5%) [105, 188]. Динамические взаимодействия между многочисленными популяциями клеток печени являются ключом к поддержанию баланса и общего состояния ткани [140].

5.1 – Синусоидальные эндотелиальные клетки в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

Синусоидальные клетки печени расположены вдоль печеночных синусоидов и к их числу относят эндотелиальные клетки, звездчатые макрофаги (клетки Купфера), перисинусоидальные липоциты (клетки Ито), pit-клетки и дендритные клетки [14]. Данные клетки выполняют роль «барьера» в печеночных синусоидах, обеспечивают фильтрацию, эндоцитоз, презентацию антигенов и привлечение лейкоцитов к месту повреждения [208]. Синусоидальные клетки первыми взаимодействуют с различными патогенами, токсинами и другими повреждающими факторами, так как синусоиды и микроциркуляция печени служат основным объектом иммунопатологических реакций [5].

В условиях физиологической нормы количество синусоидальных эндотелиальных клеток в ткани печени крыс составляет $96,90 \pm 0,48$ N/мм² (таблица 9).

В соответствии с морфометрическими данными на 3 сутки после введения токсиканта отмечается достоверное увеличение количества синусоидальных клеток с $96,9 \pm 0,48$ N/мм² (интактная группа) до $130,0 \pm 0,28$ N/мм² (таблица 9).

Таблица 9 – Изменение количества синусоидальных эндотелиальных клеток в динамике токсическом повреждении печени и его коррекции

Экспериментальная группа	Показатель
	Синусоидальные эндотелиальные клетки печени, N/мм ²
Интактные	$96,90 \pm 0,48$
CCl ₄ , 3 сутки	$130,0 \pm 0,28$ ^a
CCl ₄ , 7 сутки	$58,0 \pm 0,37$ ^{a, b}
CCl ₄ , 14 сутки	$53,0 \pm 1,26$ ^{a, b}
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	$243,30 \pm 0,83$ ^{a, b}
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	$88,0 \pm 0,46$ ^{c, c}
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	$109,20 \pm 2,37$ ^{d, e, f}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; b – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 3 сутки, c – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 14 сутки, e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 3 сутки, f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 7 сутки.

На 7 и 14 сутки после воздействия CCl₄ наблюдается снижение числа синусоидальных клеток не только относительно интактной группы, но и относительно группы CCl₄, 3 сутки до значения $58,0 \pm 0,37$ N/мм² и $53,0 \pm 1,26$ N/мм² соответственно (таблица 9).

В ранние сроки токсического повреждения печени CCl₄ восстановительный рост ткани сопровождается увеличением числа синусоидальных клеток, в то время как в более отдаленные сроки их количество существенно снижается.

5.2 – Синусоидальные эндотелиальные клетки при коррекции токсического повреждения печени

Введение АФГ приводит к увеличению количества синусоидальных эндотелиальных клеток в печени на 3 сутки токсического воздействия, а на 7 и 14 сутки после коррекции данный показатель снижается относительно 3 суток, но остается выше, чем в группах без лечения (*таблица 9*). Следовательно, есть основание полагать, что направленное воздействие АФГ, позволяет регулировать количество синусоидальных клеток в ткани печени, продукцию регуляторных факторов данными клетками и компенсировать недостаточную скорость восстановительных процессов после токсического повреждения.

5.3 – Макрофаги в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

Содержание макрофагов в ткани печени экспериментальных животных оценивали по количеству F4/80⁺-клеток (*рисунок 8*). Согласно результатам иммуногистохимического окрашивания в норме количество макрофагов в ткани печени крыс составило $19,4 \pm 1,44$ N/мм².

При диффузном токсическом повреждении на 3 сутки в ткани печени отмечается увеличение числа макрофагов в среднем на 56,7 % (*таблица 10*) по сравнению с показателями интактной группы животных. На 7 и 14 сутки эксперимента их количество в печени резко снижается (*таблица 10*), что может быть связано с повышенной функциональной нагрузкой на данный тип клеток, направленной на нейтрализацию самого CCl₄ и токсичных продуктов воспалительной реакции.

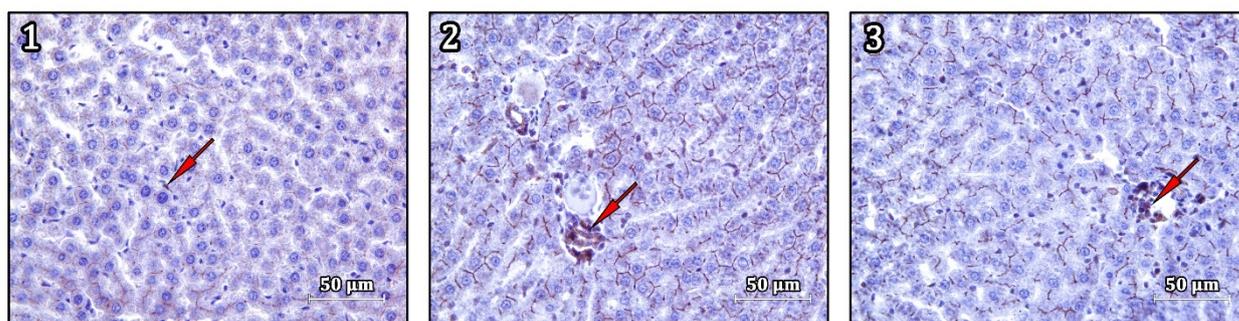


Рисунок 8 – Макрофаги в печени экспериментальных животных

Примечание: иммуногистохимическое окрашивание с применением антител к F4/80, увеличение $\times 400$; 1 – интактная группа, 2 – CCl_4 3 сутки, 3 – CCl_4 +АФГ, 3 сутки; красной стрелкой обозначены макрофаги.

Таблица 10 – Изменение количества макрофагов в печени при токсическом повреждении и его коррекции

Экспериментальная группа	Показатель
	Макрофаги печени (F4/80 ⁺ клетки), N/мм ²
Интактные	19,4±1,44
CCl_4 , 3 сутки	30,4±1,63 ^a
CCl_4 , 7 сутки	12,4±0,93 ^a
CCl_4 , 14 сутки	11,8±1,62 ^a
CCl_4 +АФГ, 3 сутки	60,4±3,30 ^{a, b}
CCl_4 +АФГ, 7 сутки	20,4±1,69 ^{c, c}
CCl_4 +АФГ, 14 сутки	25,6±1,29 ^{a, d, c}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; b – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl_4 3 сутки, c – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl_4 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl_4 14 сутки; e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl_4 +АФГ, 3 сутки.

5.4 – Макрофаги при коррекции токсического повреждения печени

При модуляции активности макрофагов в условиях токсического повреждения печени на 3 сутки отмечается достоверное увеличение количества F4/80⁺-клеток в 3 раза по сравнению с показателями интактной группы животных и приблизительно в 2 раза относительно показателей группы CCl_4 3 сутки

(таблица 10). В более отдаленные сроки эксперимента, применение АФГ также способствует поддержанию повышенного количества макрофагов в ткани печени.

5.5 – Тучные клетки в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

В воспалительном процессе при токсическом повреждении печени принимают участие, в том числе, и клеточные элементы соединительной ткани, в частности, тучные клетки [102]. Для определения тучных клеток в ткани печени экспериментальных животных проводили окрашивание толуидиновым синим [81] (рисунок 9).

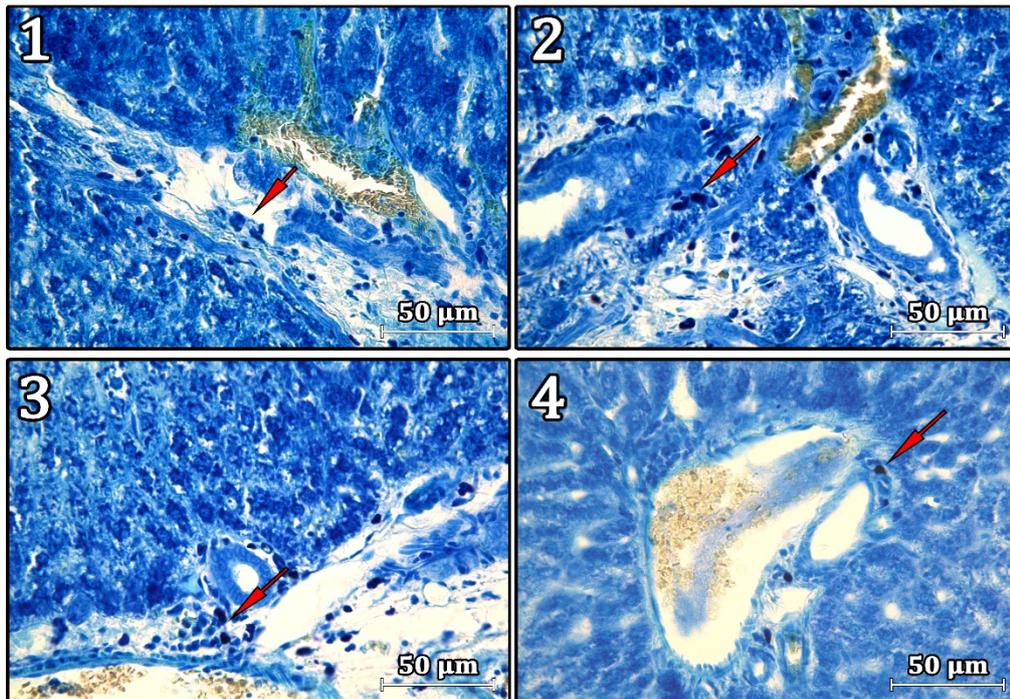


Рисунок 9 – Тучные клетки в печени крыс при токсическом воздействии CCl_4 и на фоне введения АФГ

Примечание: окраска толуидиновым синим, увеличение $\times 400$; 1 – CCl_4 , 3 сутки, 2 – CCl_4 +АФГ, 3 сутки, 3 – CCl_4 , 7 сутки, 4 – CCl_4 +АФГ, 7 сутки; красной стрелкой обозначены тучные клетки.

У интактных животных количество тучных клеток равно $40,42 \pm 6,77$ N/мм², а оптическая плотность их цитоплазмы составляет $0,83 \pm 0,02$ отн. ед. На 3 сутки после введения токсиканта отмечается достоверное увеличение количества

тучных клеток с $40,42 \pm 6,77$ N/мм² (интактная группа) до $94,73 \pm 15,06$ N/мм², а также уменьшение количества секреторных гранул в каждой отдельной клетке, о чем свидетельствует снижение оптической плотности с $0,83 \pm 0,02$ отн. ед. до $0,36 \pm 0,06$ отн. ед. (таблица 11) относительно показателей интактных животных.

Таблица 11 – Тучные клетки печени и оптическая плотность их секреторных гранул при токсическом воздействии и на фоне его коррекции

Экспериментальная группа	Показатель	
	Тучные клетки, N/мм ²	Оптическая плотность цитоплазмы тучной клетки, отн. ед.
Интактная	$40,42 \pm 6,77$	$0,83 \pm 0,02$
CCl ₄ , 3 сутки	$94,73 \pm 15,06$ ^a	$0,36 \pm 0,06$ ^a
CCl ₄ , 7 сутки	$219,76 \pm 35,95$ ^{a,b}	$0,39 \pm 0,07$ ^a
CCl ₄ , 14 сутки	$210,6 \pm 33,23$ ^{a,b}	$0,29 \pm 0,2$ ^a
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	$278,49 \pm 41,27$ ^{a,b}	$1,0 \pm 0,04$ ^{a,b,c,d}
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	$117,46 \pm 23,02$ ^{a,c,d,e}	$0,75 \pm 0,02$ ^{a,b,c,d,e}
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	$144,3 \pm 26,13$ ^{a,e}	$0,69 \pm 0,02$ ^{a,b,c,d,e,f}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 3 сутки; с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 7 сутки; d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 14 сутки; e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ 3 сутки; f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ 7 сутки.

Увеличение количества тучных клеток может быть обусловлено их миграцией в место повреждения. Активация тучных клеток, выражающаяся в виде их количественного увеличения и дегрануляции, при этом в крови отмечается повышение уровня билирубина и трансаминаз [102, 193].

На 7 и 14 сутки воздействия CCl₄ количество тучных клеток в ткани печени возрастает по сравнению с показателями на 3 сутки эксперимента до значений $219,76 \pm 35,95$ N/мм² и $210,6 \pm 33,23$ N/мм² соответственно (таблица 11). Резкое снижение содержания секреторных гранул в тучных клетках может свидетельствовать об усиленной дегрануляции, характеризующейся

высвобождением медиаторов, которые повышают проницаемость сосудов, усиливают ангиогенез и участвуют в воспалении.

Представленные данные позволяют заключить, что с увеличением срока токсического воздействия CCl_4 возрастает число тучных клеток в ткани печени, что вероятно связано с их миграцией в очаг повреждения. Снижение оптической плотности тучных клеток свидетельствует о процессах дегрануляции и возможном их участии в воспалительной реакции и процессах фиброгенеза за счет высвобождаемых медиаторов и цитокинов.

5.6 – Тучные клетки при коррекции токсического повреждения печени тетрахлорметаном

Применение АФГ при токсическом воздействии CCl_4 на 3 сутки приводит к увеличению числа тучных клеток и резкому увеличению оптической плотности секреторных гранул в них (*таблица 11*). В более поздние сроки исследования, на 7 и 14 сутки токсического воздействия при введении АФГ, количество тучных клеток в ткани печени снижается, но остается выше показателей интактной группы (*таблица 11*). Оптическая плотность секреторных гранул в тучных клетках остается повышенной по сравнению с группами без лечения и снижается по отношению к показателям интактных животных.

На основании полученных данных можно заключить, что введение АФГ при воздействии CCl_4 на организм, на поздних сроках эксперимента, приводит к уменьшению количества тучных клеток в ткани печени, задерживает их дегрануляцию, тем самым препятствует высвобождению медиаторов воспаления [81].

5.7 – CD 45⁺- и CD 3⁺-лейкоциты в норме и при токсическом повреждении печени тетрахлорметаном

Популяция печеночных лейкоцитов обеспечивает защиту против негативно действующих патогенов, модулируя функцию печени и способствуя притоку в нее циркулирующих лимфоцитов [239]. Лимфоциты могут контактировать непосредственно с гепатоцитами, поскольку синусоидальный эндотелий фенестрирован, и в нем отсутствует базальная мембрана [17]. Это строение печени облегчает прямой или опосредованный прайминг лимфоцитов, формирует иммунный ответ на гепатотропные агенты.

При иммуногистохимическом исследовании ткани печени на выявление клеток, несущих на поверхности мембраны общий лейкоцитарный антиген установлено, что токсическое действие CCl₄ на 3 сутки приводит к резкому увеличению количества лейкоцитов CD45⁺ в паренхиме органа и еще в большей степени в периваскулярных областях (*таблица 12*). В более поздние сроки токсического воздействия, на 7 и 14 сутки, инфильтрация печени CD45⁺-клетками снижается относительно показателей группы CCl₄ 3 сутки примерно на 60 % в паренхиме и на 80 % вокруг кровеносных сосудов, но остается существенно выше показателей интактных животных (*таблица 12*).

Для оценки вклада Т-лимфоцитов в иммунный ответ при интоксикации CCl₄ был произведен подсчет CD3⁺ клеток ткани печени экспериментальных животных. На 3 сутки действия токсиканта количество CD3⁺ клеток возрастает (*таблица 12*) по сравнению с показателями интактной группы как в паренхиме печени, так и периваскулярно больше, чем на 90 %. К 7 суткам токсического воздействия выявлено уменьшение числа CD3⁺ периваскулярно и в паренхиме органа (*таблица 12*). При этом на 14 сутки количество CD3⁺ остается повышенным (*таблица 12*) относительно предыдущего срока исследования.

Количественная оценка CD45⁺ и CD3⁺ клеток показала, что при интоксикации CCl₄, в ранние сроки, возрастает лимфо-лейкоцитарная

инфильтрация паренхимы печени и периваскулярных областей. Данные изменения свидетельствуют об активном ответе клеточного звена иммунитета на действие токсиканта и интенсивности воспалительного процесса в поврежденном органе.

Таблица 12 – CD 45⁺- и CD 3⁺-клетки при токсическом повреждении печени и его коррекции

Группа	Показатель			
	CD45 ⁺ -клетки в паренхиме печени, N/мм ²	CD45 ⁺ -клетки локализованные периваскулярно, N/мм ²	CD3 ⁺ -клетки в паренхиме печени, N/мм ²	CD3 ⁺ локализованные периваскулярно, N/мм ²
Интактные	13,9±1,4	17,8 ±2,3	0,8±0,2	0,9±0,3
ССl ₄ , 3 сутки	187,9±8,6 а	367,6±16,4 а	12,0±0,4 а	28,7±0,6 а
ССl ₄ , 7 сутки	71,9±6,2 а,б	73,4±5,2 а,б	0,5 ±0,01 б	0,4±0,01 б
ССl ₄ , 14 сутки	60,45±12,95 а,б	68,25±13,45 а,б	5,85±0,06 а,б,с	7,8±0,12 а,б,с
ССl ₄ +АФГ, 3 сутки	123,8±6,1 а,б,с,д	153,4±8,5 а,б,с,д	10,2±0,3 а,б,с,д	25,9±0,3 а,б,с,д
ССl ₄ +АФГ, 7 сутки	14,4±1,6 б,с,д,е	28,01±4,1 а,б,с,д,е	2,5±0,4 а,б,с,д,е	2,4±0,4 а,б,с,д,е
ССl ₄ +АФГ, 14 сутки	15,6 ±5,8 б,с,д,е	22,1±6,71 б,с,д,е	2,6±0,82 а,б,с,д,е	5,2±0,53 а,б,с,д,е,ф

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных; б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ССl₄, 3 сутки; с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ССl₄, 7 сутки; д – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ССl₄, 14 сутки; е – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ССl₄+АФГ, 3 сутки; ф – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой ССl₄+АФГ, 7 сутки.

5.8 – CD 45⁺ - и CD 3⁺-лейкоциты при коррекции токсического повреждения печени

При оценке степени лимфо-лейкоцитарной инфильтрации печени установлено, что применение АФГ на фоне токсического повреждения СС1₄ приводит к уменьшению выраженности воспалительного процесса, что выражается в виде снижения количества CD45⁺ клеток в паренхиме органа и периваскулярных областях (*таблица 12*) во все сроки эксперимента по сравнению с аналогичными сроками без коррекции. На 3 сутки модуляция активности макрофагов АФГ (в/м 2 мг/кг) приводит к снижению лейкоцитарной инфильтрации паренхимы печени на 34,1 %, тогда как периваскулярно – на 58,3 %. Через неделю после инъекций АФГ количество CD45⁺ существенно уменьшается как в паренхиме печени, так и периваскулярно на 80 % и 61,8 % соответственно. К 14 суткам количество лейкоцитов становится близким к показателям физиологической нормы.

Количество CD3⁺ клеток в ткани печени на 3 сутки после инъекций АФГ достоверно уменьшается по сравнению с соответствующим сроком СС1₄-интоксикации (*таблица 12*), при этом данная тенденция сохраняется и на 14 сутки применения иммуномодулятора.

Применение АФГ, при токсическом воздействии СС1₄ на организм, снижает степень инфильтрации ткани печени лимфоидными элементами и тем самым уменьшает степень выраженности воспалительной реакции.

Резюме

Установлено, что в ранние сроки токсического повреждения печени СС1₄ восстановительный рост ткани сопровождается увеличением числа макрофагов и синусоидальных эндотелиальных клеток. В более отдаленные сроки воздействия токсиканта их количество в печени резко снижается, что может быть

связано с повышенной функциональной нагрузкой на данные типы непаренхиматозных клеток, направленной на нейтрализацию самого CCl_4 и токсических продуктов воспалительной реакции.

При воздействии гепатотропного яда зафиксировано увеличение числа тучных клеток и снижении их оптической плотности, свидетельствующей о высвобождении содержимого во внеклеточное пространство. Вероятно, за счет секреции гистамина и триптазы тучные клетки стимулируют пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. Данное заключение подтверждается тем, что с увеличением срока воздействия CCl_4 в печени возрастает как количество тучных клеток, так и площадь, занимаемая коллагеном.

Количественная оценка CD45^+ - и CD3^+ -клеток показала, что при интоксикации CCl_4 , в ранние сроки, возрастает лимфо-лейкоцитарная инфильтрация паренхимы печени и периваскулярных областей. Данные изменения свидетельствуют об активном ответе клеток иммунной системы на действие токсиканта и позволяют судить об интенсивности воспалительного процесса в поврежденном органе.

Коррекция диффузного токсического повреждения печени с помощью АФГ, позволяет поддерживать количество макрофагов и синусоидальных клеток в ткани печени на высоком уровне даже в отдаленные сроки после введения токсиканта.

Применение АФГ при токсическом повреждении печени способствует снижению лейкоцитарной инфильтрации, происходит резкое уменьшение уровня CD45^+ -клеток до значений интактных животных на 7, 14 сутки эксперимента, снижается количество CD3^+ лимфоцитов. Также на поздних сроках эксперимента зафиксировано уменьшение количества тучных клеток в ткани печени и повышение оптической плотности цитоплазмы данных клеток. Вероятно, АФГ задерживает дегрануляцию тучных клеток и тем самым препятствует избыточному высвобождению медиаторов воспаления.

Список статей, опубликованных по материалам главы 5

1. **Шафигуллина, З.А.** Роль клеточного компонента стромы в компенсаторных процессах при диффузном повреждении печени / **З.А. Шафигуллина**, С.Ю. Медведева, И.Г. Данилова // Токсикологический вестник. – 2018. – №3. – С. 32–37.

2. Иммуномодулирующее влияние аминофталгидразида на клетки печени при диффузном токсическом повреждении / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, И.Ф. Гетте, В.Г. Сенцов, М.Т. Абидов // Токсикологический вестник. – 2019. – № 5 (158). – С. 39–44.

3. Синусоидальные клетки и цитокиновый ответ при тетрахлорметан-индуцированной гепатотоксичности и способ ее коррекции / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева, В.А. Черешнев, М.Т. Абидов // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 929–936.

4. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, **Z.A. Shafigullina**, I.F. Gette, V.G. Sencov, S.Yu. Medvedeva, M.T. Abidov // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80. – 106124. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.

5. Иммунопатофизиологические аспекты действия тетрахлорметана / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, В.Г. Сенцов // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2020 – Т. 21. – С. 570–578.

ГЛАВА 6 – ЦИТОКИНОВАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПЕЧЕНИ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ И ЕГО КОРРЕКЦИИ

Цитокины – биологически активные вещества пептидной природы, которые способны участвовать в регуляции развития воспалительной реакции печеночной ткани, апоптоза и некроза клеток печени, развитии холестаза и фиброза, а также могут являться медиаторами регенерации поврежденной ткани [9]. В рамках данного исследования была проведена оценка концентрации основных цитокинов, продуцируемых макрофагами: IL-1 α , IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 и SCF.

6.1 – Цитокиновый профиль плазмы крови экспериментальных животных в норме и при токсическом повреждении

При экспериментальном токсическом повреждении печени CCl₄ на 3 сутки отмечается резкое увеличение плазменной концентрации TNF- α до 922,16 \pm 192,20 пг/мл по сравнению с показателем интактной группы (16,14 \pm 3,09 пг/мл) (*таблица 13*). На 7 сутки токсического воздействия уровень TNF- α снижается как относительно показателей интактной группы, так и относительно группы CCl₄ 3 сутки. К 14 суткам после введения токсиканта отмечается подъем уровня TNF- α , который является менее выраженным по сравнению с показателями группы CCl₄ 3 сутки.

При оценке концентрации IL-6 в плазме крови после воздействия токсиканта во все сроки эксперимента достоверных различий с показателями интактной группы не выявлено (*таблица 13*). Воздействие CCl₄ не оказывает влияния на концентрацию IL-18 в плазме крови (*таблица 13*). Токсическое действие гепатотропного яда вызывает резкое снижение концентрации

противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в плазме крови на 7 и 14 сутки (таблица 13) по сравнению с интактной группой и группой СС1₄ 3 сутки.

Таблица 13 – Содержание цитокинов в плазме крови экспериментальных животных

Группа	Показатель			
	TNF-α, пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ИЛ-10, пг/мл	ИЛ-18, пг/мл
Интактная (а)	16,14±3,09	39,06±7,69	3542,03±1477,07	5,97±1,72
СС1 ₄ , 3 сутки (b)	922,16±192,20 a	53,35±18,28	4757,9±1215,78	6,72±0,31
СС1 ₄ , 7 сутки (c)	3,6±1,13 a,b,e	48,92±8,98	77,51±11,86 a,b,e	8,25±0,71 e
СС1 ₄ , 14 сутки (d)	33,52±5,93 a,b,c,e	43,26±3,63 f	134,15±42,49 a,b,e,f	6,48±0,51 e
СС1 ₄ +АФГ, 3 сутки (e)	240,5±25,89 a,b	36,34±2,04	2194,02±356,87	4,25±0,33 b
СС1 ₄ +АФГ, 7 сутки (f)	32,03 ±11,40 b,e	126,46±6,88 a,b,c,e	812,43±109,98 a,b,c,e	8,95±2,06
СС1 ₄ +АФГ, 14 сутки	1,44±0,33 a,b,d,e,f	272,82±5,71 a,b,c,d,e,f	123,3±39,20 a,b,e,f	3,68±0,71 b,c,d

Примечание: а, b, с, d, e, f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой (а), (b), (c), (d), (e), (f) соответственно.

Установлено, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени на системном уровне, в плазме крови, отмечается увеличение содержания провоспалительного цитокина TNF-α и подавление выработки ИЛ-10, при этом концентрация провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-18 остается неизменной.

6.2 – Цитокиновый профиль плазмы крови экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения

Применение АФГ при токсическом повреждении печени приводит к плавному снижению концентрации TNF- α и достигает минимального значения на 14 сутки (*таблица 13*). На 3 сутки после инъекций АФГ изменений в концентрации IL-6 в плазме крови не выявлено, однако в более поздние сроки исследования отмечается увеличение уровня IL-6 в крови по сравнению с показателями групп CCl₄ 7 сутки и 14 сутки (*таблица 13*).

На фоне коррекции токсического повреждения печени на 3 и 14 сутки заметно снижается концентрация IL-18 до значений $4,25 \pm 0,33$ пг/мл и $3,68 \pm 0,71$ пг/мл соответственно (*таблица 11*). На 7 сутки зафиксировано снижение концентрации IL-10 (*таблица 13*).

6.3 – Цитокиновый профиль печени экспериментальных животных в норме и при токсическом повреждении

На локальном уровне, в ткани печени, степень вовлеченности цитокинов в регуляторный ответ изменяется в зависимости от срока токсического воздействия. Повышенная концентрация IFN- γ и IL-6 на 3 сутки (*таблица 14*), по сравнению с другими провоспалительными цитокинами, вероятно способствует миграции лейкоцитов в очаг повреждения. В то время как снижение локальной концентрации данных цитокинов в более отдаленные сроки эксперимента сдерживает избыточную инфильтрацию поврежденной ткани лимфоидными элементами. Высокая концентрация IL-18 на 7 сутки CCl₄-интоксикации усиливает провоспалительный иммунный ответ, повышая выработку TNF- α и IL-1 α (*таблица 14*). Увеличение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 к 14 суткам эксперимента сопровождается снижением IL-6 и препятствует избыточной секреции TNF- α (*таблица 14*) [199].

Таблица 14 – Концентрация цитокинов в ткани печени экспериментальных животных

Группа	Показатель						
	TNF- α , пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-10, пг/мл	IL-18, пг/мл	IL-1 α , пг/мл	IFN- γ , пг/мл	TGF- β 1, пг/мл
Интактная (а)	694,19 \pm 188,79	30,52 \pm 3,58	182,86 \pm 44,61	543,27 \pm 18,22	941,5 \pm 98,16	931,25 \pm 86,34	817,18 \pm 220,79
CCl ₄ , 3 сутки (b)	1090,42 \pm 72,36	44,9 \pm 3,23 a	419,43 \pm 131,03	593,74 \pm 28,51	1146,97 \pm 213,15	1199,88 \pm 81,09	223,62 \pm 20,16 a
CCl ₄ , 7 сутки (c)	1154,13 \pm 138,92	36,5 \pm 13,93	509,71 \pm 83,05 a,e	779,36 \pm 58,85 a,e	1272,63 \pm 39,25 a	857,89 \pm 48,17 b	239,11 \pm 26,62 a
CCl ₄ , 14 сутки (d)	1283,17 \pm 97,96 a	12,22 \pm 1,22 a,b,e,f	460,57 \pm 95,7 a,e	601,48 \pm 19,58	1409,63 \pm 110,91 a,e	674,66 \pm 62,75 b	623,39 \pm 137,51 b,c
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки (e)	1193,46 \pm 158,77	29,51 \pm 1,9 b	90,84 \pm 0,01 a	522,08 \pm 24,10	944,3 \pm 100,91	831,88 \pm 80,12 b	558,14 \pm 203,5 b
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки (f)	1484,7 \pm 260,47	77,8 \pm 2,93 a,b,e	274,57 \pm 34,14 e	735,53 \pm 41,54 a,e	1622,83 \pm 120,66 a,c,e	675,05 \pm 17,55 a,b,c	401,92 \pm 35,02 b,c
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	1157,38 \pm 70,73	8,03 \pm 0,77 a,b,c,e,f	428,29 \pm 18,56 a,e	575,86 \pm 44,22 c,f	1401,63 \pm 110,02 a,e	666,12 \pm 34,53 a,b,c	1167,19 \pm 437,77 b,c

Примечание: CCl₄ – тетрахлорметан, АФГ – аминофталгидразид, TNF- α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли альфа, IL – интерлейкин, IFN- γ (interferon gamma) – интерферон гамма, TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1) – трансформирующий фактор роста; a, b, c, d, e, f – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой (a), (b), (c), (d), (e), (f) соответственно.

6.4 – Цитокиновый профиль печени экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения

Воздействие АФГ приводит к росту концентрации IL-1 α , TGF- β 1 и снижению уровня IL-6, IFN- γ в ткани печени (*таблица 14*). Защитная роль плеiotропного цитокина IL-6 в регенерации печени хорошо документирована: регенерация печени была нарушена у мышей, нокаутированных по IL-6, в то время как замедленная регенерация печени была связана с избыточной экспрессией IL-6. После нокаута IL-6 острая печеночная недостаточность была отмечена у 70% мышей. Кроме того, IL-6 индуцирует значительное увеличение количества непаренхиматозных клеток, которые продуцируют фактор роста гепатоцитов, и, кроме того, способствует пролиферации клеток печени через сигнальный преобразователь и активатор сигнального пути транскрипции 3 (STAT3) [211].

6.5 – Концентрация фактора стволовой клетки в крови в норме и при токсическом повреждении

Фактор стволовой клетки (SCF) – трансмембранный белок, который ферментативно отщепляется от поверхности клетки во время травмы или воспаления и играет важную роль в восстановлении печени после токсического повреждения [212]. Установлено, что печень в норме содержит значительное количество как мембрансвязанного, так и растворимого SCF. Наряду с гепатоцитами к синтезу SCF в печени способны эндотелиоциты и макрофаги печени [96, 182]. Оценка концентрации SCF является одним из важнейших показателей, позволяющих судить о привлечении стволовых клеток к регенерирующему органу.

В плазме крови интактных крыс методом иммуноферментного анализа был определен уровень фактора стволовой клетки, который составил $95,17 \pm 6,30$ пг/мл (*таблица 15*).

В ответ на повреждение печени отмечается увеличение содержания данного ростового фактора в крови на 62,48 % уже на 3 сутки после воздействия (*таблица 15*).

Таблица 15 – Концентрация SCF в крови у экспериментальных животных

Экспериментальная группа	Показатель
	SCF в крови, пг/мл
Интактная	$95,17 \pm 6,30$
CCl ₄ , 3 сутки	$154,63 \pm 9,90^a$
CCl ₄ , 7 сутки	$132,33 \pm 2,93^{a, b}$
CCl ₄ , 14 сутки	$105,77 \pm 3,92^{b, c}$
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	$147,66 \pm 10,78^a$
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	$109,36 \pm 27,72$
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	$113,08 \pm 9,87^{b, d}$

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных, б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 3 сутки, с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 7 сутки, d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ 3 сутки.

На 7 и 14 сутки после введения CCl₄, вызывающего токсическое повреждение печени, повышенный уровень фактора стволовой клетки в плазме крови сохраняется и составляет $132,33 \pm 2,93$ пг/мл и $105,77 \pm 3,92$ пг/мл, что в 1,39 и 1,11 раза выше значения интактных животных (*таблица 15*).

Таким образом, диффузное повреждение печени сопровождается выбросом фактора стволовой клетки в кровь предположительно в результате повышенного синтеза данного ростового фактора гепатоцитами и печеночными макрофагами, что необходимо для привлечения стволовых клеток из костного мозга к регенерирующему органу. Высокий уровень ростового фактора сохраняется и на отдаленные сроки после воздействия.

6.6 – Концентрация фактора стволовой клетки в крови при коррекции токсического повреждения

Установлено, что на 3 сутки после воздействия уровень фактора стволовой клетки в сыворотке крови повышен и составляет $147,66 \pm 10,78$ пг/мл (таблица 15). Причем введение АФГ, по всей видимости, не оказывает влияния на данный показатель, так как повышение уровня фактора стволовой клетки такое же, как и при диффузном повреждении печени без введения препарата.

Через 7 и 14 суток после токсического повреждения при введении АФГ наблюдается снижение уровня фактора стволовой клетки до значений близких к интактным животным (показатель составил $109,36 \pm 27,72$ пг/мл и $113,08 \pm 9,87$ пг/мл соответственно) (таблица 15).

Стимуляция функциональной активности макрофагов АФГ приводит к наиболее быстрой нормализации концентрации фактора стволовой клетки в крови, чем у животных без введения препарата.

6.7 – Концентрация фактора стволовой клетки в печени при коррекции токсического повреждения

Путем иммуноферментного анализа в гомогенатах печени крыс с экспериментальным токсическим гепатитом была произведена оценка локальной концентрации фактора стволовой клетки. Установлено, что у интактных животных концентрация SCF в ткани печени 6,5 раза выше, чем в плазме крови и составляет $616,35 \pm 10,62$ пг/мл (таблица 16).

На 3 и 7 сутки воздействия гепатотропного яда уровень SCF достоверно не отличается от показателей здоровых животных.

На основании полученных результатов можно заключить, что у здоровых животных концентрация фактора стволовой клетки в ткани печени существенно

выше, чем в плазме крови. Токсическое повреждение печени гепатотропным ядом не приводит к изменению локальной концентрации ростового фактора.

Таблица 16 – Локальная концентрация фактора стволовой клетки у интактных крыс и при токсическом повреждении печени

Экспериментальная группа	Показатель
	SCF в печени, пг/мл
Интактная	616,35±10,62
CCl ₄ , 3 сутки	607,37±11,74
CCl ₄ , 7 сутки	624,94±13,93
CCl ₄ , 14 сутки	672,01±38,93
CCl ₄ +АФГ, 3 сутки	636,32±14,04
CCl ₄ +АФГ, 7 сутки	623,99±10,87
CCl ₄ +АФГ, 14 сутки	719,52±15,78 ^{a, c, b, d, e}

Примечание: а – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой интактных животных, б – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄ 3, сутки, с – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 7 сутки, d – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄, 14 сутки, e – статистически значимые различия ($p < 0,05$) с группой CCl₄+АФГ, 3 сутки.

6.8 – Концентрация фактора стволовой клетки в печени при коррекции токсического повреждения

На фоне применения АФГ на 3 и 7 сутки у крыс, подвергавшихся интоксикации CCl₄, отмечается тенденция к увеличению локальной концентрации SCF. Через 2 недели после инъекций иммуномодулятора уровень данного ростового фактора увеличивался на 7% (таблица 16) по сравнению с группой CCl₄ 14 сутки.

Таким образом, применение АФГ на фоне интоксикации CCl₄ способствует повышению локального уровня SCF.

Резюме

Согласно результатам иммуноферментного анализа установлено, что в ткани печени иммунный ответ обусловлен увеличением концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-18, TNF- α , тогда как в плазме крови отмечается повышенная продукция TNF- α . Снижение концентрации IL-10 на системном уровне компенсируется повышением продукции данного цитокина в ткани печени.

Установлено, что токсическое повреждение не оказывает влияния на локальную концентрацию фактора стволовой клетки (SCF), но приводит к существенному увеличению уровня данного медиатора в ткани печени, что может служить одним из стимулов для привлечения стволовых клеток к регенерирующему органу.

Применение метода коррекции, основанного на стимуляции активности макрофагов способствует снижению концентрации провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-18 в плазме крови и IL-6, IFN- γ в ткани печени. АФГ способствует нормализации системного уровня SCF и повышению его локальной концентрации.

Список статей, опубликованных по материалам главы 6

1. Синусоидальные клетки и цитокиновый ответ при тетрахлорметан-индуцированной гепатотоксичности и способ ее коррекции / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, С.Ю. Медведева, В.А. Черешнев, М.Т. Абидов // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 5. – С. 929–936.
2. Accelerated liver recovery after acute CCl₄ poisoning in rats treated with sodium phthalhydrazide / I.G. Danilova, **Z.A. Shafigullina**, I.F. Gette, V.G. Sencov, S.Yu. Medvedeva, M.T. Abidov // International Immunopharmacology. – 2020. – Vol. 80. – 106124. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106124.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Заболевания печени являются серьезной медицинской проблемой во всем мире. Токсическое повреждение, включая злоупотребление алкоголем, вирусные инфекции и нарушения обмена веществ в печени являются основной причиной развития цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы и других патологий, связанных с высокой смертностью [246]. В связи с этим изучение репаративных процессов печени при токсическом повреждении и разработка новых способов их стимуляции является актуальной задачей.

Одной из классических экспериментальных моделей для изучения механизмов регенерации печени является токсическое повреждение, вызванное введением гепатотропного яда тетрахлорметана (CCl_4). Воздействие данного токсиканта носит диффузный характер, вовлекая в патологический процесс не только паренхиму органа, но и непаренхиматозный компонент [18]. С этой точки зрения токсическое повреждение CCl_4 можно считать лучшей репрезентативной моделью для изучения стромально-паренхиматозных взаимодействий и их роли в регенерации. Немаловажным аспектом при выборе модели является тот факт, что при CCl_4 -индуцированном токсическом гепатите удается получить биохимические изменения и морфологические характеристики, которые близки к острым поражениям печени различной этиологии у человека [189].

В данной работе в условиях *in vivo* была создана экспериментальная модель диффузного токсического повреждения печени путем однократной внутрибрюшинной инъекции масляного раствора CCl_4 в дозе 50 мг/100 г массы тела, что составляет 68,6 % от LD50 (72,9 мг/100 г). Выбранный подход является оптимальным и позволяет существенно снизить смертность экспериментальных животных [66].

Детальное изучение регенераторных процессов в печени на ранних сроках после введения токсиканта выполнено с применением современных высокотехнологичных методов исследования, включая биохимический,

гематологический, иммуногистохимический, иммуноферментный анализ и конфокальную микроскопию. Оценка показателей клеточной и внутриклеточной регенерации гепатоцитов, степени апоптоза и фиброза, количественного изменения макрофагов (F4/80⁺), синусоидальных эндотелиальных клеток, CD45⁺ и CD3⁺ лимфоцитов, тучных клеток в ткани печени, а также продукции белков теплового шока (HSP60, HSP70), концентрации основных про- и противовоспалительных цитокинов позволяет наиболее полно охарактеризовать основные локальные механизмы восстановительных процессов в печени в условиях токсического повреждения и при его коррекции.

Установлено, что уже после однократного внутрибрюшинного введения CCl₄ в печени экспериментальных животных развиваются структурные изменения характерные для острого токсического гепатита. По мере увеличения срока токсического воздействия деструктивные изменения нарастают и проявляются в виде очаговых некрозов, наличия клеток с признаками крупнокапельной вакуольной дистрофии, нарушениями микроциркуляторного русла и лимфо-лейкоцитарной инфильтрации, развивается острая воспалительная реакция. Воздействие гепатотропного яда приводит к увеличению индекса альтерации и апоптозу клеток паренхимы, что подтверждается ростом числа TUNEL⁺-гепатоцитов. В отдаленные сроки эксперимента отмечается увеличение площади коллагена в ткани печени, что свидетельствует о процессах фиброгенеза. Кроме того, структурные изменения печени при токсическом повреждении подтверждаются дисбалансом биохимических показателей, что выражается в развитии цитолиза, внутреннего холестаза, умеренном снижении синтетической функции печени.

Оценка показателей регенерации гепатоцитов подтверждает тот факт, что в условиях воздействия повреждающего стимула, кроме свойственной для печени внутриклеточной регенерации [22], происходит активация компенсаторно-приспособительных процессов, которые включают пролиферацию гепатоцитов, дифференцировку и миграцию, а также реорганизацию стромального компонента [16]. На 3 сутки после введения токсиканта усиливается клеточная и

внутриклеточная регенерация, что подтверждается увеличением митотического индекса, количества двуядерных и пролиферирующих Ki-67⁺гепатоцитов. Данная стратегия способствует увеличению пула гепатоцитов и повышению их метаболической активности, выражающейся в увеличении количества HSP70⁺ гепатоцитов. Повышенная продукция белков теплового шока массой 70 кДа (HSP70) на ранних стадиях токсического повреждения вероятно защищает клетку от воздействия токсиканта и продуктов метаболизма, а также препятствует переходу начальных реакций апоптоза в необратимую стадию. Согласно литературным данным, HSP70 участвуют в начальных этапах восстановления нативной конформации белков и могут стимулировать механизмы врожденного иммунитета, способствуя экспрессии TNF- α и IL-6, а также передаче сигналов транскрипционного фактора NF- κ B, которые являются биологически важными компонентами ранней регенерации печени [109].

На более поздних сроках диффузного токсического повреждения печени преобладает внутриклеточный тип регенерации, что связано с необходимостью восстановления функциональных показателей. Решающая роль в поддержании регенераторного потенциала клеток паренхимы печени на 7 сутки после воздействия CCl₄ принадлежит HSP60 и выражается в увеличении количества гепатоцитов с содержанием гранул данного белка. HSP60 завершает процесс фолдинга белковых молекул [15] и выступает в качестве фактора, сдерживающего избыточный апоптоз [75], в то время как уменьшение количества HSP60⁺-клеток сопровождается увеличением апоптотической гибели.

Одним из механизмов, направленных на регенерацию печени в условиях токсического повреждения, является реакция клеточного компонента стромы. Так при действии гепатотропного яда зафиксировано увеличение числа тучных клеток и снижении оптической плотности их цитоплазмы, свидетельствующей о высвобождении содержимого во внеклеточное пространство. Известно, что за счет секреции гистамина и триптазы тучные клетки стимулируют пролиферацию фибробластов и синтез коллагена [2, 118]. Это заключение подтверждается тем,

что с увеличением срока воздействия токсиканта в печени возрастает как количество тучных клеток, так и площадь, занимаемая коллагеном.

Важная роль в регуляции регенераторных процессов печени принадлежит иммунокомпетентным клеткам. Количественная оценка CD45⁺ и CD3⁺ клеток показала, что при интоксикации CCl₄, в ранние сроки, возрастает лимфолейкоцитарная инфильтрация паренхимы печени и периваскулярных областей. Выявленные изменения свидетельствуют об активном ответе клеток иммунной системы на действие токсиканта и позволяют судить об интенсивности воспалительного процесса в поврежденном органе. Увеличение количества CD3⁺ клеток (Т-лимфоцитов) на ранних этапах после воздействия токсиканта подтверждает их морфогенетическую функцию [36].

В ранние сроки токсического повреждения печени восстановительный рост ткани сопровождается увеличением числа макрофагов и синусоидальных эндотелиальных клеток. На 7 и 14 сутки после введения CCl₄, их количество в печени резко снижается, что может быть связано с повышенной функциональной нагрузкой на данные типы непаренхиматозных клеток печени, направленной на нейтрализацию CCl₄ и токсических продуктов воспалительной реакции.

Макрофагальная и лимфоцитарная инфильтрация ткани печени при воздействии CCl₄ приводит к изменению продукции цитокинов как на локальном, так и на системном уровне, что в конечном итоге определяет исход патологического процесса. Известно, что на первых этапах в ответ на повреждение повышается экспрессия про- и противовоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6, IL-1, IL-10), которые регулируют вступление гепатоцитов в митотический цикл, а после увеличивается экспрессия факторов роста (HGF, SCF, TGF- β и др.) [100, 169]. В соответствии с литературными данными TNF- α и IL-6, синтезируемые макрофагами печени, образуют регуляторную систему, стимулирующую в гепатоцитах экспрессию «генов раннего ответа», что приводит к вступлению клетки в митотический цикл [99, 100]. Кроме того, имеются сообщения о том, что IL-6 индуцирует синтез фактора роста гепатоцитов (HGF), который, помимо стимуляции пролиферации эпителиальных

клеток, подавления апоптоза, наряду с IL-10 оказывает противовоспалительный эффект [93].

Согласно результатам собственного исследования острофазный воспалительный ответ на 3 сутки после CCl₄-интоксикации на системном уровне выражается в увеличении содержания лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в периферической крови, а также резким повышением концентрации TNF- α . На локальном уровне, в ткани печени, степень вовлеченности цитокинов в регуляторный ответ изменяется в зависимости от срока токсического воздействия. Повышенная концентрация IFN- γ и IL-6 на 3 сутки, по сравнению с другими провоспалительными цитокинами, вероятно способствует миграции лейкоцитов в очаг повреждения. В то время как снижение локальной концентрации данных цитокинов в более отдаленные сроки эксперимента сдерживает избыточную инфильтрацию поврежденной ткани лимфоидными элементами. К 7 суткам эксперимента зафиксировано увеличение уровня IL-18, который экспрессируется в основном макрофагами и как известно, может стимулировать продукцию IL-1 и TNF- α [44]. Экспоненциальный рост концентрации противовоспалительного цитокина IL-10 достигает максимума к 14 суткам, тем самым компенсируя низкий уровень данного цитокина на системном уровне.

Выброс фактора стволовой клетки (SCF) в кровь при токсическом повреждении, предположительно в результате повышенной экспрессии данного цитокина гепатоцитами и печеночными макрофагами, можно рассматривать как один из механизмов направленных на привлечение стволовых клеток из костного мозга к регенерирующему органу.

Описанные выше процессы, отражающие особенность локальных механизмов регенерации печени на ранних сроках диффузного токсического повреждения, представлены на заключительной схеме (*рисунок 10*).

Ключевой клеточной популяцией, регулирующей регенераторные процессы в печени, являются макрофаги. Это обусловлено особенностями их локализации в органе, высокой метаболической активностью, а также способностью продуцировать широкий спектр цитокинов.

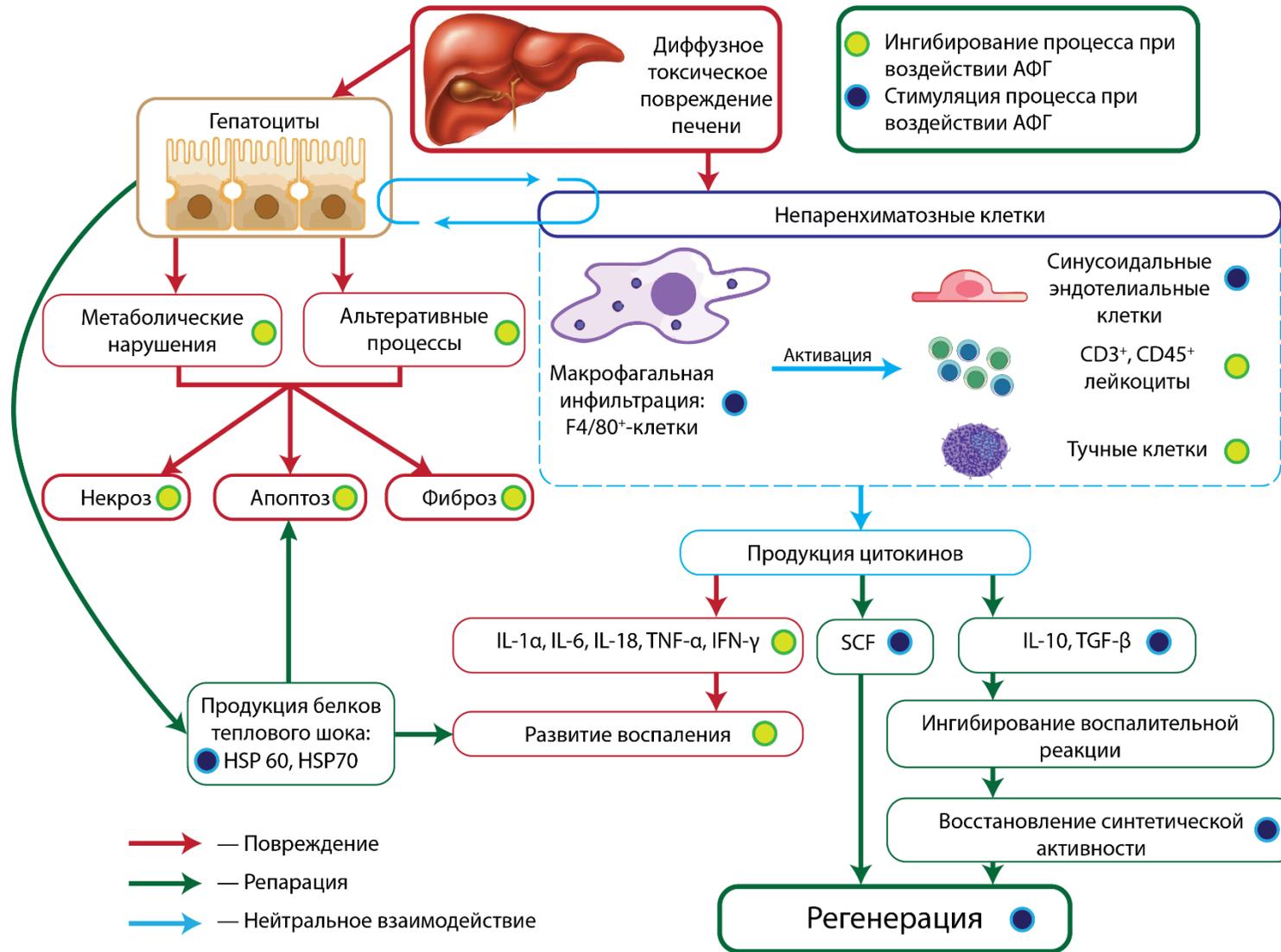


Рисунок 10 – Некоторые аспекты регенерации печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекции АФГ

Присущая макрофагам функциональная пластичность позволяет им в отличие от других непаренхиматозных клеток печени участвовать как в регуляции гомеостаза, так и в процессах воспаления и регенерации [181, 195]. Признание роли макрофагов в регенерации и их вовлеченность в регуляторные процессы при токсическом повреждении печени, позволяет рассматривать данные клетки в качестве перспективной мишени для новых терапевтических подходов в гепатологии. В качестве инструмента воздействия на макрофаги *in vivo* был выбран АФГ, описанный в литературе как модулятор активности макрофагов, обладающий противовоспалительной и антиоксидантной активностью [136, 166]. В исследовании на культурах макрофагов было показано, что это вещество способно воздействовать на данный тип клеток, изменяя их морфологию, ядерно-цитоплазматическое соотношение, пролиферативную активность и цитокиновую продукцию [21].

На фоне модуляции активности макрофагов в условиях токсического повреждения печени отмечается увеличение их количества на 3 сутки, также возрастает число синусоидальных эндотелиальных клеток, что сопровождается ростом показателей клеточной и внутриклеточной регенерации. В более отдаленные сроки эксперимента воздействие на макрофаги приводит к повышению метаболической активности клеток паренхимы (возрастает количество HSP60⁺-гепатоцитов), уменьшению выраженности деструктивных изменений паренхимы, что проявляется в снижении индекса альтерации и апоптоза гепатоцитов (*рисунок 10*).

Воздействие на макрофаги при токсическом повреждении печени оказывает мембраностабилизирующее действие на гепатоциты, уменьшая выраженность цитолиза, холестаза и нормализует белоксинтетическую функцию печени (*рисунок 10*). На ранних этапах резко повышается регенераторный потенциал клеток паренхимы, в более поздние сроки уменьшается количество и секреторная активность тучных клеток, CD3⁺ и CD 45⁺ клеток, снижается концентрация провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-18 в крови и IL-6, IFN- γ в ткани печени, нормализуется системный уровень SCF, повышается его локальная концентрация, что в итоге способствует снижению воспалительной реакции и процесса фиброгенеза (*рисунок 10*).

ВЫВОДЫ

1. Особенности регенераторной стратегии гепатоцитов на ранних сроках после воздействия гепатотропного яда проявляются в увеличении митотической активности паренхиматозных клеток и одновременном усилении внутриклеточных восстановительных процессов.

2. Повреждение гепатоцитов при CCl_4 -интоксикация выражается в увеличении индекса альтерации и числа TUNEL-позитивных гепатоцитов к 14 суткам эксперимента. Рост числа HSP70^+ -гепатоцитов на 3 сутки и HSP60^+ -гепатоцитов на 7 сутки при воздействии токсиканта можно рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на снижение степени апоптоза.

3. Реакция клеточного компонента стромы при диффузном токсическом повреждении проявляется в увеличении количества CD3^+ , CD45^+ и тучных клеток, которые на ранних стадиях способствуют развитию острой воспалительной реакции и последующему фиброгенезу, тогда как синусоидальные эндотелиальные клетки и макрофаги печени являются мишенью токсического воздействия CCl_4 .

4. При диффузном токсическом повреждении в ткани печени иммунный ответ обусловлен увеличением концентрации $\text{IL-1}\alpha$, IL-18 , $\text{TNF-}\alpha$, IL-10 , тогда как в плазме крови отмечается повышенная продукция $\text{TNF-}\alpha$; токсическое повреждение не оказывает влияния на локальную концентрацию SCF, но приводит к существенному увеличению данного ростового фактора на системном уровне, что может служить одним из стимулов для привлечения стволовых клеток к регенерирующей печени.

5. Применение метода коррекции, основанного на стимуляции активности макрофагов аминофталгидразидом натрия, способствует снижению лейкоцитарной инфильтрации, нивелирует воспалительные процессы в печени за счет влияния на секреторную активность иммунокомпетентных клеток, уменьшая концентрацию провоспалительных цитокинов $\text{TNF-}\alpha$, IL-18 в плазме крови и IL-6 , $\text{IFN-}\gamma$ в гомогенатах, что способствует снижению апоптоза, фиброза, тяжести холестаза и нормализации синтеза белка.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При разработке новых методов лечения и профилактики диффузного токсического повреждения печени следует учитывать, что применение аминофталгидразида натрия является эффективным на ранних сроках интоксикации организма гепатотропными ядами.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФГ – натриевая соль 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаргатаминотрансфераза

ИГХ – иммуногистохимическое окрашивание

ИФА – иммуноферментный анализ

кДа – килодальтон

M1 – классически-активируемые макрофаги

M2 – альтернативно-активируемые макрофаги

мкмоль/л – микромоль на литр

ммоль/л – миллимоль на литр

ммоль/л – миллимоль на литр

отн. ед. – относительные единицы

ПОЛ – перекисное окисление липидов

у.е. – условные единицы

CCl₄ – тетрахлорметан

CD – (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

DAMP (damage-associated molecular pattern) – молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями

EGF – эпидермальный фактор роста

EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста

HGF (hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов

HSP (heat shock proteins) – белки теплового шока

IFN- γ (interferon gamma) – интерферон гамма

IL – (interleukin) – интерлейкин

M \pm m – среднее арифметическое \pm стандартная ошибка среднего

ММР – матриксная металлопротеиназа

N/мм² – штук на мм² паренхимы органа

PBS (phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

SCF (stem cell factor) – фактор стволовой клетки

TGF-β1 (transforming growth factor beta 1) – трансформирующий фактор роста бета 1

TNF-α (tumor necrosis factor alpha) – фактор некроза опухоли альфа

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) –

обнаружение свободных 3-ОН концов в разорванных молекулах

фрагментированной ДНК с помощью терминальной

дезоксинуклеотидилтрансферазы

VEGF (vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Л.И. Теоретическое и прикладное значение белков теплового шока 70 кДа; возможность практического применения и фармакологической коллекции / Л.И. Андреева // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2002. – Т. 1, № 2. – С. 2–14.
2. Атякшин, Д.А. Протеазы тучных клеток в формировании специфического тканевого микроокружения: патогенетические и диагностические аспекты / Д.А. Атякшин, И.Б. Бухвалов, М. Тиманн // *Терапия*. – 2018. – Т. 6 (24). – С. 128–140. doi: 10.18565/therapy.2018.6.128-140.
3. Биологическая химия: учебник / А.Д. Таганович, [и др]. – 2-е изд., исправленное. – Минск : Вышэйная школа, 2016. – 671 с.
4. Бремя заболеваний печени в современном мире. Некоторые показатели качества ведения больных с циррозом печени в Сибирском федеральном округе / В.В. Цуканов, А.В. Васютин, Ю.Л. Тонких, [и др.] // *Доктор.Ру*. – 2019. – № 3 (158). – С. 6–10. doi: 10.31550/1727-2378-2019-158-3-6-10.
5. Ивашкин, В.Т. Механизмы иммунной толерантности и патологии печени / В.Т. Ивашкин // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2009. – № 2. – С. 2–13.
6. Изменение цитокинового профиля и редукция функции субпопуляций лимфоцитов при подостром отравлении тетрахлорметаном / П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук, В.Г. Лим, [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – Т. 147, № 1. – С. 55–57.
7. Иммуногистохимические методы: руководство / Ed. By G.L. Kumar, L. Rudbeck; пер. с англ. под ред. Г.А. Франка, П.Г. Малькова. – Москва : Дако, 2011. – 224 с.
8. Казакова, И.А. Механизмы влияния макрофагов на репаративную регенерацию (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд.

- биол. наук : 03.00.01 / Казакова Ирина Александровна. – Екатеринбург, 2014. – 25 с.
9. Кляритская, И.Л. Роль различных цитокинов в фиброгенезе печени при хронических вирусных гепатитах В и С / И.Л. Кляритская, Е.И. Стилиди // Кримський терапевтичний журнал. – 2010. – №1. – С. 41–45.
 10. Кожанова, С.В. Субпопуляции специализированных лимфоцитов (II). NKT-клетки и ГДТ-лимфоциты / С.В. Кожанова, А.А. Шортанбаев, Б.Б. Бижигитова // Вестник КАЗНМУ. – 2012. – №1. – С. 363–366.
 11. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – Санкт-Петербург : Спец. Лит, 2010. – С. 8–12.
 12. Лужников, Е.А. Клиническая токсикология: учебник / Е.А. Лужников, Г.Н. Суходолова. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – 576 с.
 13. Медведева, С.Ю. Влияние макрофагов на репаративную регенерацию островкового аппарата поджелудочной железы при аллоксановом диабете / С.Ю. Медведева, Т.С. Булавинцева, И.Г. Данилова // Вестн. Урал. мед. акад. науки. – 2011. – № 2/1 (35). – С. 46–47.
 14. Международные термины по цитологии и гистологии человека с официальным списком русских эквивалентов: справочное пособие / Банин В.В., Белоусова Т.А., Быков В.Л., [и др.]; под ред. В.В. Банина, В.Л. Быкова. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 272 с.
 15. Мельников, Э.Э. Молекулярные шапероны / Э.Э. Мельников, Т.В. Ротанова // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36, №1. – С. 5–14.
 16. Могилевец, Э.В. Методы стимуляции регенерации при циррозе печени / Э.В. Могилевец, П.В. Гарелик, Н.И. Батвинков // Новости хирургии. – 2013. – Т. 21, № 3. – С. 103–109.
 17. Морфогенетическая функция иммунокомпетентных клеток при восстановительных процессах в печени / В.А. Черешнев, Б.Г. Юшков, М.Т. Абидов, [и др.] // Иммунология. – 2004. – № 4. – С. 204–206.

18. Мяделец, О.Д. Функциональная морфология и элементы общей патологии печени: монография / О.Д. Мяделец, Е.И. Лебедева. – Витебск: ВГМУ, 2018. – 339 с.
19. Неиммунологические функции макрофагов / Б.Г. Юшков, М.Т. Абидов, И.Г. Данилова, [и др.]. – Екатеринбург : УрО РАН, 2011. – 243 с.
20. Новый подход к лечению распространённого панкреонекроза в эксперименте / М.А. Ранцев, П.А. Сарапульцев, О.Н. Чупахин, [и др.] // Пермский медицинский журнал. – 2013. – Т. 30, № 5. – С. 116–119.
21. Поздина, В.А. Иммунофенотипические особенности макрофагов печени и перитонеальной области животных с моделью сахарного диабета 1 типа и их коррекция аминодигидрофталазиндионом натрия *in vitro* / В.А. Поздина, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов // Цитология. – 2020. – Т. 62, № 8. – С. 581–590. doi: 10.31857/S0041377120080064.
22. Полиплоидия гепатоцитов в регенерации печени при хроническом гепатите у пациентов из разных возрастных групп / Н.Б. Блинкова, С.В. Сазонов, С.Л. Леонтьев. – Екатеринбург : Юника, 2017. – 106 с.
23. Прохорова, И.М. Генетическая токсикология : лабораторный практикум / И.М. Прохорова, М.И. Ковалева, А.Н. Фомичева. – Ярославль : Яросл. гос. ун-т., 2005. – 132 с.
24. Регенерация тканей: учеб. пособие исп. и доп. – Благовещенск, 2019. – 136 с.
25. Романова Л.П., Роль двуядерных гепатоцитов в регенерации печени после механической травмы в раннем онтогенезе у крыс / Л.П. Романова, И.И. Малышева // Вестник Чувашского университета. – 2011. – № 3. – С. 398–402.
26. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / под ред. А.Н. Миронова – Москва: Гриф и К, 2012. – 944 с.
27. Саратиков, А.С. Эффективность ферментиндуцирующих средств при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном /

- А.С. Саратиков, Т.П. Новожеева, А.И. Венгеровский // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 47–49.
28. Свиридов, М.М. Каталитические свойства 6-фосфоглюконатдегидрогеназы из печени крысы в норме и при токсическом гепатите / М.М. Свиридов, А.В. Семенихина, Т.Н. Попова // Биомедицинская химия. – 2006, – Т. 52 (5). – С. 479–488.
29. Серебренникова, С.Н. Роль цитокинов в воспалительном процессе (Сообщение 2) / С.Н. Серебренникова, И.Ж. Семинский // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 8. – С. 5–8.
30. Сидорова, В.Ф. Регенерация печени у млекопитающих / В.Ф. Сидорова, З.А. Рябина, Е.М. Лейкина. – Москва: Медицина. 1966. – 205 с.
31. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А.С. Симбирцев. – Санкт-Петербург : Фолиант, 2018. – 512 с.
32. Симбирцев, А.С. Биология семейства интерлейкина 1 человека / А.С. Симбирцев // Иммунология. – 1998. – № 3. – С. 9–17.
33. Симбирцев, А.С. Цитокины в лабораторной диагностике / А.С. Симбирцев, А.А. Тотолян // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2015. – № 2. – С. 82–98.
34. Синусоидальные клетки печени и клетки костного мозга как компоненты единой функциональной системы регуляции восстановительного морфогенеза в здоровой и поврежденной печени / Н.А. Онищенко, А.В. Люндуп, Р.В. Деев, [и др.] // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6, №2. – С. 78–92.
35. Состояние желчевыводящей системы при хронических гепатитах различной этиологии / В.Л. Останко, Т.П. Калачева, И.О. Гибадулина, [и др.] // Урал. мед. журн. – 2010. – № 10 (75). – С. 101–104.
36. Тишевская, Н.В. Влияние морфогенетической активности лимфоцитов на реактивность и резистентность организма / Н.В. Тишевская, А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян // Онтогенез. – 2018. – Т. 49, № 1. – С. 54–66. doi: 10.7868/S047514501801007X.

37. Ткач, А.В. Методы обнаружения и количественной оценки апоптоза (Обзор литературы) / А.В. Ткач, Л.А. Иванова, Ю.В. Стаценко // Медицина труда и промышленная экология. – № 12. – 2008. – С.28–35.
38. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов : учеб. пособие / под. ред. проф. Н.И. Калетиной. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1016 с.
39. Усынин, И.Ф. Адаптивная роль функциональной гетерогенности гепатоцитов / И.Ф. Усынин // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – №5 (127). – С. 17–23.
40. Харченко, Ю.А. Гепатопротекторные свойства новых препаратов / Ю.А. Харченко, С.В. Ерёмченко, О.О. Авдоница // Современ. пробл. науки и образ. – 2012. – № 1. – С. 1–8.
41. Экспериментальная оценка производных пиримидина на моделях токсического поражения печени: обзор / В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, Д.В. Срубиллин, [и др.] // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. – №3. – С.88–98.
42. Эллиниди, В.Н. Практическая иммуногистохимия : метод. рек. / В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникиева, Н.А. Максимова. – Санкт-Петербург, 2002. – 36 с.
43. Яковлева, Г.Е. Ферменты в клинической биохимии / Г.Е. Яковлева. – Новосибирск : Вектор-Бест, 2005. – 44 с.
44. Якушенко, Е.В. Интерлейкин 18 и его роль в иммунном ответе / Е.В. Якушенко, Ю.А. Лопатникова, С.В. Сенников // Медицинская Иммунология. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 355–364.
45. 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. doi: 10.1016/j.immuni.2017.07.018.

46. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury / Y. Ishida, T. Kondo, T. Ohshima, [et al.] // *FASEB J.* – 2002. – Vol. 16(10). – P. 1227–1236. doi: 10.1096/fj.02-0046com.
47. Abdel-Majid, R.M. Prostaglandin e2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells / R.M. Abdel-Majid, J.S. Marshall // *J Immunol.* – 2004. – Vol. 172(2). P. 1227–1236. doi: 10.4049/jimmunol.172.2.1227.
48. Abdullah, Z. Liver Macrophages in Healthy and Diseased Liver / Z. Abdullah, P. A. Knolle // *Pflugers Arch.* – 2017. – Vol. 469(3-4). – P. 553–560. doi: 10.1007/s00424-017-1954-6.
49. Acute-on-chronic liver failure in cirrhosis [Electronic resource] / V. Arroyo, R. Moreau, P. S. Kamath, [et al.] // *Nat Rev Dis Primers.* – 2016. – 16041. – Mode of access: <https://www.nature.com/articles/nrdp201641>.
50. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. / K. Yanger, D. Knigin, Y. Zong, [et al.] // *Cell Stem Cell.* – 2014. – Vol.15(3). – P. 340–349. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.003.
51. Alcoholic liver disease and mast cells: What's your gut got to do with it? / J.A. Tolefree, A.J. Garcia, [et al.] // *Liver Res.* – 2019. – Vol. 3. – P. 46–54. doi: 10.1016/j.livres.2019.02.002.
52. Alterations of mast cells and tgf-beta1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis / D.H. Jeong, G.P. Lee, W.I. Jeong, [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2005. – Vol. 11(8). – P. 1141–1148. doi: 10.3748/wjg.v11.i8.1141.
53. An inducible autocrine cascade regulates rat hepatocyte proliferation and apoptosis responses to tumor necrosis factor-alpha / B.D. Cosgrove, C. Cheng, J.R. Pritchard, [et al.] // *Hepatology.* – 2008. – Vol. 48. – P. 276–288. doi: 10.1002/hep.22335.
54. Analysis of IFN-gamma-induced cell cycle arrest and cell death in hepatocytes / A. Kano, Y. Watanabe, N. Takeda, [et al.] // *Journal of Biochemistry.* – 1997. – Vol. 121. – P. 677–683. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021639.

55. 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. doi: 10.1016/j.ygeno.2006.08.014.
56. Antifibrotic effects of CXCL9 and its receptor CXCR3 in livers of mice and humans / H.E. Wasmuth, F. Lammert, M.M. Zaldivar, [et al.] // *Gastroenterology*. – 2009. – Vol. 137 (1). – P. 309–319. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.053.
57. Apoptosis and necrosis in the liver / M.E. Guicciardi, H. Malhi, J.L. Mott // *Comprehensive Physiology*. – 2013. – Vol. 3 (2). – P. 977–1010. doi:10.1002/cphy.c120020.
58. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes. Y. Cai, L.K. Gong, X.M. Qi, [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2005. – Vol. 26 (8) – P. 969–75. doi: 10.1111/j.1745-7254.2005.00143.x.
59. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic / A. Canbay, P. Taimr, N. Torok, [et al.] // *Lab. Invest.* – 2003. – Vol. 83 (5). – P. 655–663. doi: 10.1097/01.lab.0000069036.63405.5c.
60. Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration / F. Li, Q. Huang, J. Chen, [et al.] // *Sci Signal*. – 2010. – Vol. 3. – ra13. doi: 10.1126/scisignal.2000634.
61. Bachmann, M. A Prominent Role of Interleukin-18 in Acetaminophen-Induced Liver Injury Advocates Its Blockage for Therapy of Hepatic Necroinflammation / M. Bachmann, J. Pfeilschifter, H. Muhl // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – 161. doi: 10.3389/fimmu.2018.00161.
62. Bardadin, K.A. Mast cells in acute hepatitis / K.A. Bardadin, P.J. Scheuer // *J Pathol.* – 1986. – Vol. 149. – P. 315–325.
63. Basit, H. Histology, Kupffer Cell [Electronic resource] / H. Basit H., M.L. Tan, D.R. Webster // *StatPearls Publishing*. Treasure Island. – 2020. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493226/>.

64. Benedetti, A. Preferential distribution of apoptotic bodies in acinar zone 3 of normal human and rat liver / A. Benedetti, A.M. Jezequel, F. Orlandi // *J Hepatol.* – 1988. – Vol. 7. P. 319–324.
65. Billiau, A. Interferon-gamma: a historical perspective / A. Billiau, P. Matthys // *Cytokine and Growth Factor Reviews.* – 2009. Vol. 20. – P. 97–113. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.004.
66. Biochanin A Protects against Acute Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats / R.M. Breikaa, M.M. Algandaby, E.E. L-Demerdash, [et al.] // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* – 2013. – Vol. 77 (5). – P. 909–916. doi: 10.1271/bbb.120675.
67. Bischoff, S.C. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: Comparison of human and murine data / S.C. Bischoff // *Nat. Rev. Immunol.* – 2007. – Vol. 7 (2). – P. 93–104. doi: 10.1038/nri2018.
68. Bouwens, L. Local proliferation and extrahepatic recruitment of liver macrophages (Kupffer cells) in partial-body irradiated rats / L. Bouwens, D.L. Knook, E. Wisse // *J Leukoc Biol.* – 1986. – Vol. 39 (6). – P. 687–697. doi: 10.1002/jlb.39.6.687.
69. Braet, F. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review / F. Braet, E. Wisse // *Comparative Hepatology.* – 2002. – Vol. 1 (1). doi: 10.1186/1476-5926-1-1.
70. Brautbar, N. Industrial solvents and liver toxicity: Risk assessment, risk factors and mechanisms / N. Brautbar, I.I. Williams // *Int J Hyg Environ Health.* – 2002. – 205 (6). – P. 479–491. doi: 10.1078/1438-4639-00175.
71. Canbay, A. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis / A. Canbay, S. Friedman, G.J. Gores // *Hepatology.* – 2004. – Vol. 39 (2). – Vol. 273–278. – doi: 10.1002/hep.20051.
72. C-C motif chemokine receptor 9 positive macrophages activate hepatic stellate cells and promote liver fibrosis in mice / P.S. Chu, N. Nakamoto, [et al.] // *Hepatology.* – 2013. – Vol. 58. – P. 337–350. doi: 10.1002/hep.26351.

73. CCR9+ macrophages are required for acute liver inflammation in mouse models of hepatitis / N. Nakamoto, H. Ebinuma, T. Kanai, [et al.] // *Gastroenterology*. – 2012. – Vol. 142. – P. 366–376. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.039.
74. Cellular Mechanisms of Hepatoprotection Mediated by M2-Like Macrophages / L. Bai, L. Fu, L. Li, [et al.] // *Med Sci Monit*. – 2018. – Vol. 24. – P. 2675–2682. doi: 10.12659/MSM.907222.
75. Chandra, D. Cytosolic accumulation of HSP60 during apoptosis with or without apparent mitochondrial release: evidence that its pro-apoptotic or pro-survival functions involve differential interactions with caspase-3 / D. Chandra, G. Choy, D.G. Tang // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282. – P. 31289–31301. doi: 10.1074/jbc.M702777200.
76. Crispe, I.N. The liver as a lymphoid organ / I.N. Crispe // *Annual Review of Immunology*. – 2009. – Vol. 27. – P. 147–163. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132629.
77. CSF1 Restores Innate Immunity After Liver Injury in Mice and Serum Levels Indicate Outcomes of Patients With Acute Liver Failure / B.M. Stutchfield, D.J. Antoine, A.C. Mackinnon, [et al.] // *Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 149 (7). – P. 1896–1909. doi: 10.1053/j.gastro.2015.08.053.
78. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, [et al.] // *Cell*. – 1997. – Vol. 91. – P. 479–489.
79. De Maio, A. Extracellular Hsp70: export and function / A. De Maio // *Curr Protein Pept Sci*. – 2014. – Vol. 15 (3). – P. 225–231. doi: 10.2174/1389203715666140331113057.
80. DeLeve, L.D. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis / L.D. DeLeve // *Hepatology*. – 2015. Vol. 61 (5). – P. 1740–1746. doi: 10.1002/hep.27376.

81. Detection of infiltrating mast cells using a modified toluidine blue staining / N. Puebla-Osorio, S.N.E. Sarchio, S.E. Ullrich, [et al.] // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1627. – P. 213–222. doi:10.1007/978-1-4939-7113-8_14.
82. Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy / B. Vogel, H. Siebert, U. Hofmann, [et al.] // *MethodsX.* – 2015. – Vol. 2. – P. 124–134. doi: 10.1016/j.mex.2015.02.007.
83. Di Paolo N.C. Interleukin 1 α and the inflammatory process / N.C. Di Paolo, D.M. Shayakhmetov // *Nat Immunol.* – 2016. – Vol. 17 (8). – P. 906–913. doi:10.1038/ni.3503.
84. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness / X. Song, E. Voronov, T. Dvorkin, [et al.] // *Journal of immunology.* – 2003. – Vol. 171 (12). – P. 6448–6456. doi:10.4049/jimmunol.171.12.6448.
85. Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation / I. Cohen, P. Rider, Y. Carmi, [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2010. Vol. 107 (6). – P. 2574–2579. doi: 10.1073/pnas.0915018107.
86. Dinarello, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease / C.A. Dinarello // *Blood.* – 1996. – Vol. 87 (6). – P. 2095–2147.
87. Dioscin, a natural steroid saponin, shows remarkable protective effect against acetaminophen-induced liver damage in vitro and in vivo / X. Zhao, X. Cong, [et al.] // *Toxicol Lett.* – 2012. – 214(1). – P. 69–80. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.08.005.
88. Dissection of the intracellular pathways in hepatocytes suggests a role for Jun kinase and IFN regulatory factor 1 in Con A induced liver failure / K. Streetz, B. Fregien, J. Plumpe, [et al.] // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 514–523. doi: 10.4049/jimmunol.167.1.514.

89. Distribution of intrahepatic mast cells in various hepatobiliary disorders. An immunohistochemical study / M. Yamashiro, W. Kouda, N. Kono, [et al.] // *Virchows Arch.* – 1998. – Vol. 433. – P. 471–479.
90. Dooley, S. TGF- β in progression of liver disease / S. Dooley, P. ten Dijke // *Cell Tissue Res.* – 2012. – Vol. 347. – P. 245–256. doi: 10.1007/s00441-011-1246-y.
91. Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis / A. Pellicoro, R.L. Aucott, P. Ramachandran, [et al.] // *Hepatology.* – 2012. – Vol. 55 (6). – P. 1965–1975. doi: 10.1002/hep.25567.
92. Elvevold, K. The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity / K. Elvevold, B. Smedsrod, I. Martinez // *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology.* – 2008. – Vol. 294 (2). – P. G391–G400. doi: 10.1152/ajpgi.00167.2007.
93. Enhanced liver regeneration in IL-10-deficient mice after partial hepatectomy via stimulating inflammatory response and activating hepatocyte STAT3 / S. Yin, H. Wang, O. Park, [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2011. – Vol. 178 (4). – P. 1614–1621. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.001.
94. Evaluation of De Ritis ratio in liver-associated diseases / K.S. Parmar, G.K. Singh, G.P. Gupta, [et al.] // *International Journal of Medical Science and Public Health.* – 2016. – Vol 5 (09). – P. 1783–1788. doi: 10.5455/ijmsph.2016.24122015322.
95. Evidence of the participation of peribiliary mast cells in regulation of the peribiliary vascular plexus along the intrahepatic biliary tree / W. Koda, K. Harada, K. Tsuneyama, [et al.] // *Lab Invest.* – 2000. – Vol. 80. – P. 1007–1017. doi: 10.1038/labinvest.3780106.
96. Expression of stem cell factor and its receptor c-Kit during the development of intrahepatic cholangiocarcinoma / T. Mansuroglu, P. Ramadori, J. Dudas, [et al.] // *Lab. Invest.* – 2009. – V. 89 (5). – P. 562–574.

97. Extracellular HSP60 triggers tissue regeneration and wound healing by regulating inflammation and cell proliferation / W. Pei, K. Tanaka, S.C. Huang, [et al.] // *Regenerative Medicine*. – 2016. – 16013. – P. 1–11.
98. Extracellular Hsp70 induces inflammation and modulates LPS/LTA-stimulated inflammatory response in THP-1 cells / A. Hulina, M.G. Rajkovic, D.J. Despot, [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2018. – Vol. 23 (3). – P. 373–384. doi: 10.1007/s12192-017-0847-0.
99. Fausto, N. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future / Fausto N. // *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. – 1999. – Vol. 277. – P. 917–921.
100. Fausto, N. Liver Regeneration / N. Fausto, J.S. Campbell, K.J. Riehle // *Hepatology*. – 2006 – Vol. 43 (2 Suppl 1). – P. 45–53.
101. Forbes, S.J. New horizons for stem cell therapy in liver disease / S.J. Forbes, P.N. Newsome // *Journal of Hepatology*. – 2012. – Vol. 56. – P. 496–499.
102. Francis, H. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? / H. Francis, C.J. Meininger // *Dig Liver Dis*. – 2010. – Vol. 42 (8). – P. 529–536. doi: 10.1016/j.dld.2010.02.016.
103. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages / D.L. Laskin, B. Weinberger, J.D. Laskin, [et al.] // *J Leukoc Biol*. – 2001. – Vol. 70 (2). – P. 163–170.
104. Gandhi, C.R. Cellular Anatomy of the Liver (Hepatocyte, Biliary Epithelial Cells, Endothelial Cells, Kupffer Cells and Hepatic Stellate Cells) / C.R. Gandhi // *Pathobiology of Human Disease*. – 2014. – P. 1759–1769. doi: 10.1016/B978-0-12-386456-7.04201-5.
105. Gao, B. Liver: An organ with predominant innate immunity / B. Gao, W.I. Jeong, Z. Tian // *Hepatology*. – 2008. – Vol. 47. – P. 729–736. doi: 10.1002/hep.22034.
106. Gu, X. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury / X. Gu, J.E. Manautou // *Expert Rev Mol Med*. – 2012. – Vol. 14 (e4). doi:10.1017/S1462399411002110.

107. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins / H.H. Kampinga, J. Hageman, M.J. Vos, [et al.] // *Cell Stress Chaperones*. – 2009. – Vol. 14 (1). – P. 105–111. doi: 10.1007/s12192-008-0068-7.
108. Guillot, A. Liver Macrophages: Old Dogmas and New Insights / A. Guillot, F. Tacke // *Hepatology communications*. – Vol. 3 (6). – P. 730–743. doi:10.1002/hep4.1356.
109. Heat shock protein 70 is required for optimal liver regeneration after partial hepatectomy in mice / J.H. Wolf, T.R. Bhatti, S. Fouraschen, [et al.] // *Liver Transpl*. – 2014. – Vol. 20 (3). – P. 376–385. doi: 10.1002/lt.23813.
110. Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals / C.M. Sawai, S. Babovic, S. Upadhaya, [et al.] // *Immunity*. – 2016. – Vol. 45 (3). – P. 597–609. – doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.007.
111. Hepatic fibrosis: Molecular mechanisms and drug targets / S. Lotersztajn, B. Julien, F. Teixeira-Clerc, [et al.] // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2005. – Vol. 45. – P. 605–628. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095906.
112. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice / J.P. Pradere, J. Kluwe, S. De Minicis, [et al.] // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 58 (4). – P. 1461–1473. doi: 10.1002/hep.26429.
113. Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1⁺ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis / K.R. Karlmark, R. Weiskirchen, H.W. Zimmermann, [et al.] // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 50. – P. 261–274. doi: 10.1002/hep.22950.
114. Holt, M.P. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury / M.P. Holt, L. Cheng, C. Ju // *J Leukoc Biol*. – 2008. – Vol. 84. – P. 1410–1421. doi: 10.1189/jlb.0308173.
115. Horras C.J. Regulation of Hepatocyte Fate by Interferon- γ / C.J. Horras, C.L. Lamb, K.A. Mitchell // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2011. – Vol. 22 (1). – P. 35–43. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.01.001.

116. How inflammation impinges on NAFLD: a role for Kupffer cells / N. Duarte, I.C. Coelho, R.S. Patarrao, [et al.] // *BioMed Res Int.* – 2015. – 984578. doi: 10.1155/2015/984578.
117. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury / Y. Matsumori, S.M. Hong, K. Aoyama, [et al.] // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2005. – Vol. 25. – P. 899–910. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600080.
118. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells in skin fibrosis / E. Garbuzenko, A. Nagler, D. Pickholtz, [et al.] // *Clin Exp Allergy.* – 2002. – Vol. 32(2). – P. 237–246. doi: 10.1046/j.1365-2222.2002.01293.x.
119. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF-alpha/IL-6 in mice / N. Selzner, M. Selzner, B. Odermatt, [et al.] // *Gastroenterology.* – 2003. – Vol. 124 (3). –P. 692–700. doi: 10.1053/gast.2003.50098.
120. Ideal hepatotoxicity model in rats using carbon tetrachloride (CCL4) / A.J. Alhassan, M.S. Sule, S.A. Aliyu, [et al.] // *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences.* – 2009. – Vol. 2 (2). – P. 185–187. doi: 10.4314/bajopas.v2i2.63809.
121. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites / F.K. Swirski, M. Nahrendorf, M. Etzrodt, [et al.] // *Science.* – 2009. – Vol. 325 (5940). – P. 612–6, doi: 10.1126/science.1175202.
122. IFITM1 plays an essential role in the antiproliferative action of interferon-gamma / G. Yang, Y. Xu, X. Chen, [et al.] // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26. – P. 594–603. doi: 10.1038/sj.onc.1209807.
123. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages / D.F. Fiorentino, A. Zlotnik, T.R. Mosmann, [et al.] // *J Immunol.* – 1991. – Vol. 147 (11). – P. 3815–3822.
124. IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR /

- P. Krishnamurthy, J. Rajasingh, E. Lambers, [et al.] // *Circ Res.* – 2009. – Vol. 104. – P. e9–e18. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.188243.
125. IL-17-producing gammadelta T cells establish long-lived memory in the skin / T. Hartwig, S. Pantelyushin, A.L. Croxford, [et al.] // *Eur J Immunol.* – 2015. – Vol. 45. – P. 3022–3033. doi: 10.1002/eji.201545883.
126. IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation / P. Rider, Y. Carmi, O. Guttman, [et al.] // *Journal of immunology.* – 2011. – 187 (9). – P. 4835–4843. doi: 10.4049/jimmunol.1102048.
127. In hepatic fibrosis, liver sinusoidal endothelial cells acquire enhanced immunogenicity / M.K. Connolly, A.S. Bedrosian, A. Malhotra, [et al.] // *The Journal of Immunology.* – 2010. – Vol. 185 (4). – P. 2200–2208. doi: 10.4049/jimmunol.1000332.
128. Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury / E. Zigmond, S. Samia-Grinberg, M. Pasmanik-Chor, [et al.] // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 193. – P. 344–353. doi: 10.4049/jimmunol.1400574.
129. Influence factors of serum fibrosis markers in liver fibrosis / J. Tao, H-Q. Peng, W-M. Cai, [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2003. – Vol. 9 (11). – P. 2497–2500. doi: 10.3748/wjg.v9.i11.2497.
130. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats / T. Kimura, I. Sakaida, S. Terai, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1997. – Vol. 231(3). – P. 557–560. doi: 10.1006/bbrc.1997.6135.
131. Interleukin-10 and liver diseases / O. Le Moine, H. Louis, F. Sermon, [et al.] // *J. Acta Gastroenterol. Belg.* – 1999. – Vol. 62. – P. 1–8.
132. Interleukin-1 α and Interleukin-1 β play a central role in the pathogenesis of fulminant hepatic failure in mice / M. Sultan, Z. Ben-Ari, R. Masoud // *PLOS One.* – 2017. – Vol. 12(9). – e0184084. doi: 10.1371/journal.pone.0184084.

133. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases / D.J. Farrell, J.E. Hines, A.F. Walls, [et al.] // *Hepatology*. – 1995. – Vol. 22. – P. 1175–1181.
134. Jaeschke, H. Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans / H. Jaeschke, Y. Xie, M.R. McGill // *J Clin Transl Hepatol*. – 2014. – Vol. 2(3). – P. 153–161. doi:10.14218/JCTH.2014.00014.
135. Ju, C. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies / C. Ju, F. Tacke // *Cell Mol Immunol*. – 2016. – Vol. 13. – P. 316–327. doi: 10.1038/cmi.2015.104.
136. Jukic, T. A tetrahydrophthalazine derivative "sodium nucleinate" exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells in vitro and in vivo / T. Jukic, M. Abidov, A. Ihan // *Collegium antropologicum*. – 2011. – Vol. 35(4). – P. 1219–1223.
137. Kaplowitz, N. Mechanisms of liver cell injury / N. Kaplowitz // *J Hepatol*. – 2000. – Vol. 32. P. 39–47. doi: 10.1016/s0168-8278(00)80414-6.
138. Khairallah, C. Tissue adaptations of memory and tissue-resident gamma delta T cells / C. Khairallah, T.H. Chu, B.S. Sheridan // *Front Immunol*. – 2018. – Vol. 9. – 2636. doi: 10.3389/fimmu.2018.02636.
139. Khan, A.A. Hepatoprotective effects of camel milk against CCl₄ induced hepatotoxicity in rats / A.A. Khan, M.A. Alzohairy // *Asian Journal of Biochemistry*. – 2011. – Vol. 6. – P. 171–180. doi: 10.3923/ajb.2011.171.180.
140. Kubes P., Jenne C. Immune Responses in the Liver / P. Kubes, C. Jenne // *Annual Review of Immunology*. – 2018. – Vol. 36. – P. 247–277. doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052415.
141. Kung, J.W.C. Stem cells and liver repair / J.W.C. Kung, S.J. Forbes // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2009. – Vol. 20 (5). – P. 568–574. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.004.
142. Kupffer Cells in the Liver *Comprehensive Physiology* / L. J. Dixon, M. Barnes, H. Tang, [et al.] // USA: John Wiley and Sons, Inc. – 2013. – P. 785–797. – doi:10.1002/cphy.c120026.

143. Kurashova, N.A. Expression of HSP70 Heat-Shock Proteins under Oxidative Stress / N.A. Kurashova, I.M. Madaeva, L.I. Kolesnikova // *Adv Gerontol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 20–25. doi: 10.1134/S2079057020010099.
144. Lange, C.M. Immunodysfunction in Acute-on-Chronic Liver Failure / C.M. Lange, R. Moreau // *Visc Med.* – 2018. – Vol. 34 (4). – P. 276–282. doi: 10.1159/000488690.
145. Laskin, D.L. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces / D.L. Laskin // *Chemical research in toxicology.* – 2009. – Vol. 22 (8). – P. 1376–1385. doi: 10.1021/tx900086v.
146. Li, Z. Heat-shock proteins / Z. Li, P. Srivastava // *Curr Protoc Immunol.* – Vol. 58 (1). – 2004. – P. A.1T.1–A.1T.6. doi: 10.1002/0471142735.ima01ts58.
147. Lineage-specific enhancers activate self-renewal genes in macrophages and embryonic stem cells / E.L. Soucie, Z. Weng, L. Geirsdottir, [et al.] // *Science.* – 2016. – Vol. 351. – aad5510. doi: 10.1126/science.aad5510.
148. Liu, H. Caspase-12 mediates carbon tetrachloride-induced hepatocyte apoptosis in mice / H. Liu, Z. Wang, M.J. Nowicki // *World J Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 20 (48). – P. 18189–18198. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18189.
149. Liu, M. The role of innate lymphoid cells in immune-mediated liver diseases / M. Liu, C. Zhang // *Front Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – 695. doi: 10.3389/fimmu.2017.00695.
150. Liver Cell Polyploidization: A Pivotal Role for Binuclear Hepatocytes / J-E. Guidotti, O. Bregerie, A. Robert, [et al.] // *Journal of biological chemistry.* – 2003. – Vol. 278 (21). – P. 19095–19101.
151. MacPhee, P.J. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy / P.J. MacPhee, E.E. Schmidt, A.C. Groom // *Am J Physiol.* – 1992. – Vol. 263. – P. 17–23.
152. Macrophage activation and polarization / F.O. Martinez, A. Sica, A. Mantovani, [et al.] // *Front Biosci.* – 2008. – Vol. 13. – P. 453–461. doi: 10.2741/2692.

153. Macrophage Membrane Molecules: Markers of Tissue Differentiation and Heterogeneity / L. Martinez-Pomares, N. Platt, A.J. Mcknight, [et al.] // *Immunobiology*. – 1996. – Vol. 195 (4-5). – P. 407–416. doi: 10.1016/S0171-2985(96)80012-X.
154. Macrophage Modification Strategies for Efficient Cell Therapy / A.S. Poltavets, P.A. Vishnyakova, A.V. Elchaninov, [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9 (6). – 1535. doi:10.3390/cells9061535.
155. Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation / K. Hamidzadeh, S.M. Christensen, E. Dalby, [et al.] // *Annu Rev Physiol*. – 2017. – Vol. 79. – P. 567–592. doi: 10.1146/annurev-physiol-022516-034348.
156. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? / D.L. Laskin, V.R. Sunil, C.R. Gardner, [et al.] // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2011. – Vol. 51. – P. 267–288. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812.
157. Macrophages: central regulators of iron balance / E. Gammella, P. Buratti, G. Cairo, [et al.] // *Metallomics*. – 2014. – Vol. 6. – P. 1336–1345. doi:10.1039/C4MT00104D.
158. Malik, R. The role of non-parenchymal cells in liver growth / R. Malik, C. Selden, H. Hodgson // *Semin Cell Dev Biol*. – 2002. – Vol. 13 (6). – P. 425–431. doi: 10.1016/s1084952102001301.
159. Mammalian HSP60 is quickly sorted into the mitochondria under conditions of dehydration / H. Itoh, A. Komatsuda, H. Ohtani, [et al.] // *European Journal of Biochemical*. – 2002. – Vol. 269. – P. 5931–5938. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03317.x.
160. Markedly increased high-mobility group box 1 protein in a patient with small-for-size syndrome / D.G. Craig, P. Lee, E.A. Pryde, [et al.] // *Case Rep Transplant*. – 2014. – Vol. 2014. – 272498. doi:10.1155/2014/272498.
161. Marra, F. Roles for chemokines in liver disease / F. Marra, F. Tacke // *Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 147. – P. 577–594. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.043.

162. Martinez, F.O. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment / F.O. Martinez, S. Gordon // *F1000Prime Rep.* – 2014. – Vol. 6 (13). doi: 10.12703/P6-13.
163. Mast cells and the liver aging process / F. Grizzi, G. Di Caro, L. Laghi // *Immun. Ageing.* – 2013. – Vol. 10 (9). doi: 10.1186/1742-4933-10-9.
164. Mechanism of Hepatocyte Apoptosis / L. Cao, X-B. Quan, W-J. Zeng [et al.] // *Journal of Cell Death.* – 2016. – Vol. 9. – P. 19–29. doi:10.4137/JCD.S39824.
165. Mehendale, H.M. Tissue repair: An important determinant of final outcome of toxicant-induced injury / H.M. Mehendale // *Toxicol Pathol.* – 2005. – Vol. 33 (1). – P. 41–51. doi: 10.1080/01926230590881808.
166. Method for obtaining 5-amino 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione alkali metal salts and their use in medicine: pat. 8536171B2 US. № 8,536,171B2 ; Application 15. 01. 2010 ; Publication 17. 09. 2013. 17 p.
167. Metz, M. Mast cells-key effector cells in immune responses / M. Metz, M. Maurer // *Trends Immunol.* – 2007. – Vol. 28. – P. 234–241. doi: 10.1016/j.it.2007.03.003.
168. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration / G.K. Michalopoulos // *J Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 213. – P. 286–300. doi: 10.1002/jcp.21172.
169. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration after partial hepatectomy, critical analysis of mechanistic dilemmas / Michalopoulos G.K. // *The American Journal of Pathology.* – 2010. – Vol. 176, №.1 – P. 2–13.
170. Michalopoulos, G.K. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications / G.K. Michalopoulos, B. Bhushan // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – Vol. 18 (1). – P. 40–55. doi: 10.1038/s41575-020-0342-4.
171. Michalopoulos, G.K. Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis / G.K. Michalopoulos // *Comprehensive Physiology.* – 2013. – Vol. 3 (1). doi:10.1002/cphy.c120014.
172. Modulation of Inflammatory Response Improves Myocardial Infarct Healing in Rats / A.P. Sarapultsev, O.N. Chupakhin, P.A. Sarapultsev, [et al.] // *Current*

- Pharmaceutical Design. – 2014. – Vol. 20 (12). – P. 1980–1986. doi: 10.2174/13816128113199990492.
173. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells / A.K. Horst, K. Neumann, L. Diehl, [et al.] // *Cell Mol Immunol.* – 2016. – Vol. 13 (3). – P. 277–292. doi: 10.1038/cmi.2015.112.
174. Natarajan, V. SECs (Sinusoidal Endothelial Cells), Liver Microenvironment, and Fibrosis / V. Natarajan, E.N. Harris, S. Kidambi // *Biomed Res Int.* – 2017. – Vol. 2017. – 4097205. doi: 10.1155/2017/4097205.
175. Nemeth, E. Microanatomy of the liver immune system / E. Nemeth, A.W. Baird, C. O'Farrelly // *Semin Immunopathol.* – 2009. – Vol. 31 (3). – P. 333–43. doi: 10.1007/s00281-009-0173-4.
176. New Concepts in Liver Regeneration / K.J. Riehle, Y.Y. Dan, J.S. Campbell, [et al.] // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2011. – Vol. 26 (Suppl 1). – P. 203–212. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06539.x.
177. Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal / L.M. Carlin, E.G. Stamatiades, C. Auffray, [et al.] // *Cell.* – 2013. – Vol. 153 (2). – P. 362–375. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.010.
178. On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver / I. Theurl, I. Hilgendorf, M. Nairz, [et al.] // *Nat Med.* – 2016. – Vol. 22. – P. 945–951. doi: 10.1038/nm.4146.
179. Parker G.A., Picut C.A., Liver Immunobiology. Toxicologic Pathology / G.A. Parker, C.A. Picut. – 2005. – Vol. 33. – P. 52–62. doi: 10.1080/01926230590522365.
180. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats / I.G. Danilova, T.S. Bulavintceva, I.F. Gette, [et al.] // *Biomedicine and Pharmacotherapy.* – 2017. – Vol. 95. – P. 103–110.
181. Phenotypical and Functional Polymorphism of Liver Resident Macrophages / A.V. Elchaninov, T. Kh. Fatkhudinov, P.A. Vishnyakova, [et al.] // *Cells.* – 2019. – Vol. 8. – 1032. doi: 10.3390/cells8091032.

182. Physiological variations of stem cell factor and stromal-derived factor-1 in murine models of liver injury and regeneration / E.S. Swenson, R. Kuwahara, D.S. Krause, [et al.] // *Liver Int.* – 2008. – Vol. 289 (3). – P. 308–318. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01659.x.
183. Physiology of Cholangiocytes / J.H. Tabibian, A.I. Masyuk, T.V. Masyuk, [et al.] // *Compr Physiol.* – 2013. – Vol. 3 (1). – 10.1002/cphy.c120019. doi: 10.1002/cphy.c120019.
184. Pollock, A.S. The prodomain of interleukin 1alpha interacts with elements of the RNA processing apparatus and induces apoptosis in malignant cells / A.S. Pollock, J. Turck, D.H. Lovett // *FASEB journal.* – 2003. – Vol. 17 (2). – P. 203–213. doi: 10.1096/fj.02-0602com.
185. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl₄) / E. Karakus, A. Karadeniz, N. Simsek, [et al.] // *J. Hazard. Mater.* – 2011. – Vol. 195. – P. 208–213. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.08.027.
186. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice / C. Ju, T.P. Reilly, M. Bourdi, [et al.] // *Chem Res Toxicol.* – 2002. – Vol. 15. – P. 1504–1513. doi: 10.1021/tx0255976.
187. Quantifying memory CD8 T cells reveals regionalization of immunosurveillance / E.M. Steinert, J.M. Schenkel, K.A. Fraser, [et al.] // *Cell.* – 2015. – Vol. 161. – P. 737–749. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.031.
188. Racanelli, V. The liver as an immunological organ / V. Racanelli, B. Rehermann // *Hepatology.* – 2006. – Vol. 43. – P. S54–S62. doi: 10.1002/hep.21060.
189. Rahman, T.M. Animal models of acute hepatic failure / T.M. Rahman, H.J. Hodgson // *International journal of experimental pathology.* – 2000. – 81 (2). – P. 145–157. doi:10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x.
190. Recruitment of lymphocytes to the human liver / P.F. Lalor, P. Shields, A.J. Grant, [et al.] // *Immunology and Cell Biology.* – 2002. – Vol. 80 (1). – P. 52–64. doi: 10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x.

191. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects by oral administration of betaine in male Han-wistar rats: a morphometric histological study / M. Junnila, T. Rahko, A. Sukura, [et al.] // *Vet. Pathol.* – 2000. – Vol. 37. – P. 231–238. doi: 10.1354/vp.37-3-231.
192. Release and Cleavage of Stem Cell Factor by Human Mast Cells [Electronic resource] / A. Depaulis, G. Minopoli, E. Arbustini, [et al.] // *Mast cells and Basophils.* – 2000. – P. 597–608. – Mode of access: <https://doi.org/10.1016/B978-012473335-0/50039-8>.
193. Restoration of hepatic mast cells and expression of a different mast cell protease phenotype in regenerating rat liver after 70%-hepatectomy / M. Zweifel, K. Breu, K. Matozan K., [et al.] // *Immunol Cell Biol.* – 2005. – Vol. 83. – P. 587–595. doi: 10.1111/j.1440-1711.2005.01368.x.
194. Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury / Q. You, M. Holt, H. Yin, [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2013. – Vol. 86. – P. 836–843. doi: 10.1016/j.bcp.2013.07.006.
195. Role of macrophages in experimental liver injury and repair in mice (Review) / X. Dong, J. Liu, Y. Xu, [et al.] // *Experimental and therapeutic medicine.* – 2019. – Vol. 17. – P. 3835–3847. doi: 10.3892/etm.2019.7450.
196. Role of transforming growth factor beta signaling and expansion of progenitor cells in regenerating liver / A. Thenappan, Y. Li, K. Kitisin, [et al.] // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 51 (4). – P. 1373–1382. doi: 10.1002/hep.23449.
197. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis / A.M. Gressner, R. Weiskirchen, K. Breitkopf // *Front Biosci.* – 2002. – Vol. 7. – P. d793–d807.
198. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis / J.A. Fallowfield, M. Mizuno, T.J. Kendall, [et al.] // *Journal of immunology.* – 2007. – Vol. 178 (8). – P. 5288–5295. doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5288.
199. Schneider C.P. The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage / C.P. Schneider, M.G. Schwacha, I.H. Chaudry // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* –

- Molecular Basis of Disease. – 2004. – Vol. 1689 (1). – P. 22–32. doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.01.003.
200. Schuppan, D. Evolving therapies for liver fibrosis / D. Schuppan, Y.O. Kim // The Journal of Clinical Investigation. – 2013. – Vol. 123 (5). – P. 1887–1901. doi: 10.1172/jci66028.
201. Schwabe, R.F. Mechanisms of liver injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways / R.F. Schwabe, D.A. Brenner // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. – 2006. – Vol. 290. – P. 583–589. doi: 10.1152/ajpgi.00422.2005.
202. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells / S. Gurbuxani, J.M. Bruey, A. Fromentin, [et al.] // Oncogene. – 2001. – Vol. 20. – P. 7478–7485.
203. Selective suppression of initial cytokine response facilitates liver regeneration after extensive hepatectomy in rats / R. Tsutsumi, Y. Kamohara, S. Eguchi, [et al.] // Hepatogastroenterology. – 2004. – Vol. 51. – P. 701–704.
204. Sequential analysis of macrophage tissue differentiation and Kupffer cell exchange after human liver transplantation / G. Steinhoff, M. Behrend, C. Sorg, [et al.] // Cells of the hepatic sinusoid. – 1989. – Vol. 2. – P. 406–409.
205. Serhan, C.N. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators / C.N. Serhan, S. Yacoubian, R. Yang // Annu Rev Pathol. – 2008. – Vol. 3. – P. 279–312. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409.
206. Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo / S. Finotto, J. Siebler, M. Hausding, [et al.] // Gut. – 2004. – Vol. 53 (3). – P. 392–400. doi: 10.1136/gut.2003.018572.
207. Sharma, M. Critical Role for Mixed-lineage Kinase 3 in Acetaminophen-induced Hepatotoxicity / M. Sharma, V. Gadang, A. Jaeschke // Mol. Pharmacol. – 2012. – Vol. 82 (5). – P. 1001–1007. doi: 10.1124/mol.112.079863.

208. Shetty, S. Liver sinusoidal endothelial cells, gatekeepers of hepatic immunity / S. Shetty, P. F. Lalor, D. H. Adams // *Gastroenterology and Hepatology*. – 2018. – Vol. 15. – P. 555–567. doi: 10.1038/s41575-018-0020-y.
209. Sims, J.E. The IL-1 family: regulators of immunity / J.E. Sims, D.E. Smith. // *Nature Reviews Immunology*. – 2010. – Vol. 10 (2). – P. 89–102. doi: 10.1038/nri2691.
210. Stanger, B.Z. Cellular Homeostasis and Repair in the Mammalian Liver / B.Z. Stanger // *Annu Rev Physiol*. – 2015. – Vol. 77. – P. 179–200. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170255.
211. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration / W. Li, X. Liang, C. Kellendonk, [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277 (32). – P. 28411–28417. doi: 10.1074/jbc.M202807200.
212. Stem cell factor attenuates liver damage in a murine model of acetaminophen-induced hepatic injury / K. Simpson, C.M. Hogaboam, S.L. Kunkel, [et al.] // *Lab Invest*. – 2003. – Vol. 83 (2). – P. 199–206. doi: 10.1097/01.lab.0000057002.16935.84.
213. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease / A. O'Garra, F.J. Barrat, A.G. Castro, [et al.] // *Immunol Rev*. – 2008. – Vol. 223. – P. 114–131. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00635.x.
214. Sun, R. Negative regulation of liver regeneration by innate immunity (natural killer cells/interferon-gamma) / R. Sun, B. Gao // *Gastroenterology*. – 2004. – Vol. 127. – P. 1525–1539.
215. Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins / K. Mahmood, S. Jadoon, Q. Mahmood, [et al.] // *BioMed research international*. – 2014. – 564136. – doi: 10.1155/2014/564136.
216. Synthesis of IL-6 by Hepatocytes Is a Normal Response to Common Hepatic Stimuli / C.A. Norris, M. He, L-I. Kang, [et al.] // *Plos One*. – 2014. – Vol. 14 (10). – e0224498. – doi: 10.1371/journal.pone.0096053.

217. Tacke, F. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis / F. Tacke, H.W. Zimmermann // *J Hepatol.* – 2014. – Vol. 60. – P. 1090–1096. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025.
218. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver / M. Adachi, S. Suematsu, T. Kondo, [et al.] // *Nat Genet.* – 1995. – Vol. 11. – P. 294–300.
219. TGF- β signalling and liver disease / I. Fabregat, J. Moreno-Caceres, A. Sanchez, [et al.] // *FEBS J.* – 2016. – Vol. 283. – P. 2219–2232. doi: 10.1111/febs.13665.
220. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases / B. Franceschini, G. Ceva-Grimaldi, C. Russo, [et al.] // *Dig Dis Sci.* – 2006. – Vol. 51. – P. 2248–2256.
221. The effects of icariin on the expression of HIF-1 α , HSP-60 and HSP70 in PC12 cells suffered from oxygen-glucose deprivation-induced injury / Z.T. Mo, W.N. Li, Y.R. Zhai, [et al.] // *Pharm. Biol.* – 2017. – Vol. 55. – P. 848–852. doi: 10.1080/13880209.2017.1281968.
222. The fractalkine receptor CX(3)CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes / K.R. Karlmark, H.W. Zimmermann, C. Roderburg, [et al.] // *Hepatology.* – 2010. – Vol. 52. – P. 1769–1782. doi: 10.1002/hep.23894.
223. The Role of IL-1 Family Members and Kupffer Cells in Liver Regeneration / Q. Tan, J. Hu, [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2016. – 6495793. doi:10.1155/2016/6495793.
224. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis / E.H. Steen, X. Wang, S. Balaji, [et al.] // *Advances in Wound Care.* – 2020. – Vol. 9 (4). – P.184–198. doi:10.1089/wound.2019.1032.
225. The Spleen Promotes the Secretion of CCL2 and Supports an M1 Dominant Phenotype in Hepatic Macrophages During Liver Fibrosis / L. Li, W. Wei, Z. Li, [et al.] // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – Vol. 51. – P. 557–574. doi: 10.1159/000495276.

226. Thomson, A.W. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment / A.W. Thomson, P.A. Knolle // *Nat Rev Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 753–766. doi: 10.1038/nri2858.
227. Three-dimensional reconstructions of intrahepatic bile duct tubulogenesis in human liver / P.S. Vestentoft, P. Jelnes, B.M. Hopkinson, [et al.] // *BMC Deve Biol.* – 2011. – Vol. 11. – 56. doi: 10.1186/1471-213X-11-56.
228. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors / E.G. Perdiguero, K. Klapproth, C. Schulz, [et al.] // *Nature.* – 2015. – Vol. 518 (7540). – P. 547–551. doi: 10.1038/nature13989.
229. TNF- α inhibits liver collagen- α 1 (I) gene expression through a tissue-specific regulatory region / K. Houglum, M. Buck, D.J. Kim, [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastr. L.* – 1998. – 274. – P. G840–G847.
230. TNF- α Regulates Transforming Growth Factor- α Expression in Regenerating Murine Liver and Isolated Hepatocytes / R.M. Gallucci, P.P. Simeonova, W. Toriumi, [et al.] // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164 (2). – P. 872–878. – doi: 10.4049/jimmunol.164.2.872.
231. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents / G. Malaguarnera, E. Cataudella, M. Giordano, [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 22. – P. 2756–2766. doi: 10.3748/wjg.v18.i22.2756.
232. Tumor necrosis factor alpha prevents tumor necrosis factor receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not Fas-mediated apoptosis: Role of nuclear factor-kappa B / M. Nagaki, T. Naiki, D.A. Brenner, [et al.] // *Hepatology.* – 2000. – Vol. 32. P. 1272–1279. doi: 10.1053/jhep.2000.20239.
233. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat / E.M. Webber, J. Bruix, R.H. Pierce [et al.] // *Hepatology.* – 1998. – Vol. 28. – P. 1226–1234.
234. Vaccination with Platelet-Derived Growth Factor B Kinoids Inhibits CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis in Mice / Z.M. Hao, X.B. Fan, S. Li, [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2012. – Vol. 342. – P. 835–842. doi: 10.1124/jpet.112.194357.

235. Variations in interferon gamma receptor gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in rats / H.S. Lai, W.H. Lin, W.M. Hsu, [et al.] // *American Surgeon*. – 2009. – Vol. 75 (1). – P. 49–54.
236. Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects / A. Detoraki, R.I. Staiano, F. Granata, [et al.] // *J Allergy Clin Immunol*. – 2009. – Vol. 123 (5). – 1149.e1-5. doi: 10.1016/j.jaci.2009.01.044.
237. Wajant, H. Tumor necrosis factor signaling / H. Wajant, K. Pfizenmaier, P. Scheurich // *Cell Death Differ*. – 2003. – Vol. 10. – P. 45–65.
238. 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. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.009.
239. Wang, J. Phenotypic and functional status of intrahepatic T cells in chronic hepatitis C. / J. Wang, T.H. Holmes, L.L. de Guevara, [et al.] // *J Infect Dis*. – 2006. – 15. – V.194, №8. – P. 1068–1077.
240. Wang, K. Pathophysiological Significance of Hepatic Apoptosis / K. Wang, B. Lin // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 2013. – 740149. – doi:10.1155/2013/740149.
241. Wang, X. Gammadelta T cells in liver diseases / X. Wang, T. Tian // *Front Med*. – 2018. – Vol. 12. – P. 262–268. doi: 10.1007/s11684-017-0584-x.
242. Wang, Y. The Roles of Liver-Resident Lymphocytes in Liver Diseases / Y. Wang, C. Zhang // *Front. Immunol*. – 2019. – Vol. 10. – 1582. doi: 10.3389/fimmu.2019.01582.
243. Weber Lutz, W.D. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model / W.D. Weber Lutz, M. Boll, A. Stampfl // *Critical Reviews in Toxicology*. – 2003. – Vol. 33 (2). – P. 105–136. doi: 10.1080/713611034.
244. Weber, A. Interleukin-1 (IL-1) pathway / A. Weber, P. Wasiliew, M. Kracht // *Science Signaling*. – 2010. – Vol. 3 (105). – cm1. doi: 10.1126/scisignal.3105cm1.

245. Woolbright, B.L. Mechanisms of Inflammatory Liver Injury and Drug-Induced Hepatotoxicity / B.L. Woolbright, H. Jaeschke // *Curr Pharmacol Rep.* – 2018. – Vol. 4 (5). – P. 346–357. doi:10.1007/s40495-018-0147-0.
246. Yang, J. Hepatocellular carcinoma: A global view / J. Yang, J.D. Yang, L.R. Roberts // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2010. – Vol. 7. – P. 448–458. doi: 10.1038/nrgastro.2010.100.
247. Yang, Y.M. TNF α in liver fibrosis / Y.M. Yang, E. Seki // *Curr Pathobiol Rep.* – 2015. – P. 3 (4). – P. 253–261. doi: 10.1007/s40139-015-0093-z.
248. Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease / T.D. Boyer, M.P. Manns, A.J. Sanyal, [et al.]. – Philadelphia : Saunders/Elsevier., 2012. – p. 1314.
249. Zhang, C. NK cell subsets in autoimmune diseases / C. Zhang, Z. Tian // *J Autoimmun.* – 2017. – Vol. 83. – P. 22–30. doi: 10.1016/j.jaut.2017.02.005.
250. $\gamma\delta$ T Cells Suppress Liver Fibrosis via Strong Cytolysis and Enhanced NK Cell-Mediated Cytotoxicity Against Hepatic Stellate Cells / M. Liu, Y. Hu, Y. Yuan, [et al.] // *Front Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – 477. doi: 10.3389/fimmu.2019.00477.

ПЕРЕЧЕНЬ ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Список таблиц

Таблица 1 – Перечень антител, применяемых для проведения ИГХ исследований печени экспериментальных животных;

Таблица 2 – Наименование наборов для ИФА, применяемых в исследовании;

Таблица 3 – Показатели клеточной и внутриклеточной регенерации печени в динамике диффузного токсического повреждения и его коррекции;

Таблица 4 – Показатели деструктивных изменений в печени крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном (CCl_4) и на фоне его коррекции аминофталгидразидом (АФГ);

Таблица 5 – Белки теплового шока в печени крыс при токсическом повреждении тетрахлорметаном (CCl_4) и на фоне его коррекции аминофталгидразидом (АФГ);

Таблица 6 – Изменение площади коллагена в печени экспериментальных животных;

Таблица 7 – Биохимические показатели экспериментальных животных в динамике диффузного токсического повреждения печени тетрахлорметаном (CCl_4) и его коррекции аминофталгидразидом (АФГ);

Таблица 8 – Гематологические показатели экспериментальных животных;

Таблица 9 – Изменение количества синусоидальных эндотелиальных клеток в динамике токсическом повреждении печени и его коррекции;

Таблица 10 – Изменение количества макрофагов в печени при токсическом повреждении и его коррекции;

Таблица 11 – Тучные клетки печени и оптическая плотность их секреторных гранул при токсическом воздействии и на фоне его коррекции;

Таблица 12 – CD 45⁺- и CD 3⁺-клетки при токсическом повреждении печени и его коррекции;

Таблица 13 – Содержание цитокинов в плазме крови экспериментальных животных;

Таблица 14 – Концентрация цитокинов в ткани печени экспериментальных животных;

Таблица 15 – Концентрация SCF в крови у экспериментальных животных;

Таблица 16 – Локальная концентрация фактора стволовой клетки у интактных крыс и при токсическом повреждении печени.

Список рисунков

Рисунок 1 – Схема патогенного действия галогенированных углеводов (Мышкин В. А. и др, 2016 г.);

Рисунок 2 – Структура печени экспериментальных животных;

Рисунок 3 – Структурные изменения в печени экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения печени;

Рисунок 4 – Ki-67⁺ гепатоциты в ткани печени экспериментальных животных;

Рисунок 5 – Апоптоз гепатоцитов при токсическом повреждении печени CCl₄ на 7 сутки;

Рисунок 6 – HSP70⁺-гепатоциты в ткани печени экспериментальных животных;

Рисунок 7 – Коллагеновые волокна в ткани печени экспериментальных животных;

Рисунок 8 – Макрофаги в печени экспериментальных животных

Рисунок 9 – Тучные клетки в печени крыс при токсическом воздействии CCl₄ и на фоне введения АФГ;

Рисунок 10 – Некоторые аспекты регенерации печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекции АФГ.