

ШАФИГУЛЛИНА ЗЛАТА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена на кафедре медицинской биохимии и биофизики Института естественных наук и математики ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина» и в лаборатории морфологии и биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Данилова Ирина Георгиевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, зав. клиническим отделом инфекционной патологии ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Понежева Жанна Бетовна

доктор медицинских наук, доцент, директор научно-образовательного центра «Биомедицинские технологии» высшей медико-биологической школы ФГАОУ ВО «ЮУрГУ (НИУ)»

Цейликман Ольга Борисовна

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Екатеринбург.

Защита диссертации состоится «16» июня 2021 года в 14:00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 004.027.02 на базе ФГБУН ИИФ УрО РАН (620049, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106).

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке УрО РАН (620041, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, д. 22/20) и на сайте ИИФ УрО РАН (<http://iip.uran.ru>), с авторефератом – там же и на сайте ВАК РФ (<http://vak2.ed.gov.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2021 года.

Учёный секретарь Совета Д.004.027.02 на базе Института иммунологии и физиологии УрО РАН, доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ

И.А. Тузанкина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Цуканов В. В. и др., 2019). 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 (Лужников Е. А., Суходолова Г. Н. 2008, Забродский П. Ф. и др., 2009) 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 (Malaguarnera G., 2012). Токсическое воздействие CCl_4 , в зависимости от дозировки, способно приводить к различным повреждениям печени, включая некроз гепатоцитов, фиброз, цирроз печени и гепатокарциному (Junnila M. et al., 2000, Karakus E. et al., 2011). В связи с тем, что повреждение печени CCl_4 приводит не только к деструкции гепатоцитов перивенозной зоны, но и носит диффузный характер, (Мяделец О. Д., Лебедева Е. И., 2018) 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 (Malik R. et al., 2002, Woolbright B. L., Jaeschke H., 2018). 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 (Weber Lutz W. D. et al., 2003), 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 (Thomson A. W., Knolle P. A., 2013). Острое токсическое повреждение печени независимо от вида токсиканта всегда сопровождается макрофагальной инфильтрацией (Karlmark K. R. et al., 2009). 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 (Martinez F. O., Gordon S., 2020). 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-дигидрофталазин-1,4-диона (АФГ, аминофталгидразид натрия), идентификационный номер в PubChem 9794222. АФГ изменяет функционально-метаболическую активность макрофагов, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов (Abidov M. T. et al., 2013; Поздина В. А. и др., 2020).

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 $\text{IL-1}\alpha$, IL-18 , $\text{TNF-}\alpha$, тогда как на системном уровне (плазма крови) воспалительная реакция развивается за счет повышенной продукции $\text{TNF-}\alpha$. 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 АФГ, обладающего свойством модуляции активности моноцитов-макрофагов и антиокислительной активностью, сопровождается нормализацией биохимических показателей, а также снижением концентрации провоспалительных цитокинов $\text{TNF-}\alpha$ и IL-18 в плазме крови и уменьшением

уровня IL-6 и IFN- γ в ткани печени. Применение АФГ оказывает протективное действие на гепатоциты при воздействии CCl₄, 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 CCl₄ 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 Института 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 (USBEREIT)) (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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методические вопросы исследования. Эксперимент был выполнен на 90 половозрелых (3 месяца) крысах-самцах линии Wistar массой 180-200 г. в соответствии с принципами международных этических комитетов (Директива Совета ЕС 2010/63/ЕС), одобрен комиссией 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 этическим комитетом Института иммунологии и физиологии УрО РАН (протокол № 01/19 от 18.12.2019 г).

Для создания модели диффузного токсического повреждения печени использовали 50% масляный раствор тетрахлорметана (CCl₄, ГОСТ 20288-74, АО «ЭКОС-1»), который вводили животным экспериментальных групп однократно внутривенно в дозе

50 мг/100 г массы тела (Миронов А. Н., 2012). Выведение животных из эксперимента выполнено через 3, 7 и 14 суток после введения токсиканта.

Коррекция токсического повреждения печени у экспериментальных животных включала инъекции натриевой соли 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-диона (аминофтальгидразид 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 (Данилова И. Г. и др., 2019).

К группам с CCl_4 -воздействием и с применением АФГ были сформированы контрольные группы животных, которым вводили аналогичные дозы стерильного оливкового масла и воды для инъекций соответственно. Интактную группу составляли здоровые животные. Каждая экспериментальная группа включала 10 животных.

Животных выводили из эксперимента после двенадцатичасового голодания передозировкой золетила (15 мг/кг), предварительно взяв кровь из хвостовой вены. После проведения срединной лапаротомии у животных извлекали печень. Фрагменты печени фиксировали в десятипроцентном забуференном водном растворе формалина в течение 24 часов. После восьмичасовой промывки фрагменты органов подвергали стандартной гистологической проводке в автоматизированном тканевом процессоре Leica TP 1020 (Leica Microsystems, Германия) с последующей заливкой материала в парафин в системе Leica EG 1160 (Leica Microsystems, Германия). Срезы толщиной 3-4 мкм изготавливали на микротоме Leica SM 2000R (Leica Microsystems, Германия).

Биохимическое исследование плазмы крови крыс включало определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) (К.Ф.2.6.1.2), аспартатаминотрансферазы (АСТ) (К.Ф.2.6.1.1), щелочной фосфатазы (К.Ф.3.1.3.1.), общего билирубина, общего белка, альбумина, мочевины и креатинина. Для анализа применяли стандартные наборы реактивов фирмы Витал Диагностикс (Санкт-Петербург, Россия) на приборе DU 800 Beckman Coulter (США).

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

Морфометрические исследования печени проводили на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Оценивали индекс альтерации (%), митотический индекс (%), количество двуядерных гепатоцитов и синусоидальных эндотелиальных клеток печени в 1 мм^2 среза ($N/\text{мм}^2$). Подсчет вышеперечисленных параметров производился с использованием светового микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Германия) и программного пакета для захвата и анализа изображений Leica Application Suite при увеличении в 1000 раз.

Тучные клетки в ткани печени выявляли при окраске препаратов толуидиновым синим, подсчитывали их количество в единице площади в 20 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.

Для выявления коллагена в ткани печени проводили окрашивание гистологических срезов Picro Sirius stain kit (ab 150681) (Abcam, Великобритания), оценка площади коллагена выполнена с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 710 (ZEISS, Германия) при увеличении $\times 400$ и программы Zen 2010.

Иммуногистохимическое исследование печени проводили с использованием антител для выявления пролиферирующих гепатоцитов (Purified Mouse Anti-Human Ki67 клон B 56, BD Pharmingentm, США), макрофагов печени (F4/80 Polyclonal Antibody, PA5-21399, Thermo Fisher Scientific, США), CD3⁺, CD45⁺ клеток (Purified Mouse Anti-Rat CD3 клон G 4.18, Purified Mouse Anti-Rat CD45 клон OX-1, 1:30, BD Pharmingentm, США), HSP60- и HSP70-положительных гепатоцитов (Mouse anti shock protein 60 клон LK1, Merck Millipore, США, HSP70 (3A3): sc-32239, клон 3A3, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, США) по стандартным протоколам (Kumar G. L., Rudbeck L., 2011). Выявление Ki-67⁺-гепатоцитов, F4/80⁺, CD3⁺, CD45⁺-клеток, HSP60⁺- и HSP70⁺-гепатоцитов осуществляли непрямой пероксидазным методом. Для проверки протоколов и исключения неспецифического окрашивания проводили постановку негативного и позитивного контролей (Hewitt, 2004; Kumar G. L., Rudbeck L., 2011).

Для оценки апоптоза гепатоцитов применяли метод TUNEL (маркировка концевых участков dUTP терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы) с использованием Click-iT Plus TUNEL Assay for in situ apoptosis detection, with Alexa Fluor dyes, кат. номер C10618 (Thermo Fisher, США).

Концентрацию IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α и SCF в плазме крови и IL-1 α , IL-6, IL-10, IL-18, TNF- α , TGF- β 1, IFN- γ , SCF в ткани печени экспериментальных животных определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием прибора Lazurite Automated Elisa System (Dyplex Technologies Inc., США) по стандартным протоколам исследования. Подготовка ткани печени для ИФА включала промывку ледяным фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) с pH 7,4 и гомогенизацию с помощью системы для дезагрегации тканей BD Medimachine (Becton Dickinson, США). Далее гомогенат печени центрифугировали в течение 30 минут при 15000 оборотах в минуту при температуре +4°C в центрифуге Sigma 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Германия). Полученный супернатант использовали для исследования.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью программного обеспечения OriginPro 2018 software (OriginLab Corporation, USA) с применением непараметрического критерия Краскела-Уоллеса для множественных сравнений. Данные представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартная ошибка среднего (m). При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0.05$).

Результаты работы и их обсуждение

Механизмы регенерации гепатоцитов на ранних стадиях диффузного токсического повреждения

После внутрибрюшинного введения CCl_4 в печени экспериментальных животных были выявлены структурные изменения характерные для острого токсического гепатита. Деструктивные изменения нарастали по мере увеличения срока токсического воздействия и проявлялись в виде очаговых некрозов, анизоцитоза и анизонуклеоза гепатоцитов, наличия клеток с признаками крупнокапельной вакуольной дистрофии, полнокровия центральных вен и вен портальных трактов печени, лимфо-лейкоцитарной инфильтрации (рисунки 1).

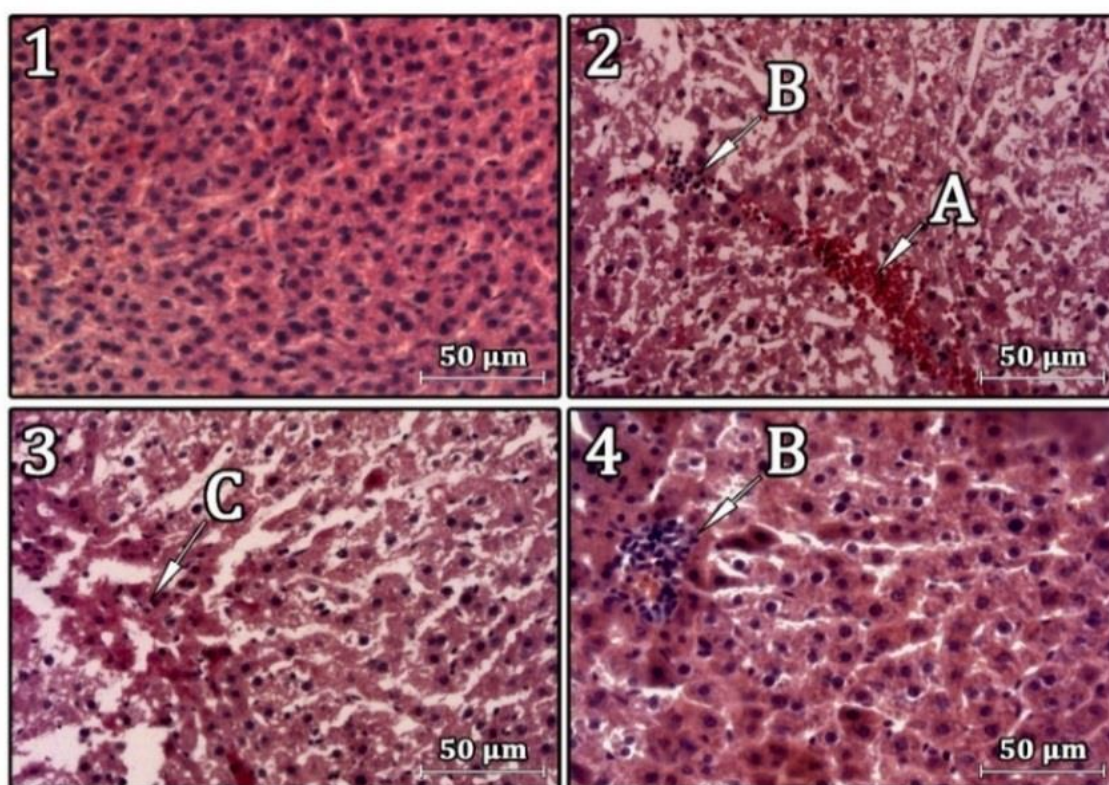


Рисунок 1 – Структура печени экспериментальных животных. Окраска гематоксилином и эозином, ув. x200

Примечание: 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.

Воздействие гепатотропного яда привело к увеличению индекса альтерации и апоптозу клеток паренхимы, что подтвердилось ростом числа TUNEL⁺-гепатоцитов с 3 по 14 сутки (рисунки 2).

Структурные изменения печени при токсическом повреждении подтверждены дисбалансом биохимических показателей (таблица 1), что выражено в развитии цитолиза, внутреннего холестаза, умеренном снижении синтетической функции печени и процесса фильтрации в почках.

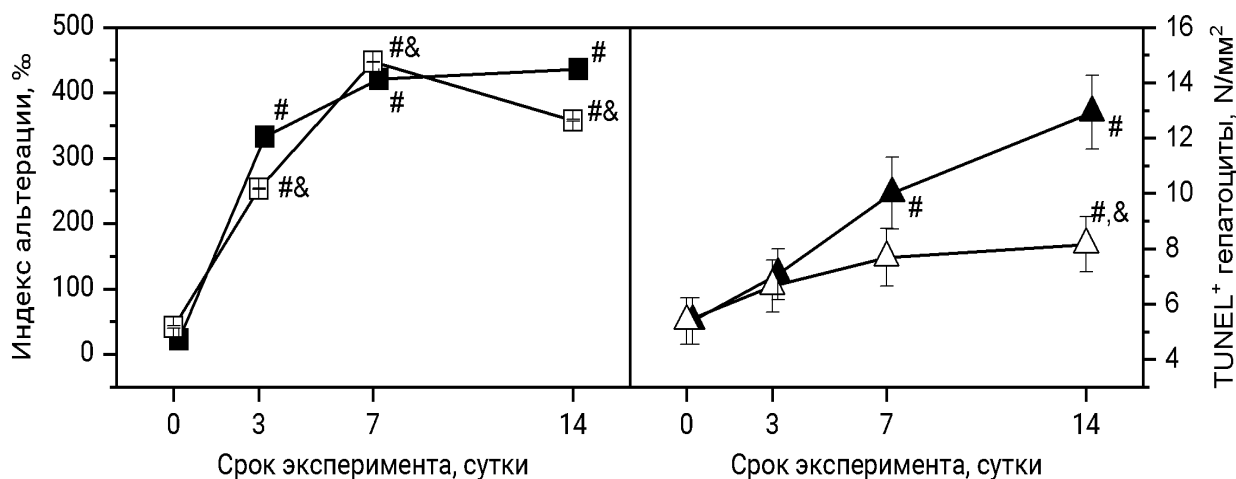


Рисунок 2 – Показатели деструктивных изменений печени экспериментальных животных при токсическом повреждении и его коррекции

Примечание: 0 сутки отображают показатели интактной группы; черный символ – токсическое действие CCl₄, белый символ – коррекция АФГ; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$).

При повреждении паренхимы печени CCl₄ активизировались адаптивно-компенсаторные механизмы. На ранние сроки после введения токсиканта усиливалась клеточная и внутриклеточная регенерация, что подтверждено увеличением митотического индекса, количества Ki-67⁺ и двуядерных гепатоцитов (рисунок 3). Данная стратегия способствовала повышению метаболической активности, выразившейся в увеличении количества гепатоцитов с содержанием гранул HSP70 на 3 сутки эксперимента (рисунок 4). 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.

На более поздних сроках диффузного токсического повреждения печени преобладал внутриклеточный тип регенерации, о чем свидетельствовало снижение митотического индекса, количества Ki-67⁺ гепатоцитов и одновременное увеличение числа двуядерных гепатоцитов (рисунок 3). Решающая роль в поддержании регенераторного потенциала клеток паренхимы печени на 7 сутки после воздействия CCl₄ принадлежала HSP60 и выражалась в увеличении количества гепатоцитов с содержанием гранул данного белка (рисунок 4). Повышенный HSP60 выступал в качестве фактора, сдерживающего избыточный апоптоз гепатоцитов, в то время как уменьшение количества HSP60⁺-клеток сопровождалось резким увеличением степени апоптоза к 14 суткам (рисунок 2).

Таблица 1 – Биохимические показатели экспериментальных животных в динамике диффузного токсического повреждения и его коррекции, М±m

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

Примечание: результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, p <0,05) и с группой CCl₄ (&, p <0,05).

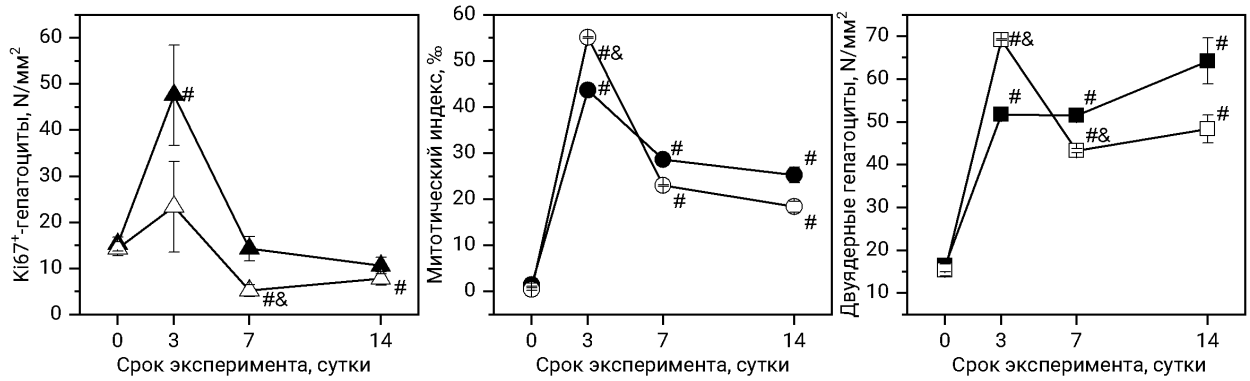


Рисунок 3 – Показатели регенерации печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекции

Примечание: 0 сутки отображают показатели интактной группы; черный символ – токсическое действие CCl₄, белый символ – коррекция АФГ; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$).

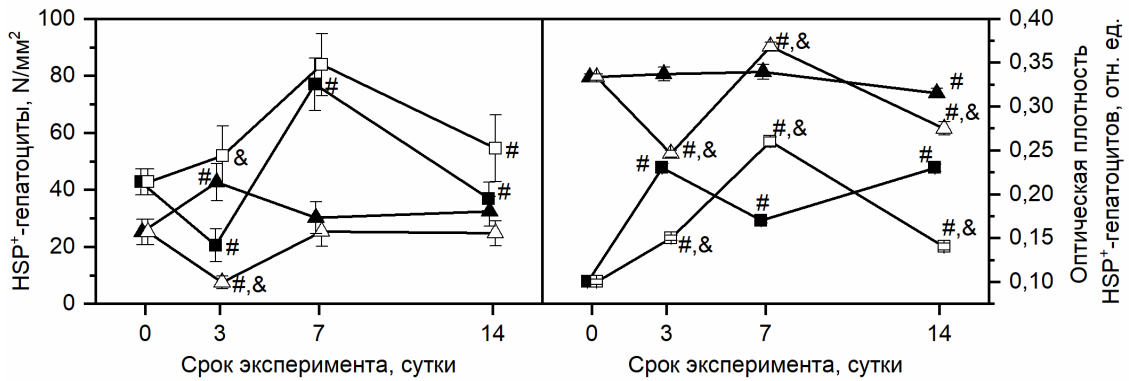


Рисунок 4 – Белки теплового шока (HSP) в печени крыс при токсическом повреждении CCl₄ и на фоне его коррекции АФГ

Примечание: 0 сутки отображают показатели интактной группы; черный символ – токсическое действие CCl₄, белый символ – коррекция АФГ; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$); (■□) – HSP60, (▲△) – HSP70.

Угнетение пролиферации клеток паренхимы печени на 14 сутки после воздействия токсиканта, а также усиление некротической, апоптотической гибели гепатоцитов привело к структурным изменениям стромы и процессам фиброгенеза, что выражено в увеличении площади коллагена в 5 раз (*рисунок 5*) по сравнению с показателями интактных животных.

Одним из механизмов, направленных на регенерацию печени в условиях токсического повреждения, является реакция клеточного компонента стромы. Так, при действии гепатотропного яда было зафиксировано увеличение числа тучных клеток и снижение их оптической плотности (*рисунок 6*), свидетельствующей о высвобождении содержимого во внеклеточное пространство. За счет секреции гистамина и триптазы тучные клетки стимулируют пролиферацию фибробластов и синтез коллагена. Данное заключение

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

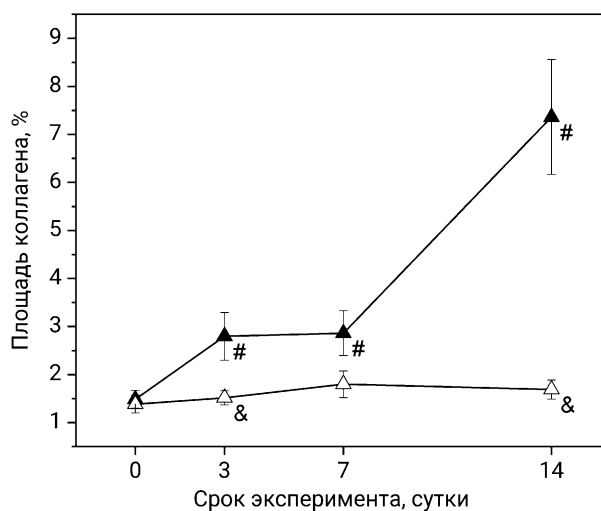


Рисунок 5 – Изменение площади коллагена в печени экспериментальных животных
Примечание: 0 сутки отображают показатели интактной группы; черный символ – токсическое действие CCl₄, белый символ – коррекция АФГ; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$).

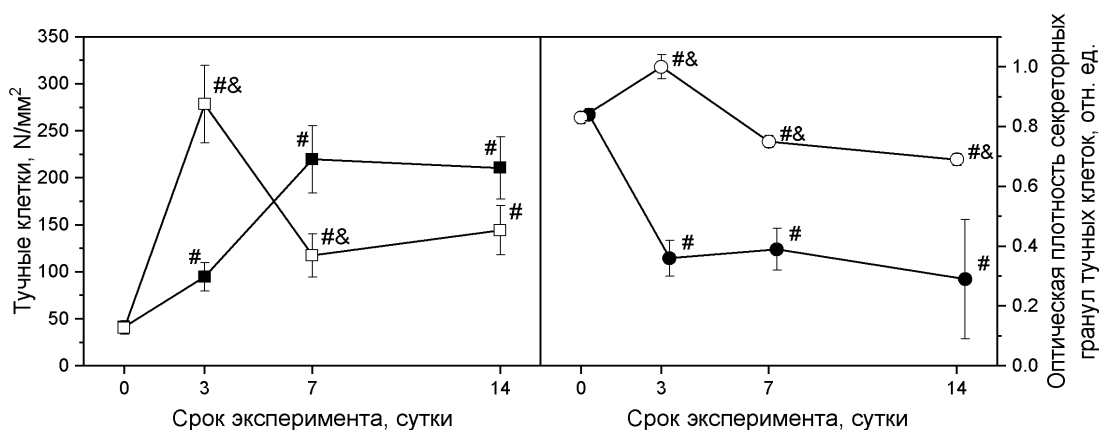


Рисунок 6 – Тучные клетки в печени экспериментальных животных в динамике диффузного токсического повреждения и его коррекции

Примечание: 0 сутки отображают показатели интактной группы; черный символ – токсическое действие CCl₄, белый символ – коррекция АФГ; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$).

Процессы регенерации поврежденной печени сопровождались миграцией иммунокомпетентных клеток. Количественная оценка CD45⁺ и CD3⁺ клеток показала, что при интоксикации CCl₄, в ранние сроки, возрастала лимфо-лейкоцитарная инфильтрация паренхимы печени и периваскулярных областей (рисунок 7). Данные изменения свидетельствуют об активном ответе клеток иммунной системы на действие токсиканта и позволяют судить об интенсивности воспалительного процесса в поврежденном органе.

типы непаренхиматозных клеток печени, направленной на нейтрализацию самого CCl_4 и токсических продуктов воспалительной реакции.

Изменение количественного соотношения непаренхиматозных клеток печени, включая макрофаги, синусоидальные эндотелиальные клетки, тучные клетки, $CD45^+$, $CD3^+$, привело к изменению концентрации цитокинов как на системном, так и на локальном уровне. Установлено, что в ответ на диффузное токсическое повреждение печени на системном уровне, в плазме крови, увеличивалось содержание провоспалительного цитокина $TNF-\alpha$ и подавлялась выработка $IL-10$, при этом концентрация провоспалительных цитокинов $IL-6$ и $IL-18$ оставалась неизменной (рисунок 9).

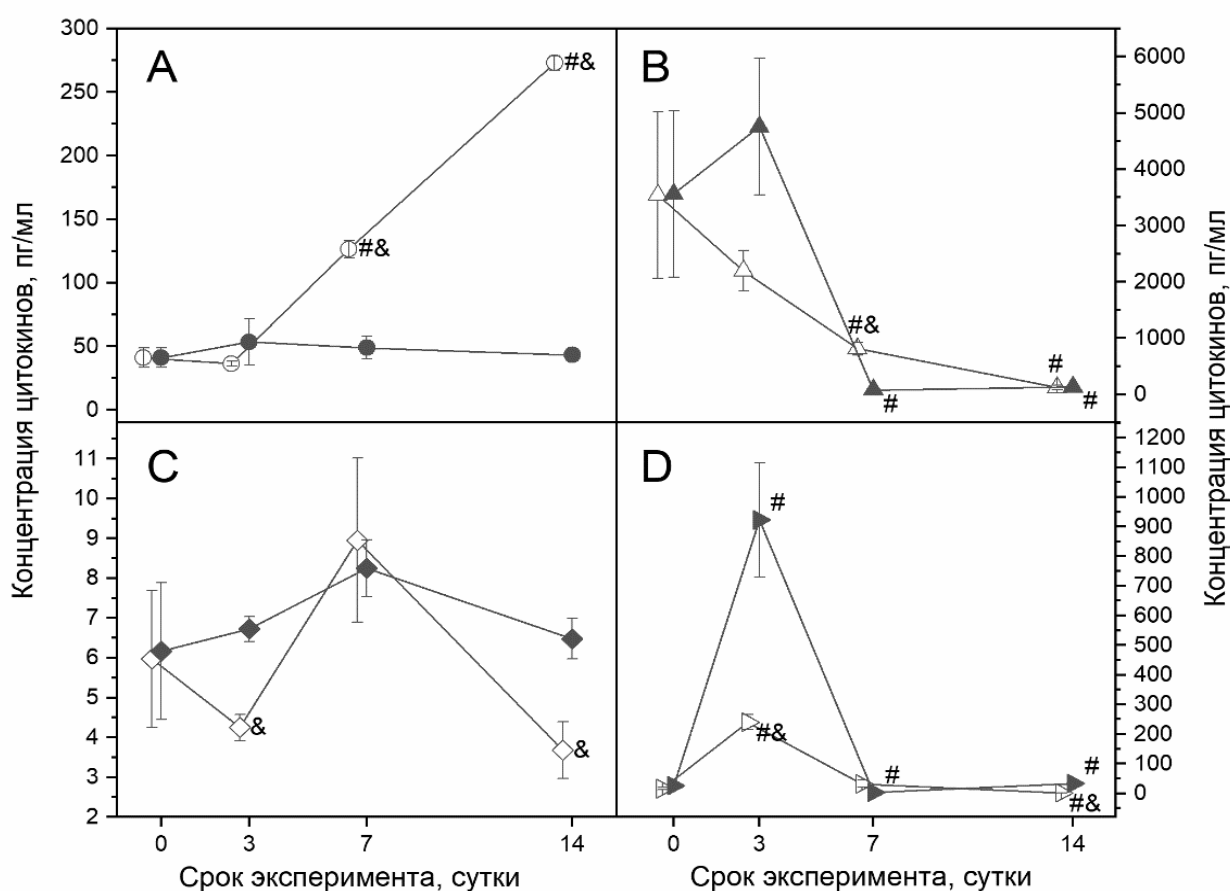


Рисунок 9 – Концентрация цитокинов в плазме крови (пг/мл) через 3-14 суток после CCl_4 -интоксикации крыс (черные символы) и применения АФГ (белые символы)
 Примечание: А: (● ○) – $IL-6$; В: (▲ △) – $IL-10$; С: (◆ ◇) – $IL-18$; D: (▶ ▷) – $TNF-\alpha$; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl_4 (&, $p < 0,05$).

На локальном уровне, в ткани печени, степень вовлеченности цитокинов в регуляторный ответ изменялась в зависимости от срока токсического воздействия. Повышенная концентрация $IFN-\gamma$ и $IL-6$ на 3 сутки (рисунок 10), по сравнению с другими провоспалительными цитокинами, вероятно способствовала миграции лейкоцитов в очаг повреждения. В то время как снижение локальной концентрации данных цитокинов в более отдаленные сроки эксперимента сдерживало избыточную инфильтрацию поврежденной

ткани лимфоидными элементами. К 7 суткам эксперимента было зафиксировано увеличение уровня IL-18 (рисунок 10), который экспрессируется в основном макрофагами и как известно, может стимулировать продукцию IL-1 и TNF- α . Увеличение уровня противовоспалительного цитокина IL-10 к 14 суткам эксперимента сопровождалось снижением концентрации IL-6 (рисунок 10).

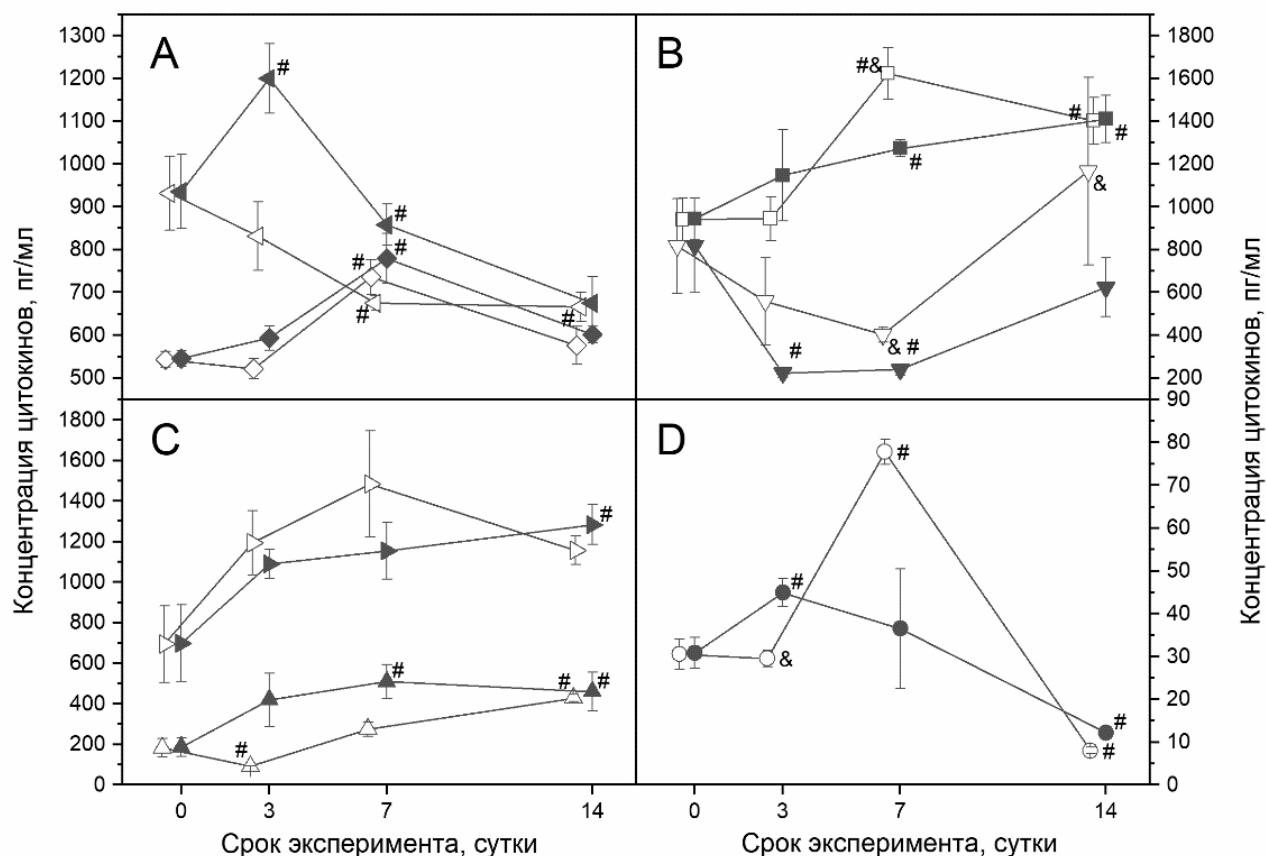


Рисунок 10 – Концентрация цитокинов в ткани печени (пг/мл) через 3-14 суток после CCl₄-интоксикации крыс (черные символы) и применения АФГ (белые символы)
 Примечание: А: (\blacktriangle \triangleleft) – IFN- γ , (\blacklozenge \diamond) – IL-18; В: (\blacktriangledown \triangleright) – TGF- β , (\blacksquare \square) – IL-1 α ; С: (\blacktriangle \triangle) – IL-10, (\blacktriangleright \triangleright) – TNF- α , D: (\bullet \circ) – IL-6; результаты статистически значимы по сравнению с интактной группой (#, p < 0,05) и с группой CCl₄ (&, p < 0,05).

Повреждение печени сопровождалось выбросом фактора стволовой клетки (SCF) в кровь, предположительно, в результате повышенного синтеза данного цитокина гепатоцитами и печеночными макрофагами, что необходимо для привлечения стволовых клеток из костного мозга к регенерирующему органу. Высокий уровень SCF в плазме крови сохранялся и на отдаленные сроки после воздействия токсиканта, при этом его локальная концентрация не изменялась (рисунок 11).

Описанные выше процессы, отражающие особенность локальных механизмов регенерации печени на ранних сроках диффузного токсического повреждения, представлены на заключительной схеме (рисунок 13).

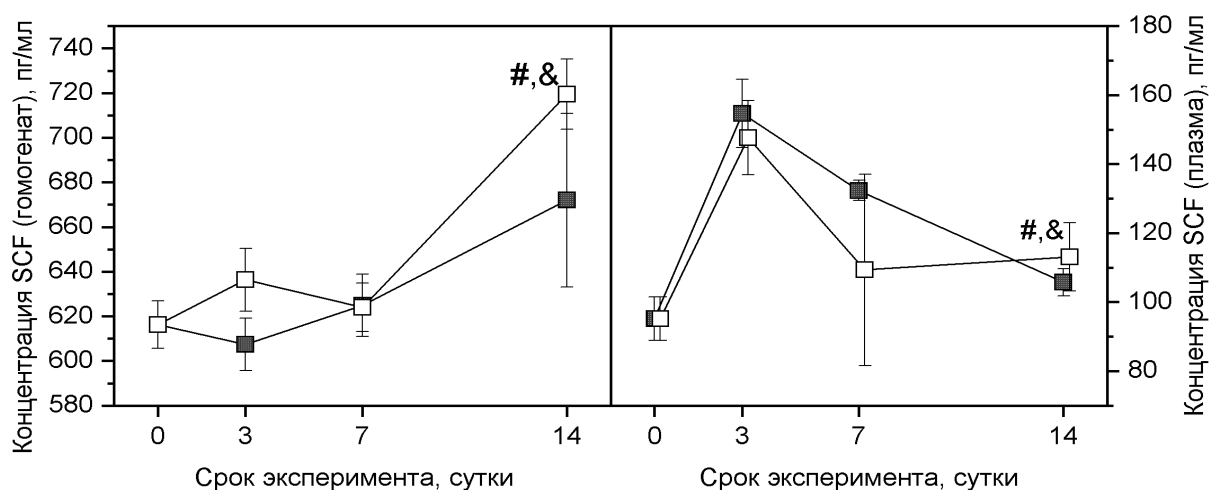


Рисунок 11 – Концентрация фактора стволовой клетки в плазме крови и ткани печени через 3-14 суток после CCl₄-интоксикации крыс (черные символы) и применения АФГ (белые символы)

Примечание: статистически значимые различия по сравнению с интактной группой (#, $p < 0,05$) и с группой CCl₄ (&, $p < 0,05$).

Влияние модуляции активности макрофагов на регенерацию печени при диффузном токсическом повреждении

Признание роли макрофагов в регенерации и их вовлеченность в регуляторные процессы при токсическом повреждении печени, продемонстрированная в данном исследовании, позволяет рассматривать данные клетки в качестве перспективной мишени для новых терапевтических подходов в гепатологии. На сегодняшний день в доклинических исследованиях применяются такие стратегии как, стимуляция поляризации / перепрограммирование макрофагов, ингибирование активации клеток Купфера, ослабление миграции моноцитов. Инструментом для воздействия на макрофаги может быть химическое вещество АФГ, обладающий противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами, фармакологические эффекты которого обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов, восстанавливать их антигенпрезентирующую и секреторную функции (Данилова И. Г. и др., 2020).

На фоне применения АФГ в условиях токсического повреждения печени отмечалось увеличение количества макрофагов на 3 сутки, также возрастало число синусоидальных эндотелиальных клеток (*рисунок 8*), что сопровождалось ростом показателей клеточной и внутриклеточной регенерации (*рисунок 3*). В более поздние сроки эксперимента воздействие на макрофаги приводило к повышению метаболической активности клеток паренхимы (возрастало количество HSP60⁺-гепатоцитов; *рисунок 4*), уменьшению выраженности деструктивных изменений паренхимы (*рисунок 12*), что проявлялось в снижении индекса альтерации и апоптоза гепатоцитов (*рисунок 2*).

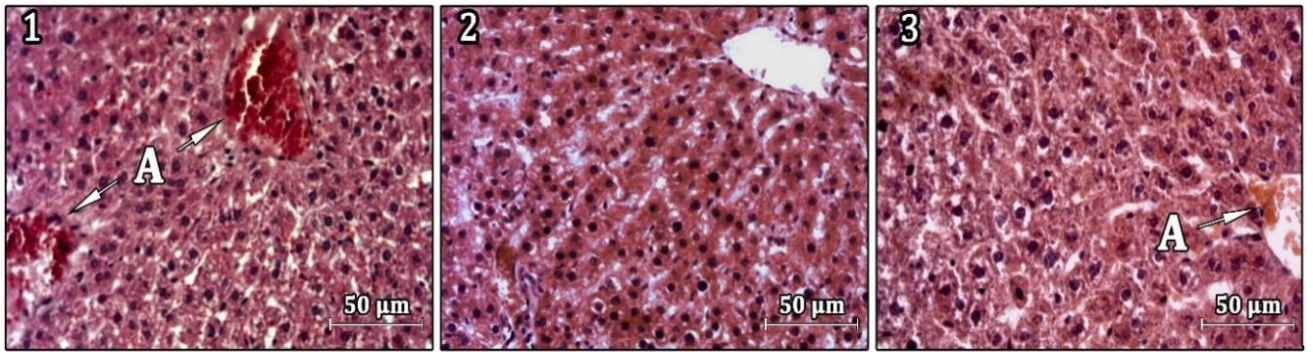


Рисунок 12 – Структурные изменения в печени экспериментальных животных при коррекции токсического повреждения печени. Окраска гематоксилином и эозином, ув. x200

Примечание: 1 – CCl₄+АФГ, 3 сутки; 2 – CCl₄+АФГ, 7 сутки, 3 – CCl₄+АФГ, 14 сутки; А – полнокровие.

Воздействие АФГ на макрофаги при токсическом повреждении печени оказывало мембраностабилизирующее действие на гепатоциты, уменьшало выраженность цитолиза, холестаза и нормализовало белоксинтетическую функцию печени (*таблица 1, рисунок 13*).

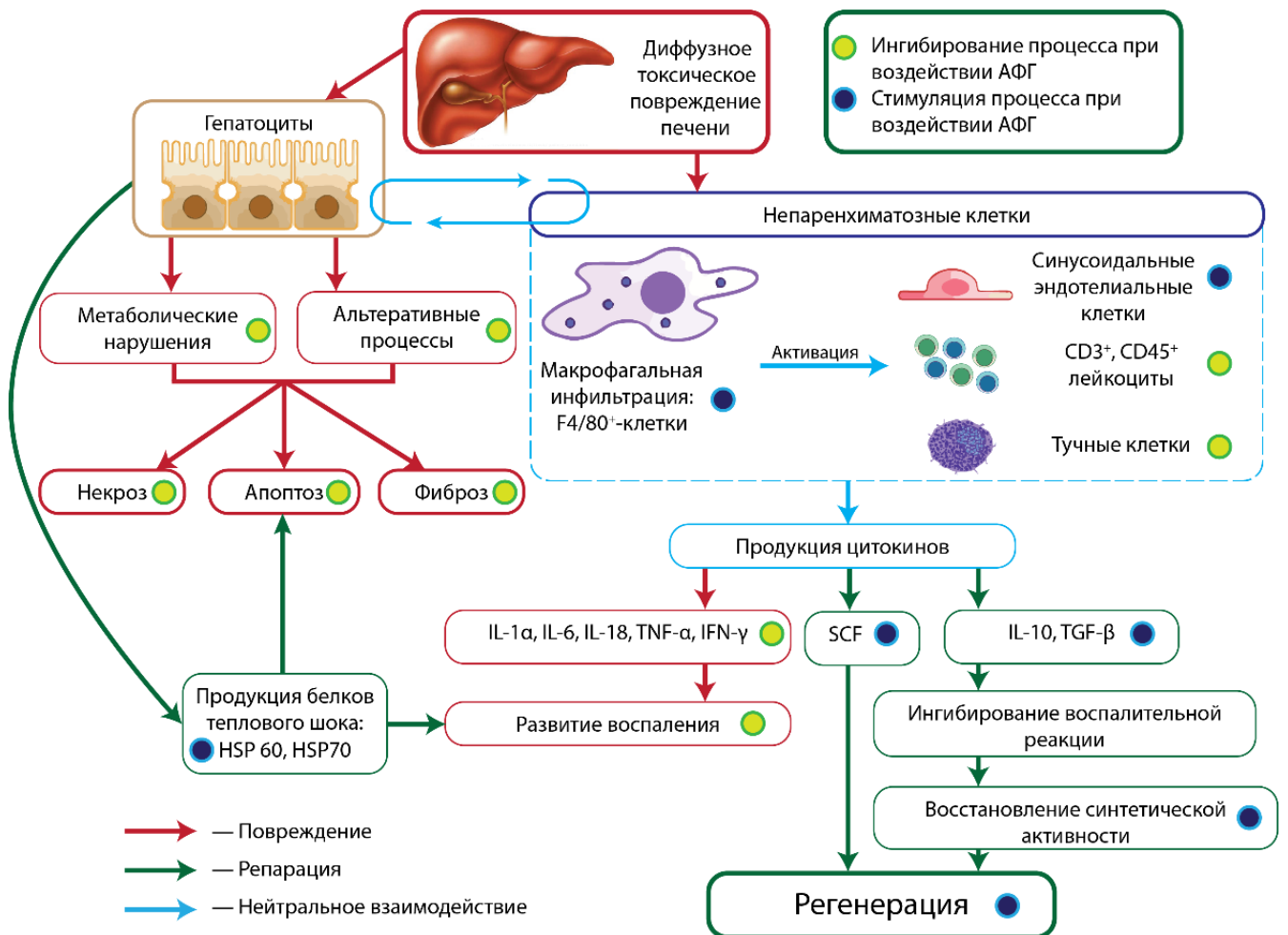


Рисунок 13 – Некоторые аспекты регенерации печени при диффузном токсическом повреждении и его коррекции АФГ

На ранних этапах резко повышался регенераторный потенциал клеток паренхимы, в более поздние сроки уменьшалось количество и секреторная активность тучных клеток (*рисунок 6*), CD3⁺ и CD 45⁺ клеток (*рисунок 7*), снижалась концентрация провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-18 в крови (*рисунок 9*) и IL-6, IFN- γ в ткани печени (*рисунок 10*), нормализовался системный уровень SCF, повышалась его локальная концентрация (*рисунок 11*), что в итоге способствовало снижению воспалительной реакции и процесса фиброгенеза.

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 CCl₄-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 CCl₄.
4. При диффузном токсическом повреждении в ткани печени иммунный ответ обусловлен увеличением концентрации IL-1 α , IL-18, TNF- α , IL-10, тогда как в плазме крови отмечается повышенная продукция TNF- α ; 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 TNF- α , IL-18 в плазме крови и IL-6, IFN- γ 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.

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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ для опубликования результатов диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук и/или индексируемые в международных базах цитирования Scopus, Web of Science и PubMed

1. 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 (Web of Science, IF = 3, 943, Q1; Scopus).
2. **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 (Scopus).
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 (в перечне ВАК; РИНЦ, IF = 0,156).
4. Иммунопатофизиологические аспекты действия тетрахлорметана / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, В.Г. Сенцов // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2020 – Т. 21. – С. 570–578 (в перечне ВАК; РИНЦ, IF = 0,174).
5. 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 (Scopus; в перечне ВАК; РИНЦ, IF = 0,735).
6. 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 (EBSCO Publishing; ВАК, РИНЦ, IF = 0,315).
7. 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 (PubMed; РИНЦ, IF = 0,670).
8. **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 (EBSCO Publishing; ВАК, РИНЦ, IF = 0,315).

9. 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 (PubMed; РИНЦ, IF = 0,670).

Публикации в прочих изданиях

10. **Шафигуллина, З.А.** Иммунологические механизмы регенерации печени при действии тетрахлорметана и метод их коррекции / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, В.Г. Сенцов // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием (Пермь, 13–15 мая 2019 г.). – Пермь, 2019. С. 276–278 (РИНЦ).
11. **Шафигуллина, З.А.** Патофизиологические механизмы регенерации печени при токсическом повреждении / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова // Путь в науку: IX научно-практ. конф. с междунар. участием (Москва, 30 октября 2020 года): сб. тез. – Москва, 2020. С. 42.
12. **Шафигуллина, З.А.** Аминофталгидразид как стимулятор продукции фактора стволовой клетки и регенераторных процессов при токсическом повреждении печени / **З.А. Шафигуллина**, И.Г. Данилова, М.Т. Абидов // Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии: материалы очных докл. Междунар. науч. конф. (18–21 ноября 2020 г., Екатеринбург). – Екатеринбург, 2020. С. 954–956.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
АФГ	натриевая соль 5-амино-2,3-дигидрофалазин-1,4-диона
ИФА	иммуноферментный анализ
кДа	килодальтон
отн. ед.	относительные единицы
CCl ₄	тетрахлорметан, четыреххлористый углерод
CD (cluster of differentiation)	кластер дифференцировки
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
N/мм ²	штук на мм ² паренхимы органа
PBS (phosphate-buffered saline)	фосфатно-солевой буфер
SCF (stem cell factor)	фактор стволовой клетки
TGF- β 1 (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)	маркировка концевых участков dUTP терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы

ШАФИГУЛЛИНА ЗЛАТА АЛЕКСАНДРОВНА

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

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук