

ВЛИЯНИЕ РЕТИНОЛА НА РАЗВИТИЕ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА У КРЫС

КОНДРАТОВИЧ И.А., АНДРЕЕВ В.П., КРАВЧУК Р.И., ГУЛЯЙ И.Э., ШАЛЕСНАЯ С.Я., ЦЫРКУНОВ В.М.

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №6. – С. 23-34.

THE EFFECT OF RETINOL ON THE DEVELOPMENT OF THIOACETAMIDE-INDUCED FIBROSIS IN RATS

KONDRATOVICH I.A., ANDREEV V.P., KRAVCHUK R.I., GULYAI I.E., SHALESNAYA S.Ya., TSYRKUNOV V.M.

Grodno State Medical University, Grodno, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(6):23-34.

Резюме.

Ведущую роль в развитии фиброза печени играют перисинусоидальные липоциты, запасрующие в своих липидных каплях ретинол и его производные.

Цель – оценить влияние ретинола на развитие тиацетамид (ТАА)-индуцированного ФП у крыс.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 48 крысах-самцах, представленных 6 группами. Раствор (2%) ТАА в дозе 10 мл/кг вводили внутривентрально через день. Масляный раствор ретинола (800 МЕ/кг) на подсолнечном масле вводили внутрь один раз в день. Две контрольные группы получали физраствор (1) и подсолнечное масло (2). Проводилась световая и электронная микроскопия полученных полу- и ультратонких срезов ткани печени, морфометрически оценивалось относительное содержание соединительной ткани в препаратах печени, определялось содержание ретинола в плазме крови и печени.

Результаты. Морфологические исследования печени контрольных животных выявили наличие типичной балочной структуры. Через 4 недели после ежедневного введения ретинола балочная структура печени сохранялась, но отмечена лимфогистиоцитарная инфильтрация портальных трактов и диссеминированная внутридольковая инфильтрация; встречались воспалительные очаги с большим числом клеточных элементов; достоверно увеличивалось количество соединительной ткани. После 4-х недель введения ТАА наблюдалась резко выраженная воспалительная реакция в области центральных вен с проникновением в дольку, возрастала степень фиброза с формированием тонких неполных септ. 4-недельное введение ретинола после 4-недельного воздействия ТАА приводило к усилению фиброзных процессов в печени по сравнению с животными, получавшими только ТАА. 8-недельное введение ТАА с 4-недельным введением ретинола привело к 14-кратному увеличению степени фиброза по сравнению с контрольными животными.

Закключение. Применение ретинола в используемой экспериментальной дозе стимулирует процесс фиброобразования в печени крыс.

Ключевые слова: крысы, тиацетамид, фиброз печени, перисинусоидальные липоциты, ретинол.

Abstract.

Perisinusoidal lipocytes, which store retinol and its derivatives in their lipid droplets, play a leading role in the development of liver fibrosis (LF).

Objectives. To assess the effect of retinol on the development of thioacetamide (TAA) -induced LF in rats.

Material and methods. The experiment was conducted on 48 male rats, represented by 6 groups. A 10 ml/kg TAA solution (2%) was administered intraperitoneally every other day. A retinol oil solution (800 IU/kg) in sunflower oil was given once a day. Two control groups received saline solution (1) and sunflower oil (2). Light and electron microscopy of the obtained semi- and ultrathin sections of the liver tissue was performed, the relative content of the connective tissue in the

liver preparations was morphometrically evaluated, the content of retinol in blood plasma and the liver was determined. Results. Morphological studies of the control animals liver revealed the presence of a typical beam structure. 4 weeks after daily administration of retinol, the beam structure of the liver persisted, but lymphohistiocytic infiltration of portal tracts and disseminated intralobular infiltration were noted; there were inflammatory foci with a large number of cellular elements; the amount of the connective tissue significantly increased. After 4 weeks of TAA administration, a pronounced inflammatory reaction was observed in the central vein region, with the penetration into the lobe, the degree of fibrosis increased with the formation of thin incomplete septa. 4-week administration of retinol after 4-week TAA exposure led to increased fibrotic processes in the liver compared to animals treated with TAA alone. 8-week administration of TAA with 4-week administration of retinol resulted in 14-fold increase in the degree of fibrosis compared to control animals. Conclusions. The application of retinol in the used experimental dose stimulates the fibrosis process in rats' liver.

Key words: rats, thioacetamide, liver fibrosis, perisinusoidal lipocytes, retinol.

Фиброз печени (ФП) является осложнением болезней печени, приводящим к развитию печеночной недостаточности, портальной гипертензии, цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. ФП печени характеризуется повышенным секретированием измененных белков экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), способствующих хроническому повреждению печени [1].

Ведущую роль в синтезе и деградации компонентов ЭЦМ выполняют перисинусоидальные липоциты (ПСЛ, HSC), которые в здоровой печени находятся в покое, постоянно экспрессируя определенное количество ЭЦМ и несколько типов металлопротеиназ, участвующих в его деградации, что обеспечивает нормальный количественный и качественный состав компонентов перисинусоидального пространства (рис. 1) [2].

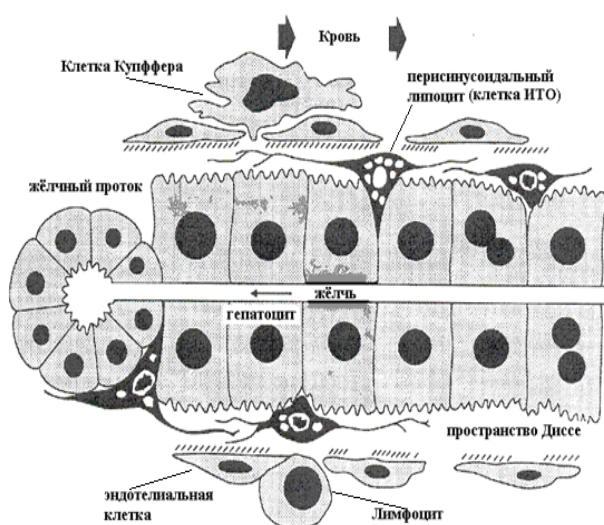


Рисунок 1 – Схема расположения ПСЛ в перисинусоидальном пространстве Диссе, интернет-ресурс [3].

Около 80% витамина А и до 80% всех ретиноидов в организме человека депонировано в жировых каплях ПСЛ. Эфиры ретинола в составе хиломикронов попадают в гепатоциты, где конвертируются в ретинол, образуя комплекс витамина А с ретинолсвязывающим белком (РСБ), который секретируется в перисинусоидальное пространство, откуда депонируется клетками [3, 4].

ПСЛ относятся к мезенхимальному типу и при повреждении паренхимы печени в процессе мезенхиально-эпителиального перехода трансдифференцируются из «покоящегося» фенотипа (qHSC) в «активированный» (aHSC) миофибробластоподобный фенотип, ответственный за отложение коллагена в ткани печени [5]. Активированные aHSC синтезируют большие количества белков ЭЦМ (коллаген I и III типов) и играют ключевую роль в разрешении повреждения печени. В то же время неконтролируемая активация ПСЛ является основным фактором развития ФП [6].

Количество aHSC явно связано с тяжестью фиброза. Потеря липидных капель из ПСЛ, содержащих ретиноиды, долгое время считалась признаком их трансдифференцировки в активированные миофибробласты, которые вызывают ФП. Показано, что ПСЛ, активированные в культуре и после повреждения печени *in vivo*, сохраняют свои липидные капли, которые становятся меньше и многочисленнее, причем снижение концентрации ретиноидов в каплях происходит только после начала клеточной трансдифференцировки [7].

Разработка методов коррекции ФП остается актуальной задачей. Для оценки влияния антифибротических средств животные модели по сравнению с клиническими исследованиями имеют несколько преимуществ. Модель ФП, вызванного тиацетамидом (ТАА), используют для

изучения регрессии фиброза из-за его воспроизводимости, простоты использования и надлежащего моделирования механизмов, вовлеченных в ФП человека. Окислительный стресс, активные формы кислорода играют основную роль в инициации фиброза за счет секреции профибротических факторов [8].

Предполагается, что витамин А (ретинол) и его производные (ретиноиды) играют регулируемую роль в отношении активации и трансформации ПСЛ в процессе фиброгенеза. Активация ПСЛ сопровождается потерей характерных для них липидных включений, однако неясно, является ли их потеря стимулом для активации ПСЛ. Многочисленные исследования *in vitro* показали, что активация покоящихся ПСЛ делящимися миофибробластоподобными клетками может подавляться добавлением в среду ретинола и ретиноевой кислоты [9]. Было показано, что дача с пищей крысам ретинола в дозе 15 мг/кг два раза в неделю подавляло экспериментальный CCl₄-индуцированный ФП [10], а β -каротин (провитамин А), снижал тяжесть вызванного CCl₄ воспаления и ФП [11].

В других исследованиях установлено, что витамин А с добавлением этанола вызывал фиброз и цирроз печени у крыс [12], а аналог ретиноевой кислоты ускорял индуцированный сывороткой крови ФП у крыс за счет усиления трансформирующего фактора роста (TGF)- β , повышая уровни печеночного коллагена [13]. Было высказано предположение, что дефицит витамина А с низким уровнем ретиноловых эфиров в ПСЛ способствует развитию ФП индуцированного CCl₄ [14].

Из-за противоречивости имеющихся данных нами исследовано влияние ретинола на развитие у крыс ФП индуцированного ТАА (*in vivo*).

Цель исследования – оценить влияние ретинола на развитие ТАА-индуцированного ФП у крыс.

Материал и методы

Эксперимент проведен на 48 крысах-самцах, которые были разделены на 6 групп.

В 1-й группе (контроль, n=8) вводился 0,9% раствор NaCl внутрибрюшинно (в/б) в дозе 10 мл/кг через день в течение 8 недель. Во 2-й группе (n=9) раствор NaCl вводился как в 1-й группе + с 5-й по 8-ю недели животные получали внутрь масляный раствор ретинола в дозе 800 МЕ/кг в

виде смеси с подсолнечным маслом (для разведения) один раз в день. В 3-й группе (n=8) вводился 2% раствор ТАА в/б в дозе 10 мл/кг через день в течение 4-х недель. В 4-й группе (n=8) раствор ТАА вводился как в 3-й группе + с 5-й по 8-ю неделю – 0,9% раствор NaCl в/б в той же дозе и в эти же сроки – подсолнечное масло в эквивалентном объеме. В 5-й группе (n=8) вводился 2% раствор ТАА в той же дозе в течение 4-х недель + с 5-й по 8-ю неделю – 0,9% раствор NaCl в/б в той же дозе + перорально масляный раствор ретинола 800 МЕ/кг, 1 раз в день в виде смеси с подсолнечным маслом. В 6-й группе (n=7) вводился 2% раствор ТАА в/б в дозе 10 мл/кг на протяжении 8-ми недель + с 5-й по 8-ю неделю – перорально масляный раствор ретинола 800 МЕ/кг в виде смеси с подсолнечным маслом один раз в день.

Доза ретинола 800 МЕ/кг соответствовала средней «терапевтической» для человека, не вызывающей токсических эффектов [15].

Для гистологического исследования образцы печени фиксировали в 10% забуференном формалине, обезжировали в растворах этанола возрастающей концентрации и заливали в парафин. Срезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилин-эозином (для оценки общей гистологической картины) и по Маллори (для оценки степени фиброза) согласно общепринятым методикам [16, 17]. Для визуализации ПСЛ методом световой микроскопии полутонкие срезы последовательно окрашивали азур II-основным фуксином.

Определение относительного содержания соединительной ткани осуществляли на микрофотографиях гистологических препаратов с использованием программы ImageJ (программа свободного доступа).

Электронно-микроскопическое изучение проводили в образцах биоптатов печени, фиксированных 1% раствором четырехоксида осмия на 0,1 М буфере Миллони, рН 7,4, при +4°C в течение 2 часов [4, 18]. После дегидратации в спиртах восходящей концентрации и ацетоне образцы заливали в аралдитовую эпоксидную смолу [4, 19]. Из полученных блоков на ультрамикротоме LeicaEM UC 7 (Германия) готовили полутонкие срезы (400 нм), окрашивали метиленовым синим и изучали в световом микроскопе. Ультратонкие срезы (35 нм) контрастировали 2% раствором уранилацетата на 50% метаноле и цитратом свинца по E.S. Reynolds [4, 20]. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) при увеличениях 10 000-60 000 при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus MegaView III (Германия) и программы для обработки изображений iTEM (Olympus, Германия).

Содержание ретинола и токоферола в плазме крови и ткани печени определяли методом S.L. Taylor (1976) [21], результаты выражались в мкмоль/л и мкмоль/г соответственно.

Проведение эксперимента одобрено комитетом по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Статистическую обработку данных проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса и медианного теста с поправкой Бонферони для независимых выборок.

Результаты

Морфологические исследования печени

контрольных животных выявили наличие типичной балочной структуры. Вокруг портальных триад отмечены тонкие прослойки соединительной ткани (рис. 2А).

Местами внутри дольки наблюдалось скопление нескольких круглоклеточных элементов с преобладанием лимфоцитов. Гепатоциты в пределах дольки отличались равномерной окраской цитоплазмы, 20-30% были двужядерными. При этом ядра гепатоцитов характеризовались примерно одинаковыми размерами.

Через 4 недели после ежедневного введения ретинола (2-я группа) балочная структура печени животных сохранялась. Как и в 1-й группе, во всех участках дольки цитоплазма равномерно окрашивалась, ядра гепатоцитов были примерно одинакового размера (рис. 2Б). Некоторые отличия с контрольными животными заключались в более выраженной лимфогистиоцитарной ин-

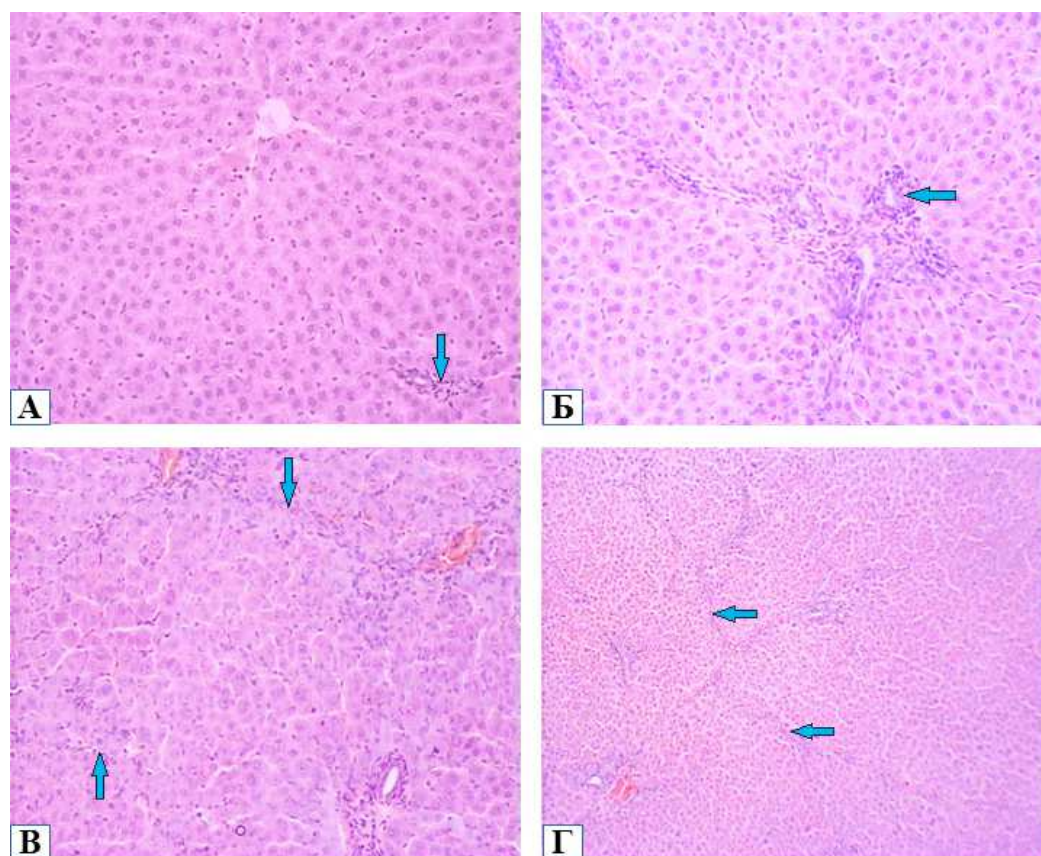


Рисунок 2 – Изменения структуры печени групп животных: А – группа 1 (контроль) – тонкая прослойка соединительной ткани вокруг портальной триады (стрелка). Ув. $\times 100$; Б – группа 2 – лимфогистиоцитарная инфильтрация портального тракта (стрелка) и диссеминированная внутридольковая инфильтрация, более выраженная по сравнению с контрольными животными. Ув. $\times 100$; В – группа 3 – выраженная воспалительная реакция (стрелки) преимущественно в области центральных вен с проникновением в дольку. Ув. $\times 100$; Г – группа 4 – тонкие соединительнотканые септы (стрелки), преимущественно неполные. Ув. $\times 40$.

Таблица 1 – Относительное содержание соединительной ткани ($\text{мкм}^2/100 \text{ мкм}^2$ среза печени) или объемная доля соединительной ткани в печени (%)

Группы	n	M \pm m
Группа 1	6	1,03 \pm 0,11*
Группа 2	7	1,67 \pm 0,20*
Группа 3	6	4,10 \pm 0,53**
Группа 4	7	4,39 \pm 0,45**
Группа 5	7	5,16 \pm 0,25**
Группа 6	7	14,17 \pm 1,78*

Примечание: * – достоверное различие со всеми другими группами ($p < 0,05$); ** – достоверное различие с 1, 2 и 6 группами ($p < 0,05$).

фильтрации части портальных трактов и диссеминированной внутридольковой инфильтрации (рис. 2Б); встречались воспалительные очаги с большим числом клеточных элементов.

Морфометрический анализ препаратов, окрашенных по Маллори, показал достоверное увеличение количества соединительной ткани в печени животных 2-й группы, составивших 162% по сравнению с контролем (табл. 1).

В печени животных 3-й группы наблюдалась резко выраженная воспалительная реакция, преимущественно в области центральных вен, с проникновением в дольку до портальных трактов (рис. 2В). Окраска по Маллори показала возрастание степени фиброза с формированием тонких неполных септ, обычно не достигающих портальных трактов. Морфометрический анализ выявил 4-кратное увеличение количества соединительной ткани по сравнению с контролем (табл. 1).

В 4-й группе после 4-недельного введения подсолнечного масла на фоне месячного воздействия ТАА отмечена меньшая выраженность воспалительной реакции в области центральных вен и портальных трактов и внутри дольки по сравнению с 3-й группой (рис. 2Г). Оценка препаратов по Маллори показала сходную с 3-й группой степень фиброза с формированием тонких неполных соединительнотканых септ (табл. 1).

У животных 5-й группы 4-недельное введение ретинола после 4-недельного воздействия ТАА приводило к усилению фиброзных процессов по сравнению с животными, получавшими только ТАА (табл. 1). Регистрировалась умеренная гиперплазия соединительной ткани с образованием тонких неполных (не достигающих портальных трактов), а также полных порто-портальных и порто-центральных фиброзных септ (рис. 3А). Разрастание соединительной ткани приводило к формированию ложных долек, вну-

три которых происходила дезорганизация печеночных балок, гепатоциты отличались полиморфизмом, содержали ядра различных размеров, в основном мелкие (рис. 3Б).

Морфометрия препаратов, окрашенных по Маллори, показала 5-кратное увеличение количества соединительной ткани по сравнению с контролем, в 1,2 раза по сравнению с 4-й группой (табл. 1). В то же время воспалительная реакция в области центральных вен и портальных трактов была выражена в меньшей степени по сравнению с животными 3-й группы. При этом наблюдалась выраженная диссеминированная внутридольковая инфильтрация (рис. 3В).

Печень всех (100%) животных 6-й группы была изменена макроскопически, по сравнению с животными из контрольной группы (рис. 4). В органе наблюдалось выраженное разрастание соединительной ткани с образованием массивных порто-центральных и порто-портальных полных фиброзных септ, что приводило к формированию большого количества ложных долек (рис. 3Г).

Морфометрическая оценка препаратов 6-й группы, окрашенных по Маллори, показала почти 14-кратное возрастание степени фиброза по сравнению с контрольными животными (табл. 1). В этой связи в синусоидных капиллярах регистрировались активированные ПСЛ (рис. 5А), большая часть из которых трансформировалась в миофибробласты, которые в большом количестве располагались по ходу синусоидных капилляров. Эти клетки более отчетливо выявлялись на электронно-микроскопических препаратах (рис. 5Б).

Сравнительный анализ гистологических препаратов экспериментальных групп позволил выявить дополнительно ряд патологических процессов в печени животных. Так, во всех случаях после введения ТАА наблюдались дистрофические изменения в гепатоцитах в виде просветле-

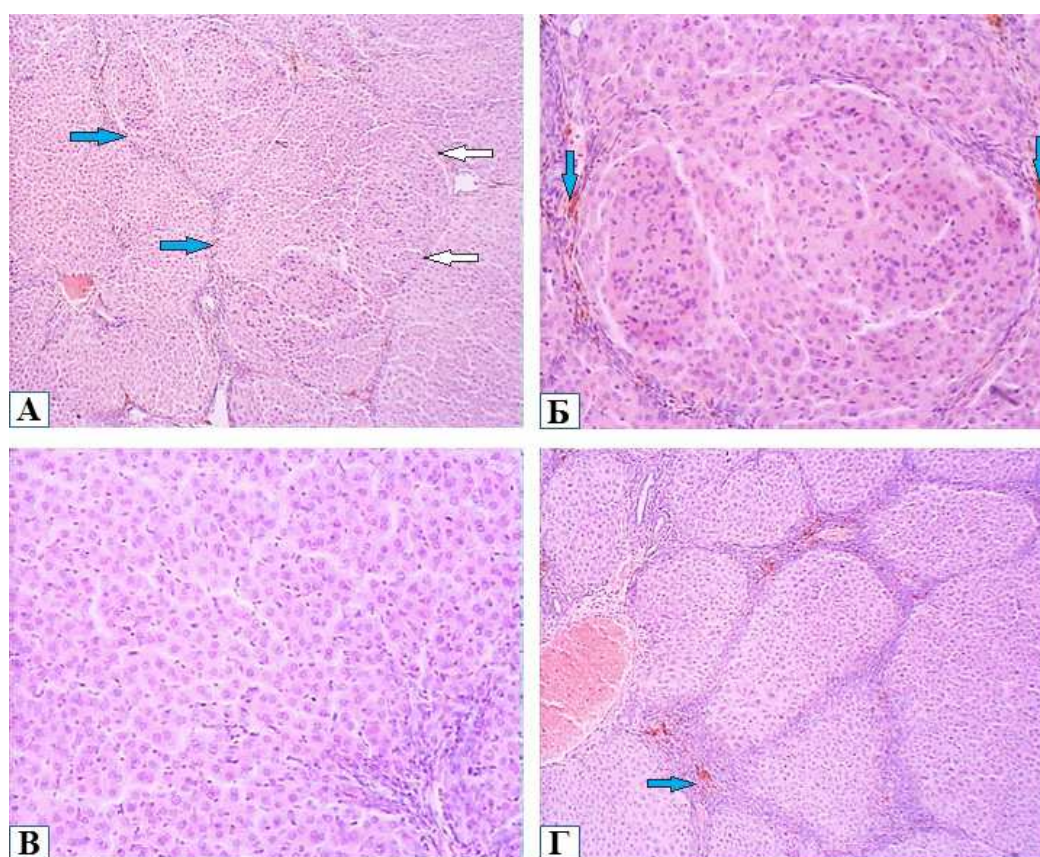


Рисунок 3 – Дистрофические изменения в печени крыс в различные сроки после воздействия ТАА и ретинола:
 А – группа 5 – полные (голубые стрелки) и неполные (белые стрелки) фиброзные септы с формированием ложных долек. Ув. $\times 40$; Б – группа 5 – ложная долька, в которой нарушено балочное строение печени, полиморфизм ядер гепатоцитов, в толще соединительнотканых септ – многочисленные макрофаги (стрелки), содержащие липофусцин. Ув. $\times 100$; В – группа 5 – внутридольковая диссеминированная инфильтрация клетками воспалительного ряда. Ув. $\times 100$; Г – группа 6 – массивное разрастание соединительной ткани с образованием полных порто-портальных и порто-центральных септ с формированием ложных долек, липофусцинсодержащие макрофаги (стрелка) в толще соединительнотканых септ. Ув. $\times 40$.

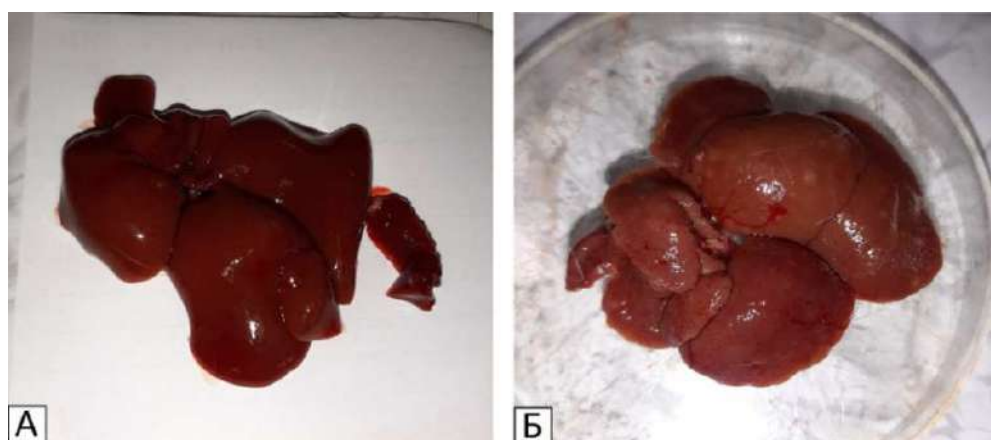


Рисунок 4 – Макропрепараты печени животных: А – 1-я группа – поверхность печени гладкая, ровная;
 Б – 6-я группа – поверхность печени бугристая, неоднородная, визуализируются узлы.

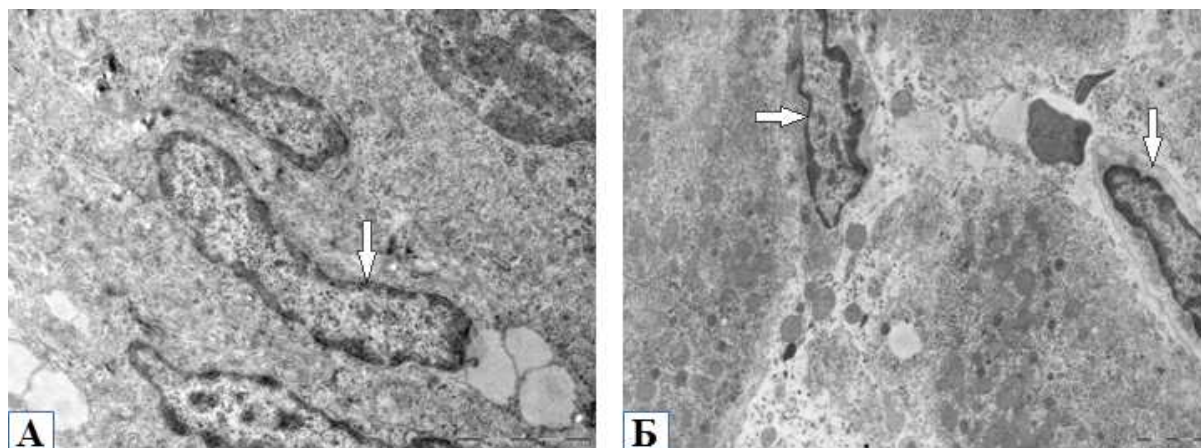


Рисунок 5 – Электронограмма ПСЛ животных 6-й группы: А – ядро активированного ПСЛ(стрелка), на полюсе которого липидные включения. Ув. 15 000. Б – гиперплазия фибробластов(стрелки) по ходу синусоидных капилляров. Ув. 8 000.

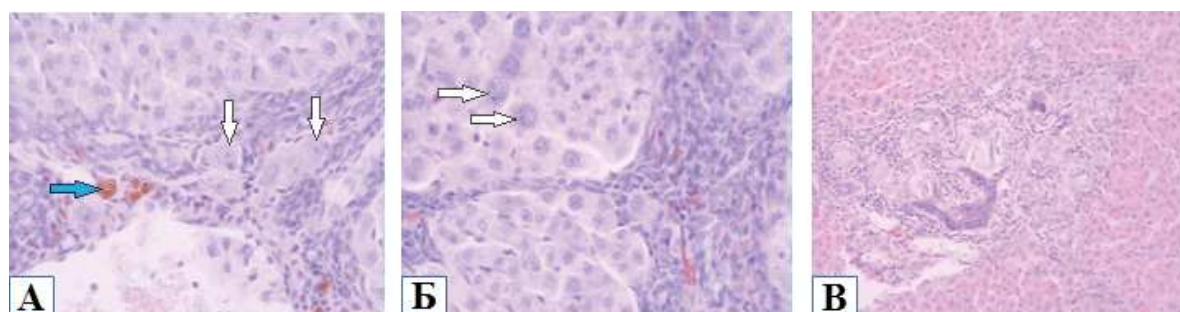


Рисунок 6 – Структурные особенности в печени животных 2-й группы (А) и 4-й группы (Б, В): А – дистрофия гепатоцитов (белые стрелки) и многочисленные макрофаги (голубая стрелка), содержащие липофусцин в толще соединительнотканых септ. Ув.×200; Б – гипертрофированные ядра гепатоцитов (стрелки), содержащие крупные ядрышки и полиморфные включения. Ув.×200; В – патологическая пролиферация эпителия желчного протока. Ув.×40.

ния цитоплазмы и ядер-теней, локализованных преимущественно в толще соединительнотканых септ (рис. 6А). Это состояние предшествует гибели клеток и было более выражено через 8 недель после ежедневного введения ТАА (6-я группа). У животных при сочетанном воздействии ТАА и ретинола (5-я и 6-я группы) отмечено появление гепатоцитов с гипертрофированными гиперхромными ядрами с полиморфными включениями, локализованными в перипортальных областях долек (рис. 6Б). В печени животных, которым вводили ТАА и подсолнечное масло, в большом количестве регистрировались макрофаги, содержащие липофусцин – продукт неполной утилизации изношенных и разрушенных клеточных компонентов, длительное время находившихся в клетках и выброшенных в составе аутофагосом путем экзоцитоза с последующим поглощением их макрофагами (рис. 6А, Б).

У животных экспериментальных групп в гепатоцитах регистрировались многочисленные фагосомы (рис. 7А), особенно аутомитофагосомы (рис. 7Б), преимущественно в области центральных вен и портальных трактов.

В этих областях в гепатоцитах отмечалась гипоплазия гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) и гиперплазия гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС), что свидетельствовало об усилении процессов детоксикации в печени. Существенные дистрофические изменения отмечены и в митохондриях, большинство из которых отличались набухшим матриксом и редуцированными дезориентированными кристами. Нередко вокруг таких митохондрий формировалась изолирующая мембрана (фагофоры) (рис. 7В), что в дальнейшем приводило к образованию аутомитофагосомы. В то же время в интермедиальной области дольки регистрировалась достаточно раз-

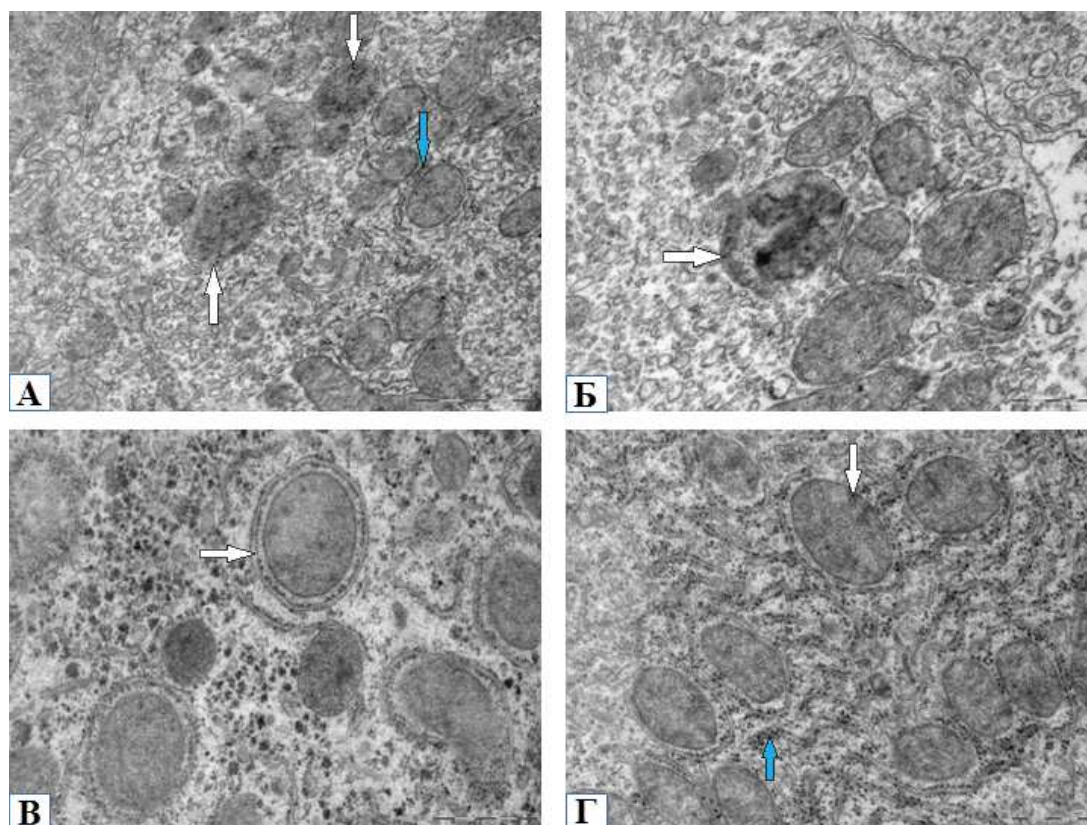


Рисунок 7 – Ультраструктура печени животных 6-й группы при сочетанном воздействии ТАА и ретинола:

А – гиперплазия фагосом (белые стрелки) и гладкой эндоплазматической сети (ГлЭС), гипоплазия гранулярной эндоплазматической сети (ГрЭС) (голубая стрелка) в цитоплазме гепатоцита. Ув. 30 000; Б – аутомитофагосома (стрелка). Ув. $\times 40$; В – сформированная изолирующая мембрана (фагофора) (стрелка) вокруг поврежденной митохондрии. Ув. 50 000; Г – хорошо развитая ГрЭС (голубая стрелка) и митохондрии (белая стрелка), содержащие умеренное число крист в гепатоците, локализованном в интермедиальной области дольки. Ув. 40 000.

витая ГрЭС, а митохондрии содержали большее число крист (рис. 7Г), что указывало на процессы внутриклеточной регенерации.

У некоторых животных 4-й и 6-й групп обнаружена патологическая пролиферация эпителия отдельных желчных протоков (рис. 6В).

У животных 1 и 2 групп в печени визуализировались неактивные («спящие») ПСЛ с большим количеством крупных липидных капель, плотно прилегающих друг к другу и отесняющих ядро клетки к периферии (рис. 8).

У животных 5 группы, на фоне введения ТАА и ретинола, неактивные ПСЛ в печени практически не встречались, в то же время присутствовало большое количество активированных (фибробластоподобных) ПСЛ с единичными липидными включениями, как правило, расположенными на противоположных полюсах клеток (рис. 9).

На фоне длительного введения ТАА и приема ретинола в печени животных 6-й группы выявлено много участков некроза (рис. 10) и апоптоз гепатоцитов (рис. 11) в формирующихся фиброзных септах.

В соответствии с поставленной целью, одновременно с морфологической оценкой процесса фиброобразования проводилось исследование уровня ретинола в плазме и ткани печени крыс (табл. 2).

Содержание ретинола в плазме крыс наименьшим было в 4-й группе, наибольшим – в 3-й группе (табл. 2). Минимальное содержание ретинола в печени крыс наблюдалось в 3-й группе, максимальное – во 2-й группе.

Обсуждение

Воздействие ТАА в течение 4-х недель ин-

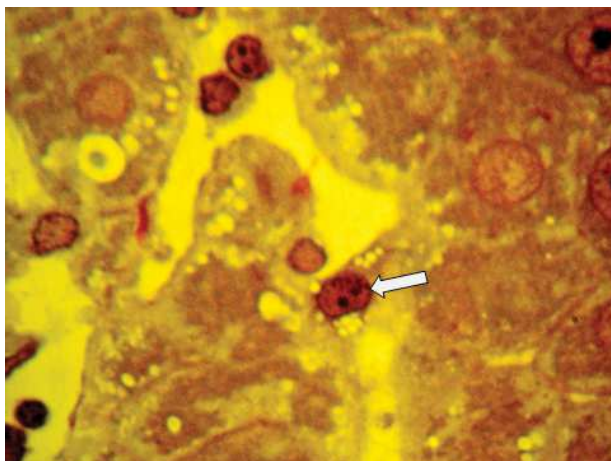


Рисунок 8 – 2-я группа – покоящиеся ПСЛ с большим количеством ретинолсодержащих капель (стрелки), расположенные вблизи центральной вены. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. Ув. $\times 1000$.

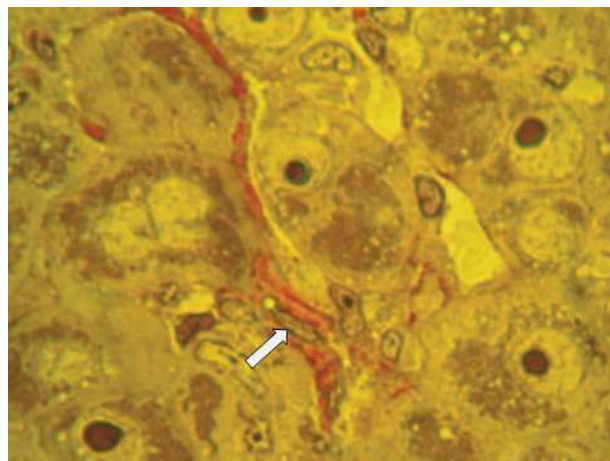


Рисунок 9 – 5-я группа – в центролобулярной зоне печени активированная фибробластоподобная клетка (стрелка), содержащая липидную каплю и приступившая к синтезу коллагена (окрашен основным фуксином в красный цвет). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. Ув. $\times 1000$.

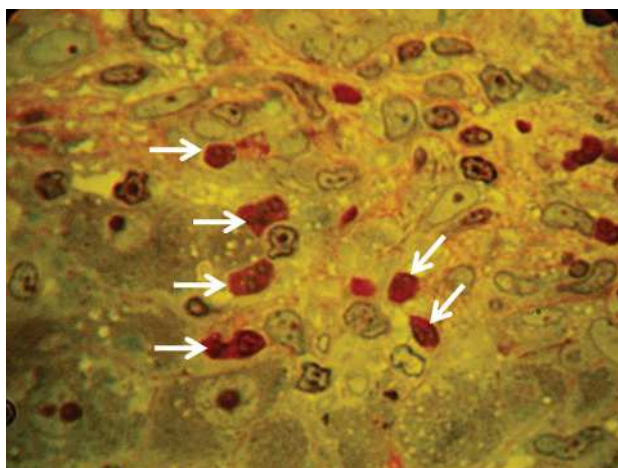


Рисунок 10 – Группа 6 – участок некроза печеночной ткани с инфильтрацией нейтрофилов (стрелки). Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. Ув. $\times 1000$.

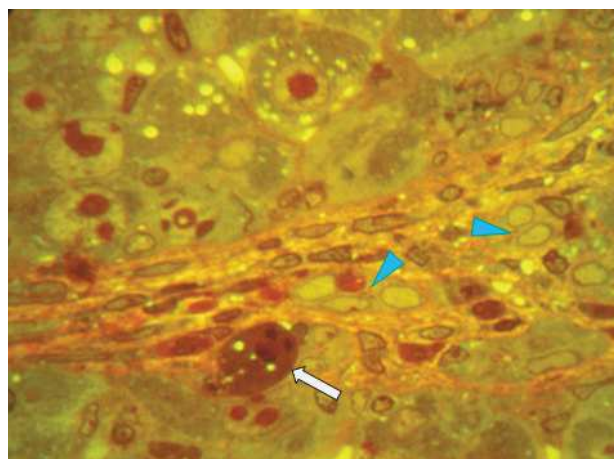


Рисунок 11 – Группа 6 – формирующаяся септа. Апоптотный гепатоцит (стрелка), наконечником стрелки обозначены ядра эпителиальных клеток разрушающихся желчных протоков. Полутонкий срез. Окраска: азур II – осн. фуксин. Ув. $\times 1000$.

Таблица 2 – Содержание ретинола в плазме (мкмоль/л) и печени (мкмоль/г) крыс ($M \pm m$)

Показатели	Группы, $M \pm m$					
	1(n=8)	2(n=9)	3(n=8)	4(n=8)	5(n=8)	6(n=7)
Ретинол плазмы	$0,97 \pm 0,077^*$	$1,08 \pm 0,054$	$2,04 \pm 0,112$	$0,72 \pm 0,024^{***}$	$1,56 \pm 0,086^{**}$	$0,88 \pm 0,026^*$
Ретинол печени	$10,29 \pm 0,079$	$14,23 \pm 0,129^{*†††}$	$9,13 \pm 0,351$	$12,03 \pm 0,421$	$13,64 \pm 0,239^{*†}$	$11,12 \pm 0,620^{††}$

Примечание: * – статистически достоверные различия с 3-й группой ($p < 0,05$), ** – статистически достоверные различия между 4 и 5 группами ($p < 0,05$), † – статистически достоверные различия с 1-й группой ($p < 0,05$), †† – статистически достоверные различия между 2 и 6 группами ($p < 0,05$).

дуцировало в печени крыс развитие воспалительной реакции и 4-кратное (по сравнению с контрольными животными) увеличение количества соединительной ткани в виде тонких неполных фиброзных септ. Введение животным подсолнечного масла в течение 4-х недель после 4-недельного введения ТАА снижало интенсивность воспалительной реакции в области портальных трактов и внутри дольки, но приводило к более выраженному формированию тонких и неполных соединительнотканых септ. Введение ретинола в течение 4-х недель после 4-недельного введения ТАА уменьшало воспалительную реакцию, однако более быстро и значительно приводило к развитию фиброза с формированием тонких porto-центральных септ (полных и неполных). Введение животным ретинола в течение 4-х недель на фоне 8-недельного воздействия ТАА приводило к развитию микронодулярного цирроза печени. Введение животным только ретинола на протяжении 4-х недель приводило к достоверному увеличению количества соединительной ткани в печени по сравнению с контрольными животными.

В печени всех экспериментальных групп не отмечено увеличение липидных включений в ПСЛ по сравнению с контрольными животными, в т.ч. и тех, которым вводили только подсолнечное масло и ретинол в смеси с ним.

При сочетанном воздействии ТАА и ретинола характерно появление гепатоцитов с гипертрофированными гиперхромными ядрами с полиморфными включениями, локализованных в перипортальных областях долек.

Заключение

Таким образом, ретинол, назначенный в экспериментальной (лечебной) дозе оказывал профиброгенный эффект, стимулируя выработку коллагена. При всех сроках воздействия ТАА, наряду с процессом фиброзообразования, в печени наблюдались дистрофические изменения в гепатоцитах вплоть до гибели клеток в области соединительнотканых септ. Косвенно отмечено усиление процессов детоксикации в гепатоцитах и фагоцитоза. При этом процессы деструкции в гепатоцитах происходили параллельно с процессами репарации (внутриклеточной регенерации).

Литература

1. Kisseleva, T. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis / T. Kisseleva, D. A. Brenner // *Cell. Cycle*. – 2013 Feb. – Vol. 12, N 3. – P. 381–382.
2. Bataller, R. Liver fibrosis / R. Bataller, D. A. Brenner // *J. Clin. Invest.* – 2005 Feb. – Vol. 115, N 2. – P. 209–218.
3. Senoo, H. Vitamin A-storing cells (stellate cells) / H. Senoo, N. Kojima, M. Sato // *Vitam. Horm.* – 2007. – Vol. 75. – P. 131–159.
4. Клиническая цитология печени: звездчатые клетки Ито / В. М. Цыркунов [и др.] // *Журн. ГрГМУ*. – 2016. – № 4. – С. 90–99.
5. Origin and role of hepatic myofibroblasts in hepatocellular carcinoma / B. G. Yavuz [et al.] // *Oncotarget*. – 2020 Mar. – Vol. 11, N 13. – P. 1186–1201.
6. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* – 2021 Mar. – Vol. 18, N 3. – P. 151–166.
7. Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts / L. L. Jophlin [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* – 2018 Nov. – Vol. 315, N 5. – P. G713–G721.
8. Delire, B. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development / B. Delire, P. Stärkel, I. Leclercq // *J. Clin. Transl. Hepatol.* – 2015 Mar. – Vol. 3, N 1. – P. 53–66.
9. Davis, B. H. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production / B. H. Davis, R. T. Kramer, N. O. Davidson // *J. Clin. Invest.* – 1990 Dec. – Vol. 86, N 6. – P. 2062–2070.
10. Senoo, H. Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A / H. Senoo, K. Wake // *Lab. Invest.* – 1985 Feb. – Vol. 52, N 2. – P. 182–194.
11. Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl₄-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats / W. F. Seifert [et al.] // *Liver*. – 1995 Feb. – Vol. 15, N 1. – P. 1–8.
12. Leo, M. A. Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat / M. A. Leo, C. S. Lieber // *Hepatology*. – 1983 Jan-Feb. – Vol. 3, N 1. – P. 1–11.
13. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells / M. Okuno [et al.] // *Hepatology*. – 1997 Oct. – Vol. 26, N 4. – P. 913–921.
14. Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats / W. F. Seifert [et al.] // *Hepatology*. – 1994 Jan. – Vol. 19, N 1. – P. 193–201.
15. Коррекция изменений гемостаза при гипертермическом воздействии комплексом витаминов-антиоксидантов / А. В. Самойлов [и др.] // *Фундаментальная наука в современной медицине* – 2019 : сб. материалов сател. дистанц. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Минск, 22 марта 2019 г. / под ред. А. В. Сикорского [и др.]. – Минск, 2019. – С. 49–52.
16. Волкова, О. В. Основы гистологии с гистологической техникой / О. В. Волкова, Ю. К. Елецкий. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : Медицина, 1982. – 304 с.

17. Способ моделирования экспериментального тиацетамидного поражения печени у крыс / Я. И. Новгородская [и др.] // Гепатология и гастроэнтерология. – 2020. – Т. 4, № 1. – С. 90–95.
18. Millonig, G. A. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation / G. A. Millonig // J. Appl. Physics. – 1961. – Vol. 13. – P. 1637–1643.
19. Glauert, A. M. Araldite as an embedding medium for electron microscopy / A. M. Glauert, R. H. Glauert // J. Biophys. Biochem. Cytol. – 1958 Mar. – Vol. 4, N 2. – P. 191–194.
20. Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy / E. S. Reynolds // J. Cell. Biol. – 1963 Apr. – Vol. 17, N 1. – P. 208–212.
21. Taylor, S. L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis / S. L. Taylor, M. P. Lamden, A. L. Tappel // Lipids. – 1976 Jul. – Vol. 11, N 7. – P. 530–538.

Поступила 29.10.2021 г.

Принята в печать 10.12.2021 г.

References

1. Kisseleva T, Brenner DA. Inactivation of myofibroblasts during regression of liver fibrosis. Cell Cycle. 2013 Feb 1;12(3):381-2. doi: 10.4161/cc.23549
2. Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):209-18. doi: 10.1172/JCI24282
3. Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-storing cells (stellate cells). Vitam Horm. 2007;75:131-59. doi: 10.1016/S0083-6729(06)75006-3
4. Tcyrkunov VM, Andreev VP, Kravchuk RI, Kondratovich IA. Clinical cytology of the liver: stellate cells Ito. Zhurn GrGMU. 2016;(4):90-9. (In Russ.)
5. Yavuz BG, Pestana RC, Abugabal YI, Krishnan S, Chen J, Hassan MM, et al. Origin and role of hepatic myofibroblasts in hepatocellular carcinoma. Oncotarget. 2020 Mar 31;11(13):1186-1201. doi: 10.18632/oncotarget.27532
6. Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021 Mar;18(3):151-166. doi: 10.1038/s41575-020-00372-7
7. Jophlin LL, Koutalos Y, Chen C, Shah V, Rockey DC. Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2018 Nov;315(5):G713-G721. doi: 10.1152/ajpgi.00251.2017
8. Delire B, Stärkel P, Leclercq I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. J Clin Transl Hepatol. 2015 Mar;3(1):53-66. doi: 10.14218/JCTH.2014.00035
9. Davis BH, Kramer RT, Davidson NO. Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. J Clin Invest. 1990 Dec;86(6):2062-70. doi: 10.1172/JCI114943
10. Senoo H, Wake K. Suppression of experimental hepatic fibrosis by administration of vitamin A. Lab Invest. 1985 Feb;52(2):182-94.
11. Seifert WF, Bosma A, Hendriks HF, van Leeuwen RE, van Thiel-de Ruiter GC, Seifert-Bock I, et al. Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl4-induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. Liver. 1995 Feb;15(1):1-8. doi: 10.1111/j.1600-0676.1995.tb00098.x
12. Leo MA, Lieber CS. Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. Hepatology. 1983 Jan-Feb;3(1):1-11. doi: 10.1002/hep.1840030101
13. Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, et al. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-beta in liver stellate cells. Hepatology. 1997 Oct;26(4):913-21. doi: 10.1053/jhep.1997.v26.pm0009328313
14. Seifert WF, Bosma A, Brouwer A, Hendriks HF, Roholl PJ, van Leeuwen RE, et al. Vitamin A deficiency potentiates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. Hepatology. 1994 Jan;19(1):193-201.
15. Samoilov AV, Solovlev VG, Belkina DS, Astakhova TI, Rokina OA, Kalashnikova SP. Correction of hemostasis changes in hyperthermic exposure with antioxidant vitamin complex. V: Sikorskii AV, Khryshchanovich VIa, Gorlacheva TV, Vismont FI, red. Fundamental'naia nauka v sovremennoi meditsine – 2019: sb materialov satel'nykh distants nauch-prakt konf studentov i molodykh uchenykh, Minsk, 22 marta 2019 g. Minsk, RB; 2019. P. 49-52. (In Russ.)
16. Volkova OV, Eletskii IuK. Basics of histology with histological technique. 2-e izd, ispr i dop. Moscow, RF: Meditsina; 1982. 304 p. (In Russ.)
17. Novogrodskaya IaI, Ostrovskaya OB, Kravchuk RI, Doroshenko EM, Guliai IE, Aleshchik Alu, i dr. A method for modeling experimental thioacetamide-induced liver damage in rats. Gepatologiya i Gastroenterologiya. 2020;4(1):90-5. (In Russ.)
18. Millonig GA. Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. J Appl Physics. 1961;13:1637-43.
19. Glauert AM, Glauert RH. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol. 1958 Mar;4(2):191-4. doi: 10.1083/jcb.4.2.191
20. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol. 1963 Apr;17(1):208-12. doi: 10.1083/jcb.17.1.208
21. Taylor SL, Lamden MP, Tappel AL. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis. Lipids. 1976 Jul;11(7):530-8. doi: 10.1007/BF02532898

Submitted 29.10.2021

Accepted 10.12.2021

Сведения об авторах:

Кондратович И.А. – ассистент кафедры инфекционных болезней, Гродненский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7310-5204>;

Андреев В.П. – к.б.н., профессор кафедры медицинской биологии и генетики, Гродненский государственный медицинский университет;

Кравчук Р.И. – к.б.н., старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, Гродненский государственный медицинский университет;

Гуляй И.Э. – к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, Гродненский государственный медицинский университет;

Шалесная С.Я. – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, Гродненский государственный медицинский университет;

Цыркунов В.М. – д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней, Гродненский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>.

Information about authors:

Kondratovich I.A. – lecturer of the Chair of Infectious Diseases, Grodno State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7310-5204>;

Andreev V.P. – Candidate of Biological Sciences, professor of the Chair of Medical Biology and Genetics, Grodno State Medical University;

Kravchuk R.I. – Candidate of Biological Sciences, senior research officer of the Research Laboratory, Grodno State Medical University;

Gulyai I.E. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, leading research officer of the Research Laboratory, Grodno State Medical University;

Shalesnaya S.Ya. – junior research officer of the Research Laboratory, Grodno State Medical University;

Tsyrkunov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor of the Chair of Infectious Diseases, Grodno State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-6789>.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, г. Гродно, 230009, ул. Горького, 80, Гродненский государственный медицинский университет, кафедра инфекционных болезней. E-mail: iriskak22@mail.ru – Кондратович Ирина Анатольевна.

Correspondence address: Republic of Belarus, 230009, Grodno, 80 Gorky str., Grodno State Medical University, Chair of Infectious Diseases. E-mail: iriskak22@mail.ru – Irina A. Kondratovich.