ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ЧУВАШСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.Н. УЛЬЯНОВА»

*На правах рукописи*

**ГРИГОРЬЕВА Евгения Александровна**

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КРЕМНИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ПЕЧЕНИ

1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Сергеева Валентина Ефремовна

Чебоксары – 2024

# ОГЛАВЛЕНИЕ

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность темы исследования

Печень – паренхиматозный орган, задействованный во многих процессах: кроветворение во внутриутробном периоде; белковый, углеводный, жировой обмены; детоксикация; метаболизм лекарственных веществ, регулирование объема крови и многое другое [291]. При этом повреждения печени на ранних этапах сложно диагностируемы, так как не проявляют себя в биохимических анализах крови [75]. Однако на микроскопическом уровне изменения уже могут наблюдаться. В связи с этим немаловажным является установление уровня NOAEL (no observed adverse effect level), подразумевающего под собой самую высокую дозу, при которой не наблюдается клинических проявлений, но могут быть найдены изменения на уровне физиологической адаптации [24, 166].

Печень состоит из стромы и паренхимы, образованной печеночными дольками. Основными компонентами печеночных долек являются гепатоциты. Кроме гепатоцитов в состав дольки входят клетки Купфера, звездчатые клетки, pit-клетки, эндотелиоциты, а также центральная вена, междольковая вена, артерия и желчный проток [32]. В печени также встречаются тучные клетки, эозинофилы, гистиоциты, фибробласты, лимфоциты, в том числе и плазмоциты [15, 32, 174, 181]. Каждый из них является важным, незаменимым компонентом органа, необходимым для реализации его функционального потенциала. Более того, печень – единственный орган, способный к регенерации до исходных размеров [39] путем репаративной регенерации, которая активизируется при резекции или повреждении [7]. Следовательно, установление факторов, способных вызывать повреждения в органе на микроскопическом уровне, позволит предупреждать развитие заболеваний на этапе первичной профилактики.

Кремний (Si), в свою очередь, является вторым по распространенности на земном шаре химическим элементом, существующим преимущественно в виде кремнезема и силикатов (на долю которых приходится около 27% массы элемента) и содержащийся во всех тканях и органах человеческого организма [24, 28, 104, 173], в связи с чем он вызывает интерес у многих ученых. Вопрос о его биологической роли в живых организмах до сих пор остается открытым.

Кремний нашел широкое применение в промышленности; его используют при изготовлении стали, абразивов, кирпича, блоков транзисторов, солнечных батарей, выпрямителей, стекла, компьютерных чипов, лакокрасочных материалов и в других сферах [217]. Неорганические и органические соединения кремния используются в пищевой промышленности. Они часто применяются в качестве агента против слеживания, осветлителя в напитках, регулятора вязкости, противовспенивающего агента, формообразующего вещества в составе лекарственных препаратов и витаминов [216, 217]. Следовательно, диапазон применения соединений кремния с каждым годом растет, что становится причиной большего контакта человека с данным микроэлементом, о последствиях которого мало кто задумывается.

Считается, что используемые в промышленных областях химические формы кремния, как правило, не являются биодоступными [22, 94]. Тем не менее коллоидная кремниевая кислота, силикагель и цеолиты, хотя и относительно нерастворимы в воде, могут увеличивать общую концентрацию в ней водорастворимого кремнезема [216]. В современном мире люди ежедневно подвергаются воздействию диоксида кремния в составе пищевых продуктов, а также других соединений кремния с водой, которые обладают способностью к абсорбции и биодоступности [207]. Особенно остро данный вопрос должен подниматься на территориях страны, относящихся к так называемым «кремниевым» провинциям [46, 93, 95, 109], жители которых оказываются более подверженными воздействию высоких доз кремния. Однако возможные последствия длительного влияния кремния на организм недостаточно изучены.

С 1980 по 2021 годы действовал нормативный документ водно-санитарного законодательства, согласно которому предельно допустимая концентрация кремния составляла 10 мг/л. Кроме того, продолжали действовать нормативы для силикатов натрия и калия, которые, по ранее актуальному документу, находились на уровне не более 30 мг/л (по $SiO_3$). С 01.03.2021 года вступил в силу новый нормативный документ, в котором требования к предельно допустимой концентрации кремния были изменены. Согласно действующему документу гигиенический норматив для кремния зависит от жесткости воды и составляет 25 мг/л при жесткости воды до 2,5 мг-экв/л и 20 мг/л при жесткости воды более 2,5 мг-экв/л [80, 89, 90, 91, 92]. В то же время данных об изучении влияния кремния, поступающего в предельно допустимых дозах в течение длительного времени, не было обнаружено.

Учитывая, что по системе воротной вены от непарных органов брюшной полости кровь, насыщенная различными веществами, в том числе макро- и микроэлементами, переносится в печень [127, 149, 201], важно изучить изменения микроскопической структуры данного органа, так как именно печень будет одним из первых барьеров на их пути. В связи с этим **актуальность** изучения изменений в микроскопическом строении печени в условиях длительного поступления кремния с питьевой водой в предельно допустимых концентрациях не вызывает сомнений.

**Степень разработанности**

Несмотря на имеющиеся исследования, моделирующие воздействие различных соединений кремния на организм человека, вопрос о безопасности соединений кремния до сих пор остается не до конца изученным, что также подтверждается обзором литературы. Существующие публикации преимущественно касаются изучения потенциально негативного воздействия наноразмерных форм кремния при поступлении их в токсических дозах внутривенным [132, 261], внутрибрюшным [224], пероральным [135, 212, 251] способами, а также через дыхательные пути [129, 197, 225]. При этом

наночастицы кремния, независимо от способа их поступления, обнаруживались в печени [129]. Вместе с тем следует помнить, что одним из основных источников кремния является питьевая вода [22]. Несмотря на это, должного внимания к водорастворимым формам кремния в настоящий момент не уделяется. Ранее изучено воздействие девятиводного метасиликата натрия, поступающего с питьевой водой, на организм лабораторных крыс в течение длительного времени. Было выявлено негативное влияние водорастворимого кремния на состояние лимфоидных органов лабораторных крыс, таких как тимус, селезенка и подслизистые агрегированные лимфоидные узелки [23, 74]. В то же время данных по изучению микроскопического строения печени на фоне воздействия водорастворимых форм кремния при его пероральном поступлении не было найдено.

**Цель работы –** изучение изменений в гистологическом строении печени лабораторных крыс при поступлении кремния с питьевой водой в предельно допустимой концентрации (20 мг/л) в течение двух и девяти месяцев.

**Задачи исследования:**

1. Провести морфометрический анализ гепатоцитов, ядер гепатоцитов, центральной вены и междольковой вены, артерии, желчного протока печеночных долек печени крыс при воздействии водорастворимого кремния в течение двух и девяти месяцев.

2. Изучить изменения оптической плотности ДНК и РНК в гепатоцитах печени крыс в условиях поступления кремния с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев.

3. Оценить состояние эозинофилов, тучных клеток и макрофагов печени крыс при поступлении кремния с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев.

4. Оценить обеспеченность биогенными аминами люминесцирующих структур печени крыс в условиях поступления кремния с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев.

5. Провести кластерный и факторный анализы для выявления взаимосвязи между изучаемыми параметрами внутри экспериментальных групп, а также сходств и отличий между изменениями показателей, наблюдаемыми у животных, получавших кремний в течение двух и девяти месяцев.

**Научная новизна**

1. Впервые была изучена гистологическая картина печени лабораторных крыс на поступление кремния в предельно допустимых концентрациях (20 мг/л) с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев и было обнаружено, что водорастворимый кремний приводит к микроскопическим изменениям в печени, проявляющимся увеличением площади одноядерных гепатоцитов, цитоплазмы одноядерных гепатоцитов и уменьшением ядерно-цитоплазматического отношения (ЯЦО) на микропрепаратах печени через два месяца от начала эксперимента; на обоих сроках эксперимента отмечено увеличение среднего диаметра синусоидных капилляров; через девять месяцев эксперимента в печени крыс возрастает площадь центральной вены, междольковых сосудов и желчного протока.

2. Установлено увеличение медианы оптической плотности ДНК ядер гепатоцитов, медианы оптической плотности цитоплазматической РНК гепатоцитов печени крыс опытной группы на обоих сроках эксперимента; повышение медианы оптической плотности ядерной РНК гепатоцитов печени крыс опытной группы крыс, получавших кремний с питьевой водой в концетрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

3. Впервые выявлено увеличение интенсивности люминесценции гистамина, серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах, люминесцирующих гранулярных клетках и их микроокружении в печени через два месяца эксперимента; увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс через девять месяцев эксперимента с поступлением кремния *ad libitum* с питьевой водой в концентрации 20 мг/л.

4. Доказано влияние водорастворимого кремния на количественные и тинкториальные характеристики тучных клеток, обнаруживаемых в препаратах печени, проявляющееся сменой метахроматичных дегранулирующих тучных клеток, преобладающих через два месяца, на ортохромные недегранулирующие через девять месяцев.

5. Впервые установлено, что поступление кремния в концентрации 20 мг/л с питьевой водой в течение двух месяцев приводит к увеличению количества Iba-1- и CD68-позитивных макрофагов, уменьшению площади Iba-1-позитивных макрофагов в печени лабораторных крыс. Вместе с тем замечено уменьшение площади CD68-позитивных макрофагов печени лабораторных крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев.

6. Путем проведения кластерного анализа установлены взаимосвязи: между макрофагами и гистаминовым статусом – через два месяца; между макрофагами и люминесцирующими структурами, содержащими катехоловые амины и серотонин, – через девять месяцев. Проведенный факторный анализ подтвердил ведущую роль гистамина в процессах, происходящих в печени через два месяца эксперимента, а также позволил выявить, что желчные протоки, междольковые сосуды и центральные вены вовлекаются в процесс, происходящий в печени крыс опытной группы, только через девять месяцев от начала эксперимента.

**Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные в ходе исследования результаты имеют важное теоретическое и практическое значение, так как они представляют собой совершенно новые данные, отражающие воздействие водорастворимых форм кремния на морфофункциональное состояние печени. Путем постановки люминесцентно-гистохимических, иммуногистохимических реакций, окраски препаратов печени лабораторных животных гистологическими методами были выявлены значимые изменения в микроморфологии печени.

Данная работа носит экспериментальный характер. Полученные результаты о реактивных и адаптационных изменениях в печени в ответ на поступление с питьевой водой кремния могут представлять интерес для врачей-специалистов: профпатологов, диетологов, гастроэнтерологов, патологоанатомов, фармакологов, а также могут быть использованы в образовательном процессе при чтении лекций, проведении практических и лабораторных занятий на кафедрах общей и клинической морфологии, гигиены, фармакологии, гастроэнтерологии, при написании учебных пособий и рекомендаций на соответствующих кафедрах.

**Методология и методы исследования**

Методологическую основу настоящей работы составляет экспериментальное исследование, направленное на выявление в печени лабораторных животных микроскопических изменений, обусловленных поступлением кремния с питьевой водой в течение различного временного промежутка. Для определения изученности данной проблемы был проведен анализ публикаций отечественных и зарубежных ученых в исследуемой области.

В ходе исследования разработана модель эксперимента на белых нелинейных лабораторных крысах с поступлением кремния в концентрации 20 мг/л с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев согласно правилам работы с ними. Объектом исследования явилась печень. Для изучения гистологического строения печени были использованы общегистологические, специальные гистологические, флуоресцентно-гистохимические, цитоспектрофлуориметрические, иммуногистохимические методы, морфометрия, различные методы статистической обработки данных.

**Научные положения, выносимые на защиту**

1. Поступление кремния в концентрации, соответствующей предельно допустимой (20 мг/л), в течение двух месяцев приводит к развитию воспалительного процесса в печени с нарушением ее гистологической

структуры преимущественно за счет стромального компонента (увеличение числа эозинофилов в области портальных зон; возрастание количества тучных клеток, макрофагов; усиление люминесценции биогенных аминов в содержащих их структурах; увеличение диаметра синусоидных капилляров). Со стороны паренхимы происходит активизация процессов белкового синтеза (гипертрофия гепатоцитов, усиление оптической плотности РНК в их цитоплазме).

2. Пролонгирование эксперимента с поступлением водорастворимого кремния до девяти месяцев вызывает усиление компенсаторно-приспособительных механизмов как в паренхиме (сохранение повышенной биосинтетической активности клеток), так и в стромально-сосудистом компоненте органа (рост диаметра синусоидных капилляров, площади поперечных сечений центральных вен и междольковых сосудов; усиление люминесценции серотонина и катехоловых аминов) на фоне сохраняющегося воспалительного процесса.

**Степень достоверности и апробация результатов научных исследований**

Степень достоверности полученных результатов обоснована достаточным количеством (n = 80) лабораторных животных (белые нелинейные крысы-самцы), а также оптимальными условиями содержания их в виварии, применением современного сертифицированного оборудования для обработки экспериментального материала. Достоверность полученных результатов в ходе исследования была обеспечена с помощью подбора адекватных общегистологических, флуоресцентных, иммуногистохимических методов, а также последующей статистической обработкой.

Результаты, представленные в диссертационной работе, доложены на следующих научных мероприятиях: Всероссийской 50-й научной студенческой конференции по техническим, гуманитарным и естественным наукам, посвященной Году человека труда в Чувашии (Чебоксары, 12–16 апреля

2016 г.); Региональном фестивале студентов и молодежи «Человек. Гражданин. Ученый (ЧГУ-2016)» (Чебоксары, 4–8 декабря 2018 г.); III Всероссийской научной конференции молодых ученых «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 12–14 сентября 2016 г.); IV Всероссийском научно-медицинском форуме студентов и молодых ученых с международным участием «Белые цветы» (Казань, 13–16 апреля 2017 г.); XIX Межрегиональной конференции-фестивале научного творчества учащейся молодежи «Юность Большой Волги» (Чебоксары, 26 мая 2017 г.); XII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Студенческая медицинская наука XII века» (Республика Беларусь, г. Витебск, 15–16 ноября 2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон (Чебоксары, 22 ноября 2017 г.); Всероссийской 52-й студенческой конференции по техническим, гуманитарным и естественным наукам, посвященной Году добровольца и волонтера в России (Чебоксары, 2–7 апреля 2018 г.); Международной молодежной научной конференции «Фундаментальные исследования – старт в медицинскую науку», посвященной 260-летию Сеченовского Университета (Москва, 21–22 ноября 2018 г.); 30-й Европейской студенческой конференции (30th ESC) (Германия, г. Берлин, 25–29 сентября 2019 г.); 33rd European Congress of Pathology (28–31 августа 2021 г.); Experimental Biology 2022 (Филадельфия, США, 2–5 апреля 2022 г.); Международной научно-практической конференции «Медицинская наука и практика: междисциплинарный диалог», посвященной 55-летию Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (Чебоксары, 15 апреля 2022 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон (Чебоксары, 22 ноября 2022 г.); XXIX Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием

«Актуальные проблемы биомедицины – 2023» (Санкт-Петербург, 30–31 марта 2023 г.).

**Публикации.** По материалам диссертации в настоящий момент опубликовано 28 научных работ, из них 7 соответствуют избранной научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки) (2 статьи – в журналах, индексируемых Scopus, 5 – в журналах, индексируемых ВАК Минобрнауки России).

**Личный вклад соискателя.** Автором самостоятельно осуществлялись: подготовка питьевой воды для поения животных; взвешивание крыс до и после эксперимента; выведение животных из эксперимента с забором органов; приготовление криостатных срезов; постановка люминесцентно-гистохимических реакций для выявления нейромедиаторных биогенных аминов методом Кросса, Эвана, Роста и Фалька – Хилларпа; описание люминесцентной морфологии печени и проведение цитоспектрофлуориметрии гистамина, серотонина и катехоловых аминов; приготовление гистологических препаратов с окраской их общегистологическими методиками; фотографирование микропрепаратов; морфометрия и статистическая обработка данных. При написании обзора литературы автором самостоятельно проводился поиск и анализ опубликованных по теме диссертации работ отечественных и зарубежных авторов. Оформление глав диссертационной работы, подготовка материалов диссертации к публикации в открытой печати, представление результатов исследования на научно-практических конференциях осуществлялись автором лично.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Биологическая роль кремния

Кремний (Si) – второй по частоте встречаемости химический элемент в природе, уступающий по распространенности только кислороду. В чистом виде кремний на нашей планете практически не встречается. Чаще всего его обнаруживают в форме диоксида кремния ($SiO_2$) или солей кремниевых кислот. Потребность в кремнии в среднем составляет от 10 до 25 мг в сутки, это примерно 0,3–0,8 мг Si/кг [28, 216]. Кремний в основном поступает в организм человека с водой (в виде свободной ортокремниевой кислоты), продуктами питания, а также с вдыхаемым воздухом [22, 28, 161]. Всасывание соединений кремния происходит в верхних отделах тонкого кишечника [50].

В теле человека содержится примерно 1–2 грамма кремния [58]. При этом он распределен неравномерно. Он обнаруживается в различных отделах нервной системы, в спинномозговой жидкости, а также в костной и соединительной ткани. В последних двух отмечена его преимущественная локализация. Выявлено, что концентрация кремния в различных тканях претерпевает изменение с возрастом, а также при различных патологических процессах, происходящих в организме [58, 104, 118]. Изучение биополимеров межклеточного вещества соединительной ткани обнаружило взаимосвязь кремния с гликозаминогликанами, а именно с хондроитинсульфатом, гиалуроновой кислотой. Кремний выявлен также в составе поли- и мукополисахаридов [119, 254, 264]. Считается, что кремний играет существенную роль в придании прочности, эластичности кровеносным сосудам и препятствует проникновению липидов в плазму крови. Уменьшение содержания кремния в соединительных тканях сопровождается снижением эластичности и возрастанием их проницаемости. Помимо всего кремний

принимает участие в метаболизме фосфора, нередко замещая его в структуре фосфолипидов [50].

Эксперименты на цыплятах, находившихся на низкокремниевой диете, выявили следующие изменения: недоразвитие отделов костей и суставных хрящей, низкое содержание воды в костной ткани, нарушение развития гребня, пониженная концентрация гексозаминов в хрящевой ткани и ткани гребня у петушков [294]. В связи с этим активно исследуются возможности применения различных соединений кремния для лечения и профилактики заболеваний костно-суставной системы. Так, например, для профилактики остеопороза, а также для улучшения качества волос и ногтей рекомендуют использование различных биологически активных добавок с кремнием [102]. Ведется изучение влияния кремнийсодержащей воды «Ардви» на регенерацию мягких тканей и долгосрочную оставленную мышечную болезненность для использования ее в целях профилактики и комплексного лечения возможных патологий при занятиях физической культурой и спортом [13, 114]. Однако эксперименты, проведенные на бройлерах-самцах, получавших питьевую воду с добавлением кремния в свободном доступе, не приводили к явным изменениям структуры костей в сравнении с контрольными группами животных [206].

Помимо всего, кремний в связанном состоянии был обнаружен в коллагене [118]. Выявлено, что соединения кремния способны стимулировать синтез коллагена 1-го типа и соответственно воздействовать на качество коллагена кожи и других соединительных тканей [148, 283]. Однако исследования Pritchard A. с соавторами (2020) показали, что увеличение количества коллагена не всегда приводит к улучшению его качества [266].

## 1.2. Биодоступность кремния и его роль в развитии некоторых патологических состояний

Основными источниками кремния для человека являются злаковые, овощи. Особенно богаты кремнием фасоль, шпинат, корнеплоды, а также морепродукты [215]. Концентрация поступающего извне кремния может варьировать и сильно зависеть от рациона человека. Так, например, мужчины за сутки получают с пищей больше кремния, нежели женщины [200]. Данное явление частично объясняется большим предпочтением мужчин алкогольных напитков, среди которых присутствует пиво [161, 245]. В странах Южной и Восточной Азии доза кремния, поступающего в организм человека за сутки, составляет от 140 до 204 мг, что также можно связать с особенностями пищевого рациона в этих регионах [152, 162, 262].

В Чувашской Республике, по данным Сапожникова С. П. (2001), жители Алатырского, Порецкого и Шумерлинского районов в зимнее и летнее время в составе водно-пищевого рациона получали в среднем 31,40 ± 3,30 и 28,06 ± 2,48 мг в сутки кремния соответственно. В то же время жители Янтиковского района получали в зимнее время 5,60 ± 1,40 мг и в летнее – 7,84 ± 0,84 мг кремния в сутки. Выявлено, что в Присурских районах 63–44% суммарного поступающего кремния приходится на кремний питьевой воды [93].

Кроме природных источников кремния на сегодняшний день широко распространены и «искусственные». Неорганические и органические соединения кремния активно используются в качестве пищевых добавок. Они разрешены к использованию в пищевой промышленности в связи с их биологической инертностью. Среди них наиболее часто можно встретить пищевую добавку Е551 (аморфный диоксид кремния). Она относится к антислеживателям и используется в производстве пищевых продуктов,

химического сырья, пеногасителей, а также в качестве осветляющего агента в производстве пива, соков, растительных масел [160, 230, 301]. Выделенный из пищевых продуктов аморфный диоксид кремния находится в следующих размерных диапазонах: в кондитерских изделиях – от 20 до 50 нм [192]; в картофельных и кукурузных чипсах, подсластителях – от 10 до 50 нм [244].

Наночастицы диоксида кремния, особенно в последнее время, динамично используются в качестве транспортеров лекарственных средств, средств перемещения для ДНК, а также биомаркеров различных заболеваний [159, 252] и тоже могут выступать в качестве источника кремния.

Считается, что наиболее биодоступной формой кремния является свободная ортокремниевая кислота, которая также способна образовываться при расщеплении соляной кислотой желудка пищи, содержащей соединения кремния. Она имеет способность абсорбироваться в желудочно-кишечном тракте (до 43%), диффундировать через мембраны и проникать в кровоток. В то же время такие формы кремния, как олигомерные и полимерные, всасываются плохо, и их биодоступность составляет менее 5% при пероральном поступлении. В исследованиях *in vitro* выявлены пути проникновения ортокремниевой кислоты через слизистую оболочку кишечника: первый путь – посредством пассивной диффузии; второй – облегченной диффузии, накапливаясь внутриклеточно [22, 141, 253, 282]. Также в моделях *in vitro,* которые имитировали пищеварение человека, было выявлено, что аморфный диоксид кремния (Е551) в желудочно-кишечном тракте распадался на частицы различных размеров в диапазоне от 5 до 200 нм и присутствовал на всех этапах пищеварения [243]. В экспериментах *in vivo* было выявлено, что самые мелкие наночастицы аморфного диоксида кремния индуцировали окислительный стресс и приводили к возникновению воспалительной реакции, способствующей повышенной проницаемости стенки кишечника [271]. При этом оказалось, что аморфный диоксид кремния при его

внутрижелудочном введении вызывал дисфункцию и повреждение стенки кишечника и воздействовал на состояние его микробиоты [265].

Обнаружено, что наночастицы кремния способны проникать в ядро, вызывая повреждение ДНК, приводить к накоплению внутриядерных белков в клетках, окислительному повреждению, запуску апоптоза [135, 235, 277].

У самцов крыс линии Вистар, которые подвергались пероральному воздействию наночастиц диоксида кремния размером 10–15 нм, гистопатологические исследования выявляли повреждение тканей почек (отек и некроз клеток), легких (интерстициальный пневмонит и бронхопневмония) и семенников (нарушение сперматогенеза). Биохимические параметры крови, такие как уровни альбумина, щелочной фосфатазы и аспартатаминотрансферазы, показали значительное повышение, указывающее на дисфункцию печени [195].

Hassankhani R. с соавторами (2015) обнаруживали те же изменения в почках лабораторных мышей, что и Badawy M. M. с коллегами (2023). Так, у всех мышей, подвергавшихся воздействию наночастиц диоксида кремния в течение 5 дней, наблюдалось повреждение почек в виде отека, гидропической дегенерации, некроза эпителиальных клеток в почечных канальцах, застойных явлений, увеличения капсулы Шумлянского – Боумена, гиалиновых капель, сегментаций клубочков и набухания канальцев. Авторы сообщили, что уровни мочевины в сыворотке крови значительно повысились, но не было очевидных различий между уровнем креатинина в контрольной и опытной группах [195, 212].

Исследователями обнаружено, что наночастицы диоксида кремния оказывали токсическое воздействие на надпочечники. Так, в экспериментах Badawy M. M. с соавторами (2023) было выявлено заметное увеличение уровня кортизола и массы надпочечников крыс опытной группы, получавших перорально наночастицы диоксида кремния, растворенные в дистиллированной воде, в дозе 100 мг/кг в сутки через зонд в течение 90 дней.

Гистопатологическое исследование выявило нарушение архитектуры коры надпочечников и расширение кровеносных синусоидов. Большинство клеток коры, по-видимому, имели вакуолизированную цитоплазму и сморщенные пикнотические ядра [212].

Ранее в работе Almanaa T. N. с соавторами (2022) сообщалось о подобных реакциях со стороны надпочечников, что проявлялось повышением уровня кортизола у крыс, получавших перорально наночастицы диоксида кремния в дозе 125 мг/кг в сутки в течение четырех дней [260].

В разные периоды исследователями Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова были изучены различные аспекты воздействия кремния на организм человека, которые отчасти были упомянуты выше. Более того, данные исследования были подкреплены многочисленными экспериментами на лабораторных животных [23, 37, 93, 108, 109, 116]. Также учеными обнаружено участие кремния, в сочетании с дисбалансом других микроэлементов [107, 115], в формировании дисбактериозов кишечника, атеросклероза [96, 103, 112] и аутоиммунных процессов [58, 94, 115].

Известно, что кремний способен конкурентно связываться с алюминием и снижать его токсичность. Поэтому нередко соединения кремния рассматривались в качестве вещества для лечения и профилактики заболеваний, вызванных избыточным поступлением алюминия [168, 203, 263]. Однако последние данные свидетельствуют о том, что использование наночастиц кремнезема в качестве средств для доставки лекарственных препаратов приводит к возникновению нейродегенеративных изменений, а также к повышению содержания белка бета-амилоида [167, 289, 292]. Еще век тому назад (1924) Domagk G. выявил взаимосвязь между поступающей в кровоток кремниевой кислотой и образованием вышеназванного белка [165].

В экспериментах на лабораторных мышах, получавших наночастицы диоксида кремния из расчета 2 мг/кг массы тела (36 инъекций), были

обнаружены поведенческие нарушения, в том числе у мышей опытной группы наблюдались склонность к депрессии и снижение памяти [137].

Силиконовые имплантаты, используемые в пластической и реконструктивной хирургии, в долговременной перспективе остаются малоизученными. Следовательно, вопрос об их безопасности до сих пор до конца не раскрыт. Dijkman H. B. P. M. с соавторами (2021) исследовали женщин, которые перенесли удаление или ревизию имплантатов, и выявили «утечку» силикона (98,9% случаев), миграцию частиц силикона за пределы капсулы (86,6%) [163].

Такие заболевания, как силикоз легких, и его осложнение – рак легких, также являются результатом длительного, хронического воздействия наночастиц кремния (при производстве строительных материалов, добыче полезных ископаемых) на дыхательные пути человека. Учитывая широкую распространенность наночастиц кремния, можно сделать вывод, что человек подвергается их воздействию не только на производстве, но и в повседневной жизни [159, 252].

Журавский С. Г. с соавторами (2016) в экспериментах на лабораторных крысах с внутривенным введением суспензии наночастиц диоксида кремния сферической формы размером 13 ± 2 нм (2 мг/мл) на 21-й и 60-й день обнаружили нарастание диффузной инфильтрации альвеолярных перегородок макрофагами и лимфоцитами [71].

Обнаружено, что внутривенное введение наночастиц диоксида кремния приводило к развитию хронического асептического продуктивного воспаления такого же характера, как и при силикозе легких [12].

Из вышесказанного можно сделать вывод, что все больше исследователей подвергает сомнению утверждение о биологической инертности кремния.

## 1.3. Кремниевые биогеохимические провинции Чувашской Республики и их связь с заболеваемостью населения

Важное значение в работе имеет предложенное в 2001 г. Сусликовым В. Л. эколого-биогеохимическое зонирование территории Чувашской Республики, согласно которому вся территория была разделена на четыре зоны: оптимума, кризиса, риска и бедствия (Рисунок 1).


Рисунок 1 – Карта эколого-биогеохимического зонирования Чувашской Республики, предложенная В. Л. Сусликовым (2001 г.)

Были выделены четыре биогеохимические провинции, в которых преобладало содержание того или иного микроэлемента. Так, к территориям с высоким содержанием кремния в питьевой воде и почве были причислены все

районы (в настоящее время муниципальные округа), располагающиеся в западной части республики в долине реки Суры. Такая тенденция связывалась с нахождением этой зоны в бывшей акватории Юрского и Мелового морей с кремниевыми и кальциевыми донными отложениями [110, 111]. Анализ питьевой воды с зон оптимума (г. Чебоксары), кризиса (г. Цивильск) и бедствия (Красночетайский муниципальный округ) подтвердил сохраняющуюся тенденцию к повышенному содержанию кремния в питьевой воде у последних (Приложение А).

Сапожников С. П. (2001), Толмачева Н. В. (2011) обнаружили у жителей Присурских районов нарушения обменных, биохимических, гормональных, иммунных и микробиологических показателей в организме [93, 116]. Так, у практически здоровых людей наблюдали нарушения толерантности к глюкозе, повышенный уровень гидроперекисей липидов и малонового диальдегида, высокое содержание натрия, кальция, хлора, мочевой кислоты, инсулина, холестерина, сниженный уровень тиреотропного гормона, дисбактериоз кишечника. Кроме того, в данной эколого-биогеохимической зоне сохранялись высокие показатели хронических неинфекционных заболеваний, превышающие среднереспубликанские в 2–3 раза, а также отмечались наиболее высокие показатели смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, злокачественных новообразований и сахарного диабета [110].

По данным Постановления Кабинета Министров Чувашской Республики от 12.07.2023 № 462 «О государственном докладе “О состоянии здоровья населения Чувашской Республики в 2022 году”», наиболее высокие показатели заболеваемости инфарктом миокарда наблюдались в Шумерлинском (включая г. Шумерлю), Алатырском (включая г. Алатырь), Батыревском, Моргаушском, Ядринском муниципальных округах, в Чебоксарском, Новочебоксарском, Канашском городских округах. По распространенности болезни системы кровообращения в 2022 г. на 1 тыс. человек населения отличились Порецкий,

Ядринский, Ибресинский, Красночетайский, Канашский муниципальные округа [81].

Относительно смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (инфаркт миокарда, инсульт) ведущее место занимали Шумерлинский муниципальный округ и г. Шумерля, Алатырский и Красночетайский муниципальные округа. Что касается смертности от новообразований на 100 тыс. человек населения, то здесь преобладали Порецкий, Алатырский, Шумерлинский, Красночетайский, Аликовский, Красноармейский, Мариинско-Посадский, Козловский муниципальные округа. По распространенности заболеваний эндокринной системы в лидерах были Красночетайский, Порецкий, Янтиковский, Ибресинский, Чебоксарский муниципальные округа и г. Чебоксары, Шемуршинский, Комсомольский, Яльчикский муниципальные округа [81]. Следовательно, данная тенденция, выявленная еще в 2011 г., до сих пор не изменилась.

Сусликовым В. Л. с соавторами (1978) высказано предположение о взаимосвязи между содержанием кремния в питьевой воде и заболеваемостью мочекаменной болезнью населения Чувашской Республики [108]. При этом имеет большое значение именно дисбаланс микроэлементов, сопровождающийся в данном случае, а не прямое повреждающее воздействие. Зарубежными учеными также было обнаружено, что изменение соотношения между такими микроэлементами, как кальций, фосфор и кремний, при ощелачивании мочи создает предрасположенность к образованию камней [274]. Сусликов В. Е. и Толмачева Н. В. (2007) у жителей Присурских районов Чувашии выявили неадекватную реакцию выделения кальция и фосфора с мочой при нагрузке лактатом кальция, резкое снижение клиренса креатинина на фоне водной нагрузки у взрослых, высокий уровень кальция в крови, как у взрослых, так и у детей, а также сниженную реабсорбцию фосфора и гиперпаратгормонемию [110].

По данным на 2021 г. первичная заболеваемость мочекаменной болезнью среди жителей Чувашской Республики составила 1,23 на 1 тыс. населения, что в принципе соответствовало показателям по Приволжскому федеральному округу и Российской Федерации в целом. Однако анализ показателей заболеваемости выявил, что в республике имеются районы, в которых преобладает заболеваемость мочекаменной болезнью, – это Батыревский, Комсомольский, Алатырский районы и г. Новочебоксарк, Канаш, Алатырь. В упомянутых районах и городах заболеваемость превышала в 1,5 и более раза общую первичную заболеваемость по Чувашии и другим регионам [40, 45].

Отсюда следует, что зависимость между заболеваемостью хроническими неинфекционными заболеваниями и биогеохимическим районированием действительно прослеживается, и более того, сохраняет данную тенденцию в настоящее время.

К сожалению, судить о зависимости между зонами бедствия и заболеваниями печени у жителей Чувашской Республики по докладу не представляется возможным в связи с отсутствием подробных данных, а также с трудностями исключения поражения печени другой этиологии, в связи с активным его участием во многих процессах. Тем не менее изложенный далее материал позволяет всесторонне оценить важность печени в метаболизме данного микроэлемента.

## 1.4. Морфофункциональная характеристика печени

### 1.4.1. Гистологическое строение печени

Печень состоит из стромы и паренхимы. Строма – это толстая соединительнотканная капсула, которая покрывает печень снаружи. Прослойки

соединительной ткани, отходящие от нее, разделяют паренхиму органа на множественные дольки, которые, в свою очередь, образуют структурно-функциональную единицу печени [39]. Печеночная долька имеет форму шестигранной призмы, размер которой в среднем составляет примерно 1,5 мм [72]. При этом в печени насчитывается около полумиллиона печеночных долек. Для понимания микроскопической структуры печеночных долек необходимо упомянуть особенности их кровоснабжения. Всю кровеносную систему печени можно разделить на две большие группы: система притока (ветви печеночной артерии и воротной вены) и оттока. Так, ветви печеночной артерии и воротной вены, войдя в область ворот печени, разделяются на долевые, сегментарные, междольковые и вокругдольковые артерии и вены, которые далее отдают короткие артериолы и венулы, входящие в печеночную дольку и при слиянии образуют синусоидные капилляры (смешанная кровь), располагающиеся между печеночными балками. Из синусоидных капилляров кровь собирается в центральную вену, от которой по собирательным, поддольковым, печеночным венам (в количестве 3–4) доносится в нижнюю полую вену. Синусоидные капилляры образованы эндотелиоцитами и базальной мембраной, которая на большем своем протяжении может отсутствовать. Между эндотелиоцитами располагаются поры, звездчатые макрофаги печени, кроме них встречаются звездчатые клетки, pit-клетки. Между гепатоцитами и стенкой синусоидного капилляра располагается пространство Диссе, которое заполнено перисинусоидальными липоцитами, микроворсинками гепатоцитов и эндотелиоцитов, ретикулярными волокнами, количество которых увеличивается к периферии печеночной дольки [39, 236]. Печеночные пластинки образованы двумя рядами гепатоцитов, которые тесно прилегают и соединяются между собой с помощью десмосом, щелевыми и плотными контактами. В центре печеночных балок располагаются желчные канальцы, ограниченные билиарной поверхностью гепатоцитов, обращенных во внутреннюю сторону. При этом желчь, которая синтезируется гепатоцитами и

попадает в желчные капилляры, оттекает от центра печеночной дольки к периферии в сторону триад. Далее эти канальцы впадают в холангиолы, междольковые, сегментарные, долевые печеночные протоки, в общий печеночный, пузырный и общий желчный протоки [39, 41, 42].

При рассмотрении печеночных долек также следует упомянуть о зональном их строении. Области печеночных долек, окружающие ветви печеночной артерии и воротные вены, носят название перипортальных (зона 1), прилегающие к центральной вене – перицентральных (зона 3), а клетки между этими двумя областями являются среднедольковыми (зона 2) [33]. Течение крови в печеночной дольке в сторону центральной вены приводит к тому, что гепатоциты, поглощая кислород, питательные вещества, метаболизируя гормоны, активно формируют свое микроокружение и участвуют в создании так называемой перипортально-перицентральной оси. Этот градиент является одним из основных факторов дифференциальной экспрессии генов и последующей гетерогенности гепатоцитов внутри долек. Так, например, за счет неравномерной выработки ферментов синтез глутамина возможен только первыми двумя слоями гепатоцитов перицентральной области, в то время как уреагенез ограничен перипортальной областью печеночной дольки [177]. По поводу активности гепатоцитов в так называемых зонах печеночной дольки имеются различные мнения. Noël R. (1923) в свое время разделил дольку печени крысы на три зоны, обозначив их следующим образом: зона постоянной активности (перипортальная), промежуточная зона (средняя долька) и зона постоянного покоя (перицентральная). Им было выявлено, что митохондрии внутри гепатоцитов были больше и более сферическими в перипортальной зоне и становились более удлиненными по направлению к центральной вене [234]. С развитием новых технологий исследование печени позволило выявить, что различные гены печени экспрессируются неравномерно, а именно зонированно. Так, в среднедольковом слое в гепатоцитах выявлялись гены HAMP и HAMP2 (кодирующие белок гепсидин), которые участвуют в регуляции уровня железа в

печени, но при этом эти гены отсутствуют в гепатоцитах перицентральных и перипортальных зон [158]. Ben-Moshe S. и др. (2019) создали протеомную карту и обнаружили корреляцию между экспрессией генов и белков. Данная находка указывала на то, что преобладающая регуляция гетерогенности гепатоцитов происходит на уровне транскрипции. Однако несколько генов демонстрировали противоречие в экспрессии между мРНК и белком [138].

Использование scRNA-seq (одноклеточное секвенирование) и smFISH (флуоресцентная гибридизация одиночных молекул *in situ*, Single molecule fluorescence *in situ* hybridization) подтвердило, что гены, ответственные за детоксикацию и метаболизм лекарственных средств, имеют более высокую экспрессию в гепатоцитах перицентральных областей печеночных долек печени мышей [267, 269].

Гепатоциты, составляющие 60% всех клеток печени, имеют многоугольную форму, а также одно или несколько ядер. Каждый гепатоцит имеет две поверхности – васкулярную (секретирует в кровь белки, глюкозу, липидные комплексы с помощью расположенной с этой стороны гепатоцита гладкой и гранулярной эндоплазматической сети, рибосом и митохондрий) и билиарную (вырабатывает желчь с помощью комплекса Гольджи, периксосом и гладкой эндоплазматической сети). Первая обращена в сторону синусоидного капилляра, вторая – в сторону желчного капилляра [41, 42]. Соответственно, при повреждении гепатоцитов нередко происходит смешивание желчи с кровью, которое приводит к появлению желтушности [64].

Кроме ранее упомянутой «классической» печеночной дольки, в печени также есть так называемая портальная долька, имеющая треугольную форму за счет того, что образована тремя центральными венами классической печеночной дольки, а также печеночный ацинус, который имеет форму ромба и образован двумя центральными венами печеночных долек, прилегающих друг к другу, и их триадами [41, 42, 156].

Важное место в регуляции тканевого гомеостаза, ремоделировании и регенерации печени играет внеклеточный матрикс печени. Главными его составляющими являются плотно расположенные волокна коллагена I и III типов, которые имеют фибриллярную структуру, коллаген IV, V и VI типов, гликозаминогликаны, протеогликаны, фибронектин и гиалуроновая кислота, образующая гелеобразную основу базальных мембран [33, 218]. Внеклеточный матрикс занимает около 3% относительной площади и 0,5% веса печени. Коллаген I типа и фибронектин в основном находятся вокруг гепатоцитов, ламинин и коллаген IV окружают желчный проток, а коллагены типов I, III и V в основном локализуются в оболочках воротной и центральных вен [156]. Коллаген IV типа связывается с ламинином и энтактином/нидогеном с образованием вещества, подобного базальной мембране, вдоль стенок синусоидов [136, 156]. Обнаруженная низкая плотность внеклеточного матрикса в перисинусоидальном пространстве, а также наличие фенестр в эндотелиальных клетках облегчают двунаправленный обмен веществ, происходящий между кровью и гепатоцитами, что также имеет решающее значение для поддержания дифференцировки соседних гепатоцитов в процессе регенерации [156].

### 1.4.2. Макрофаги, эозинофилы и тучные клетки печени

Резидентные макрофаги печени, или клетки Купфера, находятся в стенках синусоидов, составляя около 30% всех его клеток. Они же составляют примерно 80–90% общей популяции всех макрофагов в организме, в то время как красная пульпа селезенки содержит только 5–15% макрофагов, а оставшаяся часть макрофагов в основном находится в костном мозге, легких, надпочечниках, гипофизе и поджелудочной железе [297]. Изучение роли

макрофагов в процессах воспаления печени позволило разделить их на две противоположные по функциям популяции – M1 и M2, где M1-поляризованные макрофаги реализуют цитотоксичность, поддерживая воспаление, а M2-поляризованные ответственны за процессы репарации [85, 121, 210]. Фенотипически M1-поляризованные макрофаги экспрессируют MHC II класса (главный комплекс гистосовместимости II класса, major histocompatibility complex class II), CD68 (кластер дифференцировки согласно номенклатуре), CD80, CD86 [240]. Активируются они различными патогенами или токсинами и секретируют провоспалительные медиаторы (TNF-α (фактор некроза опухоли-α, tumor necrosis factor-α), IL-1β (интерлейкин-1β, interleukin-1β), IL-6 (интерлейкин-6, interleukin-6), iNOS (индуцируемая NO-синтаза, inducible nitric oxide synthase) и MMPs (матриксные металлопротеиназы, matrix metalloproteinases)). M2-поляризованные макрофаги печени, напротив, активируются сигнальным путем IL-4/IL-13 (интерлейкин-4/интерлейкин-13, interleukin-4/interleukin-13) и высвобождают противовоспалительные цитокины (ARG-1 (аргиназа-1, arginase 1), CD206 (рецептор маннозы, mannose receptor), IL-10 (интерлейкин-10, interleukin-10) и TGF-β (трансформирующий фактор роста-β, transforming growth factor beta)) [208]. Новые данные позволили выявить в печени как минимум три популяции клеток, имеющих моноцитарно-макрофагальное происхождение: клетки Купфера, клетки, имеющие промежуточный между моноцитом и макрофагом фенотип, и отдельную популяцию составляют макрофаги капсулы печени, перитонеальные макрофаги и макрофаги, ассоциированные с желчными протоками [38].

Не менее важными компонентами иммунной системы, обнаруживающимися в печени, являются тучные клетки. Они происходят из гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, где представлены в виде недифференцированных CD34-, CD117-позитивных клеток-предшественников [174]. Известно, что они участвуют во многих физиологических и патологических процессах. Во всех случаях тучные клетки реагируют

высвобождением разнообразных медиаторов, оказывая противовирусную, противомикробную, противопаразитарную, иммунную, метаболическую и многие другие функции [53, 130, 290]. Кроме этого, они принимают непосредственное участие в различных воспалительных и аутоиммунных реакциях печени, включая отторжение трансплантата [175]. Тучные клетки вовлечены в поддержание биоаминного гомеостаза в ходе обмена веществ, процессы опухолевого роста, развитие воспалительных и аутоиммунных реакций [6, 11, 117, 118, 145, 220]. Они делятся на два класса: содержащие триптазу и содержащие триптазу и химазу. В печени они располагаются преимущественно в области крупных сосудов, портальных зон. Обнаружено, что количество тучных клеток увеличивается по мере прогрессирования цирроза. При повреждении печени (гепатит, фиброз, цирроз и другие) тучные клетки активируются, их количество увеличивается и при дегрануляции высвобождаются различные медиаторы, такие как гистамин, гепарин, триптаза, химаза, TGF-β1 (трансформирующий фактор роста бета-1, transforming growth factor beta 1), TNF-α, интерлейкины (ILs), цитокины, основной фактор роста фибробластов (bFGF), лейкотриены (LT) B4 и D4, простагландины и другие [174, 221]. Защитные свойства тучных клеток во многом связаны с содержащимся в них гепарином. Гепарин – гликозаминогликан, способный связываться со многими биологически активными соединениями, в том числе и токсическими веществами, обезвреживая их. Действие гепарина непосредственно связано с защитными реакциями при повреждении тканей [180, 204, 296]. Гепарин тучных клеток составляет матрикс для обеспечения оптимального расположения, хранения и регуляции экспорта синтезируемых медиаторов, в отношении к которым он проявляет регуляторные свойства [55, 246].

Эозинофилы в небольшом количестве в норме присутствуют в печени. Традиционно считалось, что количество эозинофилов возрастало при паразитарных инвазиях, аллергических заболеваниях. Однако недавние

исследования выявили, что эозинофилы участвуют в процессах разрешения воспаления и способствуют восстановлению тканей [181]. Так, при экспериментальном токсическом гепатите обнаружено рекрутирование эозинофилов в печень. Важную роль в этом процессе играли макрофаги, которые под воздействием IL-33 (интерлейкин-33, interleukin-33), высвобождающегося из поврежденных клеток печени, продуцировали цитокин CCL24 (лиганд 24 хемокина CC-модифицированного, chemokine (C-C motif) ligand 24), привлекающий эозинофилы. В свою очередь, эозинофилы под влиянием интерлейкина-33 высвобождали интерлейкин-4, который также оказывал влияние на продукцию макрофагами цитокина CCL24 [170].

### 1.4.3. Функции печени и механизмы ее регенерации

Печень – самая крупная железа в нашем организме. Она является наиболее важным центром для многочисленных физиологических процессов, таких как метаболизм макроэлементов, регулирование объема крови, поддержка иммунной системы, гомеостаз липидов и холестерина, а также расщепление ксенобиотических соединений, включая многие современные лекарства. Переработка, разделение и метаболизм макроэлементов обеспечивают энергию, необходимую для осуществления вышеупомянутых процессов, и поэтому являются одними из наиболее важных функций печени. Более того, способность печени накапливать глюкозу в форме гликогена при питании и собирать глюкозу через глюконеогенный путь в ответ на голодание имеет решающее значение в условиях его недостаточного поступления. Печень окисляет липиды, но также может упаковывать избыток липидов для секреции и хранения в других тканях, например в жировой. Она же выполняет функцию кроветворного органа во время внутриутробного развития.

Экскреторная функция печени связана с образованием и выделением желчи, состоящей из желчных кислот, фосфолипидов, холестерина и желчных пигментов. Важнейшим является и ее эндокринная функция: в печени дейодируется тироксин в трийодтиронин; синтезируется кальцитриол из витамина Д; ИФР-1 (инсулиноподобный фактор роста-1), секретируемый клетками печени, регулирует высвобождение соматостатина; под воздействием аминооксидаз окисляются катехоловые амины; преобразование эстрадиола и эстрона в эстриол, инактивация стероидных гормонов путем микросомального окисления и синтез специфических гидролаз (вазопрессиназа, инсулиназа) также происходит в изучаемом органе [33, 77]. Особенно важное значение имеет дезинтоксикационная функция печени, которая заключается в обезвреживании токсических продуктов как эндогенного, так и экзогенного происхождения, попадающих в печень по системе воротной вены. Наконец, печень является основным органом для метаболизма белков и аминокислот, поскольку она отвечает за большинство белков, выделяемых в кровь (независимо от их массы или диапазона), переработку аминокислот для получения энергии, удаление азотистых отходов (разложения белка в форме мочевины и его метаболитов). В ходе эволюции весь вышеназванный набор функций был объединен в одном органе – печени [82, 291].

Изменения этих функций нередко являются маркером повреждения печени. Однако для выраженной трансформации нормальной структуры печени воздействие повреждающих факторов должно быть значительным. Учитывая, что печень нередко подвергается воздействию различных факторов, в данном органе хорошо развиты механизмы регенерации. На сегодняшний день это единственный орган, который способен самовосстанавливаться до исходных размеров.

Так, при активации процессов регенерации в печени увеличивается число делящихся клеток. Одновременно возрастает количество делящихся

полиплоидных клеток с образованием диплоидных. В результате этого печень за достаточно короткое время восстанавливает свои возможности [38, 41, 42].

Классическая модель, используемая для изучения процессов регенерации печени, – это восстановление массы печени после резекции 70% по методу Higgins G. M., Anderson R. M. (1931) [226]. При этом регенерация печени после такой резекции происходит путем регенерационной гипертрофии, то есть за счет пролиферации гепатоцитов и других клеток органа. Однако удаленная доля при этом обратно не восстанавливается [39, 101]. Существует ряд других экспериментальных моделей для изучения данного процесса. Особый интерес представляет исследование регенерации в условиях острого или хронического токсического повреждения печени различными веществами (спиртом, четыреххлористым углеродом, нестероидными противовоспалительными препаратами и другими). Отличительной чертой при этом является лейкоцитарная инфильтрация, на фоне которой в дальнейшем наблюдаются пролиферативные процессы в гепатоцитах и других клетках печени. При хроническом повреждении печени нередко происходит разрастание соединительной ткани с развитием фиброза [39].

Споры о том, с какой области начинается процесс регенерации печени, ведутся многие годы. Первоначальные экспериментальные модели, позволяющие исследовать данный вопрос, выявили, что новые гепатоциты образовывались в перипортальных областях и затем мигрировали к центральной вене дольки [202, 302]. Позже обнаружено, что пролиферация гепатоцитов преимущественно идет за счет клеток зоны 2 при участии циклина D1 (белок клеточного цикла), регулирующего переход от G1- к S-фазе клеточного цикла [164]. Недавно выяснилось, что регенерация печени после частичной гепатэктомии у мышей осуществляется равномерно по всей печени [133]. И наоборот, было также обнаружено, что перипортальные гепатоциты стимулируют регенерацию и пролиферацию после повреждения печени у мышей с гепатоцеллюлярной карциномой [190]. Эти расхождения могут

указывать на то, что имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о том, что процесс восстановления печени во многом зависит от состояния как самого органа, так и от зоны его повреждения [158, 237].

## 1.5. Токсическое действие соединений кремния на печень в эксперименте

Печень получает 75% своего кровоснабжения из воротной вены, которая, в свою очередь, собирает кровь, насыщенную различными веществами от непарных органов брюшной полости (кроме нижней трети прямой кишки) [127, 149]. Подвергая сомнению утверждение о биологической инертности кремния, можно предположить, что соединения кремния, в случае их перорального поступления, будут всасываться через стенки желудочно-кишечного тракта и в первую очередь с кровотоком попадать в печень. Соответственно, если соединения кремния обладают токсичным действием, то наиболее ранние изменения будут выявлены в изучаемом органе. Кроме того, печень является основным органом, участвующим в метаболизме и детоксикации [212].

Количество имеющихся на сегодняшний день публикаций как отечественных, так и зарубежных ученых еще раз подтверждает сохранение интереса к проблеме воздействия различных соединений кремния на организм человека, в особенности на печень.

Исследования Tassinari R. с соавторами (2020) показали, что введение аморфного диоксида кремния через желудочный зонд в течение 90 дней в разной дозировке приводило к: вакуолизации гепатоцитов (50 мг/кг в сутки); внутридольковой лимфоидной инфильтрации (2; 10; 20 и 50 мг/кг в сутки); увеличению синусоидных капилляров (10; 20 и 50 мг/л в сутки); стазу крови в синусоидных капиллярах (2; 20 и 50 мг/л в сутки) [179].

Последние исследования, изучающие воздействие наночастиц диоксида кремния на печень лабораторных крыс, проведенные под руководством Tassinari R. (2021), выявили увеличение размера печени, а также образование воспалительных гранулем в ней. При этом схема эксперимента была следующей: три экспериментальные группы (3 крысы самки и 3 крысы самца) получали инъекции стерильного физиологического раствора, однократную внутривенную инъекцию диоксида кремния 20 мг/кг из расчета на массу животного, внутривенные инъекции диоксида кремния в той же дозировке в течение 5 дней соответственно. Выведение животных при этом было проведено только через 90 дней от начала эксперимента [132].

Другие авторы в экспериментах на лабораторных крысах с пероральным поступлением кремния (NM-202) в дозировке 100; 500 и 1000 мг/кг массы тела в течение 28 дней в составе корма и шоколадного молока схожих изменений не фиксировали. Тем не менее было отмечено, что у крыс, получавших кремний в дозировке 1 г/кг массы тела, возрастала частота случаев фиброза печени [275]. Схожие с предыдущими результатами изменения обнаруживались в печени крыс, получавших наночастицы кремнезема размером 5–15 нм в дозе 500 мг/кг и 1 г/кг массы тела в сутки в течение двух недель [251].

В экспериментах на лабораторных мышах, которые получали аморфный диоксид кремния с размером частиц около 20 нм в дозе 4,8 мг/кг массы тела животного в течение полутора лет, были выявлены изменения в печени, в том числе отложение кремнезема. Так в печени наблюдались очаги лимфоцитарной инфильтрации портальных зон, среди которых обнаруживались единичные апоптотические тельца [153].

Yu Y. с соавторами (2017) выявили, что пятикратное внутривенное введение наночастиц диоксида кремния лабораторным мышам в дозировке 20 мг/кг с регулярностью 1 раз в каждые 3 дня приводило к снижению массы тела, увеличению размеров печени, концентрации в крови АЛТ (аланинаминотрансфераза) и АСТ (аспартатаминотрансфераза).

Гистологическое исследование печени мышей, выведенных из эксперимента на 15-й и 30-й день с момента первой инъекции, выявляло многоклеточные гранулемы с большим количеством макрофагальных фагоцитов и воспалительную клеточную инфильтрацию. На 60-й день эксперимента в образовавшихся гранулемах печени появлялось больше коллагеновых волокон. При этом размеры гранулем с увеличением длительности эксперимента изменялись в сторону их уменьшения. Кроме того, в печени всех экспериментальных групп наблюдались полнокровие синусоидных капилляров и центральных вен, повреждение гепатоцитов вплоть до апоптоза. Анализ окислительного повреждения липидов печени мышей опытных групп выявлял повышение содержания малонового диальдегида на 15-й и 30-й дни от начала эксперимента [261].

Подобное снижение массы тела у крыс и мышей в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 10 мг/л в пересчете на кремний наблюдалось также в исследованиях Гордовой В. С. с соавторами (2021) [24].

Nabeshi H. С. соавторами (2012) определили среднюю летальную дозу (LD50) для наночастиц диоксида кремния размером 70 нм, вводимую лабораторным мышам в виде болюсной инъекции, которая составляла 45 мг/кг массы тела [131].

По мнению Yu Y. с соавторами (2013), предложенная вышеназванными авторами средняя летальная доза аморфного диоксида кремния, обусловлена способом и скоростью введения вещества. Методом Dixon up-and-down была выявлена LD50 (средняя летальная доза, median lethal dose) для аморфного диоксида кремния размером 64 нм, которая равнялась 262,45 ± 33,78 мг/кг. Кроме того, в ходе установления LD50 авторами были изучены следующие дозы аморфного диоксида кремния: 29,5; 103,5 и 177,5 мг/кг, которые вводились внутривенно, для определения острой токсичности соединения. В ходе экспериментов у мышей опытных групп отмечали повышение уровней

печеночных трансаминаз (АСТ, АЛТ, ЛДГ (лактатдегидрогеназа)), лимфоцитарную инфильтрацию ткани печени, образование гранулем в них, а также гидропическую дегенерацию ее гепатоцитов. Исследователи определяли и CD68-позитивные клетки печени. Введение аморфного диоксида кремния в дозах 103,5 и 177,5 мг/кг значительно увеличивало количество CD68-позитивных клеток в печени в 1,54 и 1,98 раза соответственно в сравнении с контрольными группами мышей [128].

Liu T. и коллеги (2011) обнаружили, что наночастицы диоксида кремния могут накапливаться главным образом в мононуклеарных фагоцитах печени мышей и индуцировать гепатотоксичность, проявляющуюся повышением уровней АЛТ и АСТ в сыворотке крови и лимфоцитарной инфильтрацией, повреждением гепатоцитов [268]. Hassankhani R. с соавторами (2015) также сообщали, что у мышей, получавших наночастицы диоксида кремния (SiNPs) (333,33 мг/кг/сут) в течение 5 дней, наблюдались гиперемия, отек гепатоцитов и клеточный некроз [195].

Исследование воздействия наночастиц аморфного диоксида кремния на печень лабораторных крыс *Rattus norvegicus domestica* в дозе 31,25; 52,5 и 125 мг/кг в виде инъекций выявило выраженную гепатотоксичность на обоих сроках выведения из эксперимента (через 24 и 96 часов) [260]. При этом выбор дозы для данного эксперимента был обусловлен средним ежедневным потреблением диоксида кремния – 9,4 мг/кг массы тела. Из них 1,8 мг/кг массы потребляемого диоксида кремния, приходились на нанодиапазон [242].

Недавнее исследование Sun M. с соавторами (2021) выявило, что интратрахеальная инстилляция аморфного диоксида кремния также приводила к дисфункции печени, о чем свидетельствуют заметные патологические изменения в ткани печени и зафиксированное явное повышение уровней АЛТ, АСТ и триглицеридов [225]. Zhou M. с соавторами (2019) обнаруживали аморфный диоксид кремния в ткани печени на 1-й и 7-й день после

воздействия на мышей внутривенной инъекции этих наночастиц в дозе 20 мг/кг [281].

Среди исследований отечественных авторов, занимающихся изучением воздействия различных соединений кремния, можно выделить работу Зайцевой Н. С. с соавторами (2016). Ими было исследовано воздействие аморфного диоксида кремния («Орисил 300») на морфологию печени при его пероральном поступлении. При этом лабораторные крысы опытных групп (2–5-ая группы) получали кремний внутрижелудочно первые 30 суток в виде обработанной ультразвуком суспензии в составе деионизованной воды. Далее опытные группы продолжали получать кремний в дозе 0,1; 1,0; 10 и 100 мг/кг массы тела в составе корма соответственно экспериментальным группам. У всех крыс 2–5-й групп были выявлены изменения в печени в виде эозинофильной инфильтрации портальных зон [14].

Юкина Г. Ю. с соавторами (2021) в экспериментах с однократным парентеральным введением 1 мл наночастиц диоксида кремния в дозе 7 мг/кг массы тела в концентрации 2 мг/мл обнаружили формирование гранулем и увеличение количества клеток Купфера в печени лабораторных крыс на 21-е сутки. Авторами было отмечено, что размеры гранулемы со временем стали уменьшаться и через полгода от начала эксперимента в печени обнаруживалось лишь асептическое воспаление [15].

Ранее тем же ведущим автором в составе коллектива изучалась реакция печени, легких и миокарда лабораторных крыс при однократном внутривенном введении 1 мл суспензии наночастиц диоксида кремния в дозе 2 мг/мл. Ими выявлена миграция тучных клеток в ткани изучаемых органов, образование макрофагальных «гранулем инородных тел», формирование ложных долек [12].

Введение наночастиц диоксида кремния размером 10 ± 20 нм в концентрациях 1; 10; 100 мг/кг массы тела в течение 28 дней приводило к изменению в спектре микросомальной фракции печени, включая подавление

биосинтеза идентифицированного белка GRP78 (глюкозо-регулируемый белок теплового шока 78, glucose-regulated protein 78). Данный белок локализован преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме и является одним из ключевых компонентов посттрансляционного процессинга белка в клетке [43].

Таким образом, обобщая данные обзора литературы, можно сделать выводы:

1. Опубликованные исследования отечественных и зарубежных авторов подтверждают важность изучения гистологического строения печени, в том числе исходя из того, что по данным литературы первые изменения при поступлении различных ксенобиотиков, в числе которых и кремний, будут обнаруживаться именно в данном органе.

2. Имеющиеся в настоящее время исследования преимущественно затрагивают вопросы, касающиеся изучения действия наноформ кремния в сроки, как правило, не превышающие одного месяца.

3. Исследований по изучению микроскопического строения печени в условиях длительного поступлении кремния с питьевой водой в дозе, не превышающей предельно допустимой, не было найдено.

4. Среди опубликованной литературы не обнаружено данных по изучению гистологического строения печени в условиях экспериментального воздействия водорастворимого кремния с одновременным использованием гистологических, люминесцентно-гистохимических и иммуногистохимических методов.

5. Использование комплексного подхода в изучении микроскопического строения печени позволит получить новые данные и расширить знания о характере изменений в органе на фоне длительного поступления кремния с питьевой водой в предельно допустимой концентрации.

# ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась в научной лаборатории кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» с 2013 г. и продолжается по настоящее время. Тема исследования одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» (заключение от 10.11.2023, протокол № 5).

На Рисунке 2 представлены материал и методы исследования, использованные в диссертационной работе.

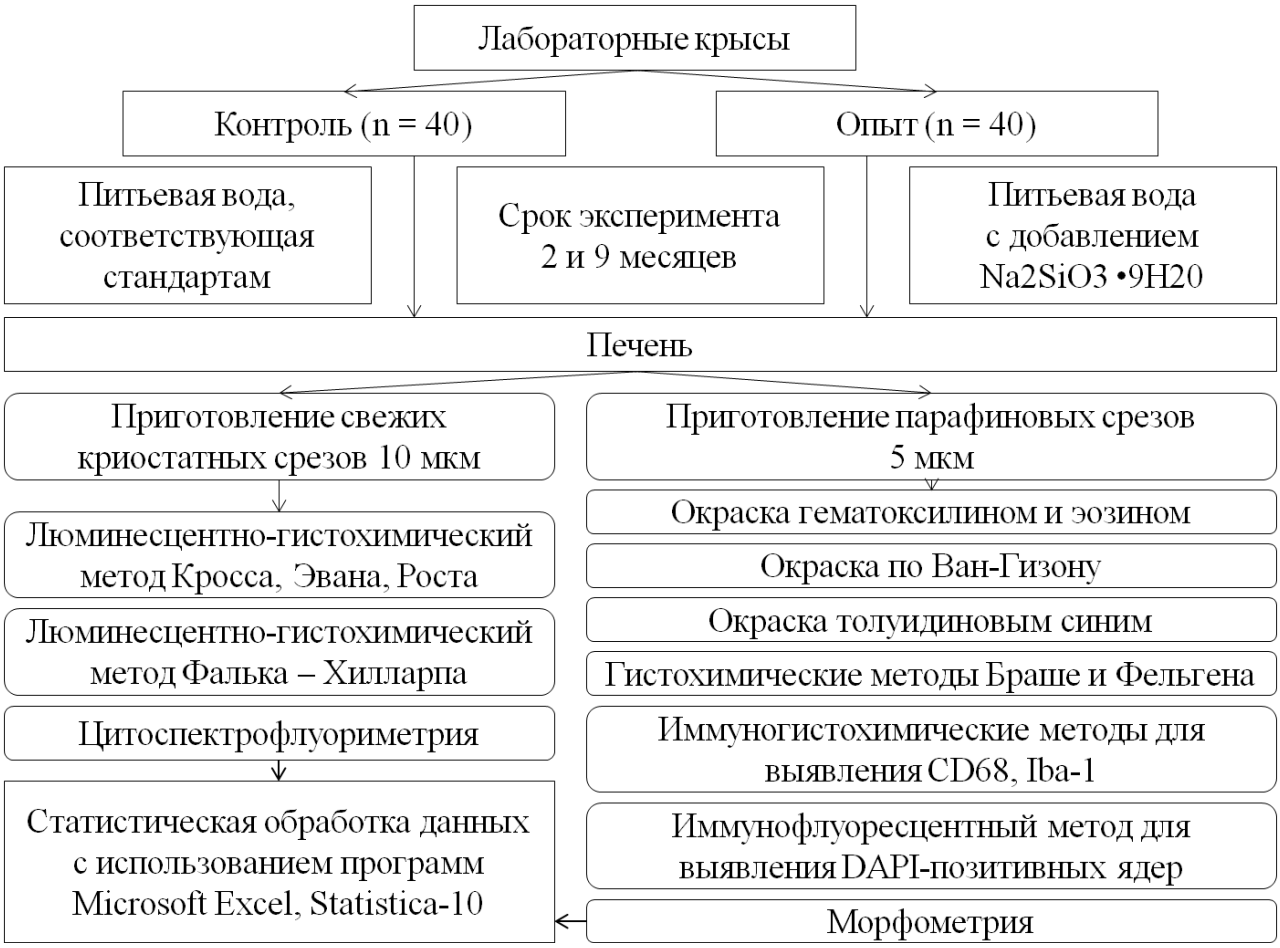



Рисунок 2 – Модель экспериментального исследования изучения воздействия водорастворимого кремния на печень лабораторных крыс

Далее в разделах 2.1. Материал исследования и 2.2. Методы исследования приводится подробное описание каждого из них.

## 2.1. Материал исследования

Исследовалась печень нелинейных белых крыс-самцов (n = 80). Все животные были одного возраста (60 ± 2 дня) и примерно одной массы тела (112,3 ± 7,77 грамма), содержались в обычных условиях вивария при естественном освещении. Уход за всеми животными осуществлялся в соответствии с рекомендованными правилами и нормами [25, 26, 61].

В основе эксперимента – изучение влияния водорастворимого девятиводного метасиликата натрия ($Na_2SiO_3 \times 9H_2O$) на микроскопическую структуру печени лабораторных животных при поступлении его с питьевой бутилированной водой «Сестрица Природная», соответствующей стандартам. В настоящий момент на территории Российской Федерации содержание кремния в питьевой воде централизованного, в том числе горячего, и нецентрализованного водоснабжения, воде подземных и поверхностных водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования, воде плавательных бассейнов, аквапарков регламентируется СанПиН 2.1.3684-21 и СанПиН 1.2.3685-21 [91, 92].

Схема эксперимента была следующей: животные разделялись на контрольную и опытную группы. Контрольная группа животных (n = 40) получала питьевую бутилированную воду «Сестрица Природная». Опытная группа (n = 40) получала ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия с доведением общей концентрации кремния до 20 мг/л. В среднем каждое животное получало кремния 0,8–1,2 мг/кг. Массовая концентрация растворенных форм кремния в экспериментальной воде определялась с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES, а жесткость воды – с помощью тест-полосок

индикаторных для анализа воды Биосенсор-Аква-5 (Производитель ООО «Биосенсор АН») (Таблица 1).

Таблица 1 – Содержание кремния в воде, используемой в эксперименте

| Показатель | Единица измерения | Вода питьевая бутилированная | | Вода питьевая бутилированная с добавлением девятиводного метасиликата натрия | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Результат | Погрешность | Результат | Погрешность |
| Водородный показатель (pH) | ед. pH | 6,5 | 0,2 | 6,6 | 0,2 |
| Жесткость воды | мг-экв./л | 3,2 | - | 3,2 | - |
| Массовая концентрация кремния | мг/дм$^3$ | 10,5 | 1,6 | 21,9 | 3,3 |
| Массовая концентрация растворенных форм кремния | мг/дм$^3$ | 10,491 | - | 20,002 | - |

Эксперименты проводились в течение двух и девяти месяцев. Животные обеспечивались свободным доступом к питьевой воде. Девятиводный метасиликат натрия для насыщения питьевой воды кремнием был выбран в связи с его водорастворимостью, а также с уже имеющимся опытом его использования другими исследователями [23, 36, 37, 93]. Все действия, предусматривавшие контакты с экспериментальными животными, осуществлялись согласно «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18.03.1986.

Взвешивание животных за время эксперимента проводилось два раза на электронных весах ISA SF-400: в первый и последний день эксперимента. Через два месяца путем дислокации шейных позвонков было выведено из эксперимента 40 животных (контрольные – 20 штук; опытные – 20 штук), через девять месяцев – остальные (контрольные – 20 штук; опытные – 20 штук). Забор печени лабораторных крыс проводился в одно и то же время суток, примерно с 15 до 17 часов, чтобы избежать разброса данных по содержанию биогенных аминов, связанных с суточными колебаниями [76, 98, 106]. Печень после извлечения взвешивалась на торсионных весах ВТ-500. Далее часть печени замораживалась в криостате для приготовления свежезамороженных срезов, остальная фиксировалась в 10% нейтральном забуференном формалине для последующей заливки в парафин и приготовления парафиновых срезов толщиной 5 μm. После депарафинированные срезы подвергались стандартным гистологическим окрашиваниям и обработке иммуногистохимическими методами [57].

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Морфологические методы

#### 2.2.1.1. Гистологические методы

Часть печени лабораторных крыс, которая фиксировалась в 10% нейтральном забуференном формалине, заливалась в парафин с формированием парафиновых блоков, использовавшихся для приготовления гистологических срезов толщиной 5 μm. После депарафинизации срезы печени лабораторных

животных окрашивались общегистологическими методами: гематоксилином и эозином, толуидиновым синим, по Ван-Гизону, метиловым зелёным-пиронином по методу Браше и методом Фельгена [5, 57, 68].

1. Окраска гематоксилином и эозином – это наиболее распространенный метод окрашивания, который применяется для описания общегистологической структуры ткани, выявления клеточных и неклеточных структур. Данный метод использовался для визуального сравнения гистологического строения печени лабораторных животных, а также для проведения морфометрии различных структур изучаемого органа [56, 57, 63].

2. Окраска толуидиновым синим по методу Унна использовалась для качественной и количественной характеристики тучных клеток печени [27, 88]. Для количественной оценки тучные клетки подсчитывались на десяти случайных полях зрения под увеличением светового микроскопа «МИКМЕД-6» ×1000 (объектив ×100 и окуляр ×10). Для описания качественных изменений использовался метод разделения тучных клеток по степени дегрануляции [24, 67, 73, 105].

Так, по степени дегрануляции все тучные клетки разделяются на четыре типа: Т-0 – тучные клетки, имеющие плотно расположенные гранулы в цитоплазме, ядро у них визуально не определяется; Т-1 – тучные клетки, которые имеют хорошо визуализируемое ядро, гранулы расположены в пределах клетки, не выходят за пределы цитоплазмы; Т-2 – гранулы частично обнаруживаются за пределами тучных клеток, при этом цитоплазматическая мембрана не повреждена; Т-3 – полностью дегранулированные тучные клетки с нарушенной целостностью цитоплазматической мембраны.

Тучные клетки при окраске толуидиновым синим характеризуются метахроматичностью, отражающей стадию зрелости гепарина внутри гранул клеток. При этом тучные клетки, содержащие в гранулах незрелый несульфатированный гепарин, принимают голубую α-ортохромную окраску; наличие сульфатированного гепарина обусловливает β-метахроматичность или

чернильно-фиолетовую окраску гранул клеток; зрелый гепарин в гранулах дает γ-метахроматичность или пурпурную окраску тучных клеток.

3. Окраска срезов печени по Ван-Гизону применялась для определения содержания соединительной ткани. В основе окраски лежит смесь кислого фуксина, окрашивающего коллагеновые волокна в ярко-красный цвет, и пикриновой кислоты, которая придает остальным структурам ткани желтый оттенок [68].

4. Для определения оптической плотности РНК в гепатоцитах препараты окрашивали метиловым зелёным-пиронином и пиронином G по методу Браше. Гепатоциты печени фотометрировали (×900, зонд – 0,5), используя микроскоп МИКМЕД-5 и ФМЭЛ-1А (насадка фотометрическая люминесцентная) на зеленом (500 нм) монохроматичном светофильтре для измерения оптической плотности РНК. Регистрацию условных единиц оптической плотности осуществляли при помощи мультиметра (модель DT-830B). Оптическую плотность РНК в ядре и цитоплазме гепатоцитов высчитывали в условных единицах оптической плотности (А) по формуле: $A = -\lg T$. В данной формуле $T = I/I0$, где I0 – измеренная интенсивность падающего на объект светового пучка (так называемое поле сравнения – свободный от среза участок, расположенный рядом с анализируемой тканью); I – интенсивность ослабленного пучка после прохождения через фотометрируемый объект [44, 84].

5. Метод Фельгена использовался для обнаружения ДНК в ядрах гепатоцитов [84]. Для этого срезы печени после депарафинизации промывали в холодном 1 н. растворе соляной кислоты, далее помещали в тот же раствор, нагретый до 60 ºС, на 22 минуты в термостат для проведения гидролиза. После снова промывали в холодном 1 н. растворе соляной кислоты и дистиллированной воде последовательно. Следом срезы печени помещали в свежеприготовленный реактив Шиффа на 45 минут, промывали в трех порциях сернистой воды в каждой по две минуты. Затем промывали в дистиллированной

воде в течение 2 минут, обезвоживали и заключали в бальзам. Препараты печени крыс изучали так же, как и препараты печени, окрашенные методом Браше. Производили измерение оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов в единицах оптической плотности. Использовали зеленый монохроматичный светофильтр (500 нм), так как ДНК окрашивалась в красный цвет.

### 2.2.1.2. Люминесцентно-гистохимические и цитоспектрофлуориметрические методы

1. Для определения гистаминсодержащих структур печени лабораторных животных был использован люминесцентно-гистохимический метод Кросса, Эвана, Роста [19, 157]. Данный метод основан на появлении флуоресцирующих производных имидазолилэтиламина в тканях печени в результате реакции между гистамином и парами ортофталевого альдегида. Для этого свежие криостатные срезы толщиной 10 μm помещали в предварительно разогретый до 100 ℃, содержащий пары ортофталевого альдегида термостат на десять секунд. Затем эти срезы помещали в другой термостат на 2 минуты, который был также разогрет до 100 ℃, но содержал пары воды. В дальнейшем срезы высушивали в следующем термостате при 70 ℃ в течение 5 минут. В результате данной реакции обнаруживались структуры печени, которые люминесцировали с различной интенсивностью в зависимости от количества содержавшегося в них гистамина. Так, структуры печени крыс с высоким содержанием гистамина имели желто-оранжевую или ярко-желтую люминесценцию, со средним и низким содержанием гистамина – желто-зеленую и зеленую или бледно-зеленую соответственно.

2. Люминесцентно-гистохимический метод Фалька – Хилларпа в модификации Крохиной Е. М. был использован для выявления серотонин- и катехоламинсодержащих структур печени лабораторных животных [59, 78]. С этой целью свежие криостатные срезы печени толщиной 10 μm инкубировали в термостате в парах формальдегида в течение 60 минут при температуре 80 ℃. Основу метода составляет реакция моноаминов с формальдегидом, в результате которой образуются флуоресцирующие соединения.

3. Идентификацию интенсивности люминесценции гистамина, серотонина и катехоловых аминов проводили цитоспектрофлуориметрическим методом. Для этого с люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-4 с установленной дополнительной насадкой ФМЭЛ-1А и выходным напряжением 900 В при использовании светофильтра № 7 (с длиной волны 515 нм для гистамина), № 6 и № 8 (с длиной волны 480 нм для катехоловых аминов и с длиной волны 525 нм для серотонина) снимали показатели с ЖК-дисплея мультиметра (модель DT-830B) при постоянном напряжении 200 В в условных единицах флуоресценции (у. е.).

### 2.2.1.3. Иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные методы

1. В печени лабораторных крыс определяли Iba-1-, CD68-позитивные структуры. Для выявления антигена Iba-1 (кальций-связывающий пептид) и CD68 были применены специфические антитела. Демаскирование кластера дифференцировки проводили путем кипячения депарафинированных срезов в 10 мМ растворе цитратного буфера (pH 6) в течение 6 минут. Для нейтрализации активности эндогенной пероксидазы срезы инкубировали в 3 % растворе пероксида водорода 30 минут при комнатной температуре, после чего срезы промывали в 0,1 М растворе фосфатного буфера. Затем проводился блок

неспецифического связывания 10% козьей сывороткой и пермеабилизация 0,05% раствором тритона X-100 фирмы Sigma (Germany) в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве первичных антител были применены кроличьи антитела против белка Iba-1 (1:500, Wako, Japan) и мышиные антитела против белка CD68 (1:500, Abcam, UK). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 18 часов при 4 °C. В качестве вторичных антител были использованы биотилинированные антитела (1:500, goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG, Vector Laboratories, USA), инкубация с которыми проводилась при комнатной температуре в течение 1 часа. Визуализацию позитивного окрашивания производили путем инкубации срезов с авидин-биотиновым комплексом (Vector Laboratories, USA) и диамино-бензидином (Sigma, Germany), придававшим Iba-1- и CD68-позитивным структурам коричневую окраску [57].

2. Методика иммунофлуоресцентного окрашивания для выявления Iba-1- и CD68-позитивных структур совпадала с иммуногистохимической. Однако в качестве вторичных антител были использованы антитела с флуоресцентной меткой (1:500, goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa 594, goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa 488, Thermo Fischer Scientific) в течение 60 минут при комнатной температуре. После очередной трехкратной промывки в 0,1 М фосфатном буфере срезы были покрыты покровным стеклом и хранились в темноте при 4 °C до их микроскопического исследования [69].

3. Ядра гепатоцитов окрашивали DAPI или 4’,6-диамидино-2-фенилиндолом (Dianova, Гамбург, Германия) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте. Данный краситель имеет сродство к малой бороздке двуцепочечной ДНК [199]. Флуоресценцию DAPI регистрировали при длине волны возбуждения 364 нм и длине волны испускания 454 нм [222].

### 2.2.2. Морфометрический анализ

Морфометрию структур печени проводили по микрофотографиям с не менее чем 10 случайных полей зрения, полученным с помощью цифровой камеры AmScope (MU1000), которая была подсоединена к тринокулярному микроскопу МИКМЕД-6 через посадочное гнездо для адаптера при увеличении объектива ×40, ×100. Измерения проводили в микрометрах после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра. Площадь микрофотографии с поля зрения при увеличении объектива ×40 составила 93119,06 мкм$^2$, при увеличении объектива ×100 – 15025,15 мкм$^2$.

На микрофотографиях срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, с помощью программы AmScope версии x64, 4.11.18421.202110202 и инструмента *многоугольник* (многоточечное соединение) измеряли площади центральных вен, междольковых артерий и вен, междольковых желчных протоков при увеличении объектива ×40, а также площади гепатоцитов, эозинофилов при увеличении объектива ×100; площадь ядер гепатоцитов замерялась с помощью инструмента *эллипс* (5 точек), а также *многоугольник* (случайное соединение) при увеличении объектива ×100. Данные последнего замера в совокупности с периметром ядра, который измерялся одновременно, использовались для подсчета индекса контура и коэффициента формы ядра. Диаметр синусоидных капилляров замерялся с помощью инструмента *линия* на микрофотографиях, сделанных при увеличении объектива ×100.

Площадь цитоплазмы для каждого гепатоцита высчитывали путем нахождения разности между площадью гепатоцита и его ядра. Заодно определяли ядерно-цитоплазматическое отношение (отношение площади ядра к площади цитоплазмы). Кроме того, были подсчитаны среднее количество гепатоцитов, среднее количество ядер, среднее количество двуядерных

гепатоцитов на полученных микрофотографиях со случайных полей зрения. С использованием данных периметра и площади ядра определяли коэффициент формы ядра (КФ) и индекс контура ядра (ИК).

Коэффициент формы определяли по формуле

$$КФ = 4 \times \pi \times Sя/Pя^2,$$

а индекс контура, отражающий рельеф его поверхности – по формуле

$$ИК = Pя / \sqrt{Sя},$$

где Sя – площадь клетки, Pя – периметр клетки.

При этом круг имеет коэффициент формы, который равняется 1, и индекс контура 3,54 [272].

Площади тучных клеток, Iba-1- и CD68-позитивных клеток на микрофотографиях срезов печени, обработанных соответствующим гистологическим методом, измеряли в программе AmScope с помощью инструмента *многоугольник* (многоточечное соединение). На тех же микрофотографиях подсчитывали их среднее количество. Кроме этого, определена интенсивность светопропускания CD68-позитивных клеток печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, с помощью программы SigmaScan Pro 5.0. Для этого выделяли интересующий участок мембраны и цитоплазмы макрофагов и определяли показатель его интенсивности по отношению к общей площади изучаемой клетки. Интенсивность иммунофлуоресценции определяли с помощью программы ImageJ в препаратах, обработанных иммунофлуоресцирующими методиками [1, 2, 52].

Площади DAPI-позитивных ядер измеряли в программе ImageJ с использованием набора функций в следующей последовательности: Image-Color-Split channels (извлечение канала изображения); Image-Adjust-Threshold (перевод изображения в монохромное); Process-Binary-Watershed (автоматическое создание границ между ядрами); Analyze-Analyze Particles (автоматический подсчет количества и обведение контура ядер); ROI Manager-

More-Save (сохранение замеров ядер в формате zip-архива); повторное открытие фотографии в цветном виде и ранее сохраненного архива; ROI Manager-Show All-More-Multi Measure; сохранение результатов измерений [1, 2].

### 2.2.3. Статистические методы

Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel, Statistica-10. Все полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро – Уилка и Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения изучаемого признака данные представляли как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения в виде M ± m. Статистическую значимость отличий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок данные представлялись как медиана (Me) и интерквартильный размах (L25; U75). В этом случае для определения статистической значимости использовали U-критерий Манна – Уитни. Различия во всех случаях считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

В целях определения взаимосвязи между изменениями изучаемых структур рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена ($r_s$). При этом сила корреляционной связи считали слабой при $0 < r_s < 0,29$, средней – при $0,3 < r_s < 0,69$, сильной – при $0,7 < r_s < 1,0$.

Площади поперечного сечения одноядерных и двуядерных гепатоцитов, их ядер, тучных клеток печени крыс контрольной и опытной групп распределяли по методу сигмальных отклонений [24, 65]. Параметры, находящиеся по площади в диапазоне M ± σ, считали как средние, M ± 2σ – как малые и большие, > M ± 2σ – как очень малые и большие соответственно.

Площади Iba-1 и CD68-позитивных клеток распределяли автоматически на десять категорий с помощью гистограммы в программе Statistica-10. Среди них выделяли три наиболее многочисленные категории: малые, средние и большие макрофаги. Площади клеток, составляющие правый хвост гистограммы, объединяли в группу очень больших макрофагов. Для оценки значимости различий между измеряемыми структурами (площадь гепатоцитов, ядер гепатоцитов, тучных клеток и макрофагов) печени контрольной и опытной групп, распределенных по методу сигмальных отклонений и с помощью гистограммы, применялся критерий хи-квадрат Пирсона [24, 65].

Для выявления взаимосвязи и упорядочения выборок в сравнительно однородные группы (кластеры) использовали кластерный анализ [65, 66]. Факторный анализ применяли для выявления внутренних причин (факторов), формирующих определенный процесс в изучаемом органе, на основании имеющейся информации [34].

# ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

## 3.1. Влияние кремния, поступающего с питьевой водой, на массу тела и микроскопическое строение печени лабораторных животных

Лабораторные крысы, находившиеся в эксперименте в течение двух месяцев, внешне не отличались, значимых различий в средней массе тела у них не наблюдалось: контрольная группа (n = 20) – 306,18 ± 28,42 грамма, опытная группа (n = 20) – 318,46 ± 43,28 грамма (p = 0,78). При внешнем осмотре крыс, которые получали кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев (n = 20), отмечалась редкая и тусклая шерсть в сравнении с крысами контрольной группы (n = 20). Средняя масса тела крыс контрольной группы составляла 453,0 ± 10,41 грамма, а крыс опытной группы – 325,0 ± 6,53 грамма (p = 0,01). Масса печени крыс опытной группы через два месяца от начала эксперимента уменьшалась в сравнении с показателями контрольной группы в среднем на 6% (p = 0,42), а через девять месяцев – на 10% (p = 0,53) (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнения средней массы печени крыс через два и девять месяцев от начала эксперимента с поступлением кремния в концентрации 20 мг/л с питьевой водой, грамм

| Анализируемый орган | Срок эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца (n=40) | | 9 месяцев (n=40) | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| Печень крысы | 10,32±0,51 | 9,63±0,58 | 9,38±1,19 | 8,45±0,51 |

У крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, визуально отмечались расширенные просветы центральных вен печеночных долек и синусоидных капилляров. Печеночная

долька сохраняла свою форму в виде правильного шестиугольника (Рисунок 3) [30].

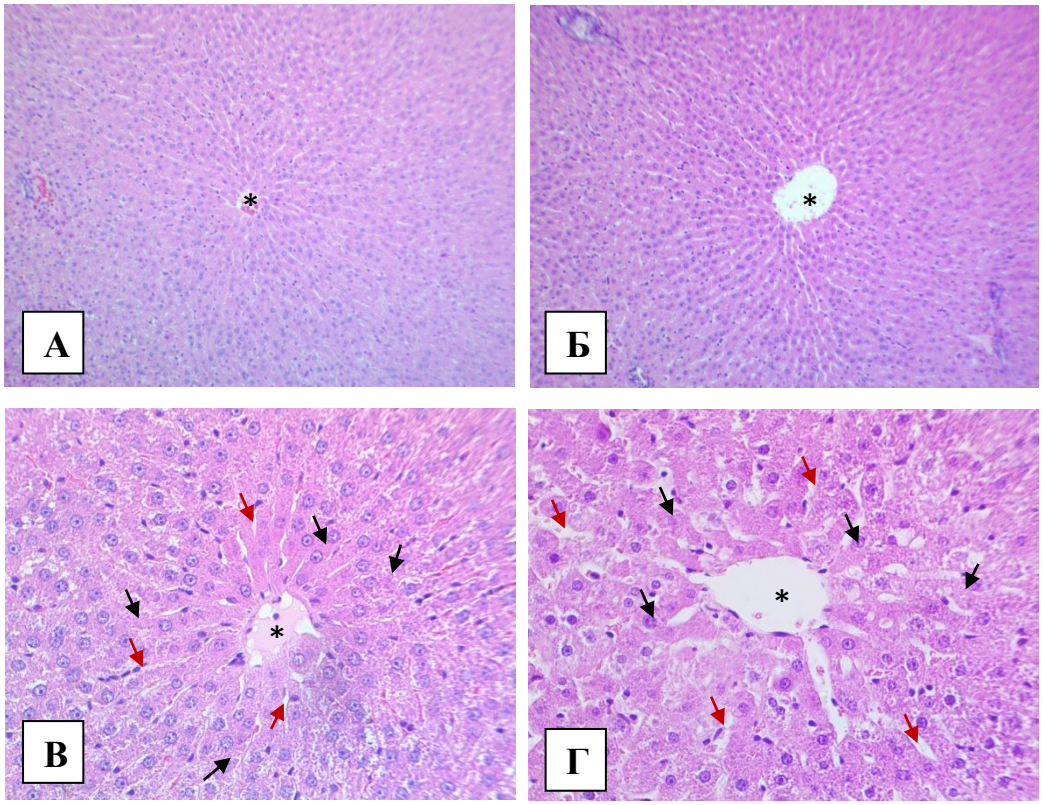



Рисунок 3 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев. Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 20 (А, Б) и 40 (В, Г). Цифровая камера AmScope (MU1000): А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс опытной группы. Черными стрелками указаны печеночные пластинки, располагающиеся вокруг центральной вены (отмечена звездочкой). В печени крыс опытной группы наблюдается небольшое расширение синусоидных капилляров (указаны красными стрелками)

В эксперименте с хроническим поступлением кремния с питьевой водой в течение девяти месяцев в концентрации 20 мг/л в печени крыс опытных групп отмечались следующие визуальные изменения в гистологическом строении: печеночные пластинки располагались беспорядочно, площади центральных вен становились больше, отмечался стаз крови в них, в области портальных зон – клеточная инфильтрация [29]. Наблюдалось визуальное увеличение диаметра синусоидных капилляров печени (Рисунок 4В, 4Г).

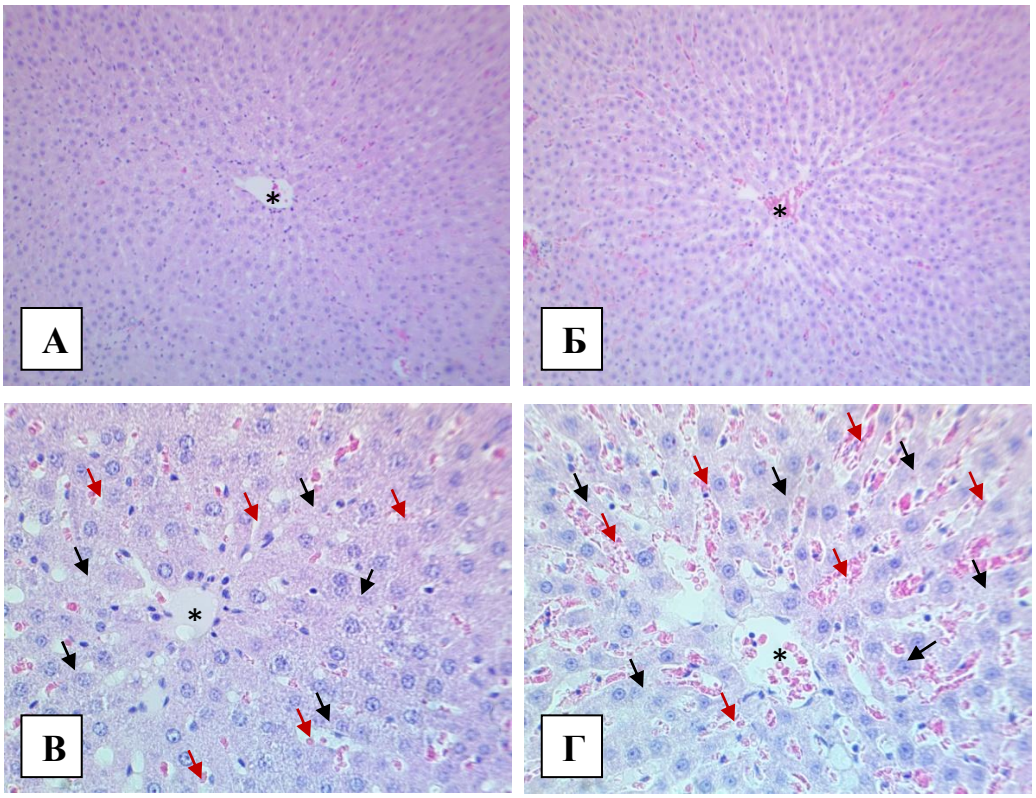



Рисунок 4 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев. Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 20 (А, Б) и 40 (В, Г). Цифровая камера AmScope (MU1000): А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс опытной группы. Черными стрелками указаны печеночные пластинки, располагающиеся вокруг центральной вены (отмечена звездочкой). В печени крыс опытной группы наблюдается расширение синусоидных капилляров (указаны красными стрелками) со стазом крови в них

Дополнительно, у крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, замечены признаки полиморфно-клеточной инфильтрации печени в области портальных зон, содержащих как нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, плазматические клетки, так и эозинофилы (Рисунок 5А, 5В); выявлялись участки печени с отдельными скоплениями клеток воспалительного инфильтрата (Рисунок 5Б). В области портальных зон печеночных долек обнаружены гепатоциты на различных стадиях некроза (Рисунок 5Г).

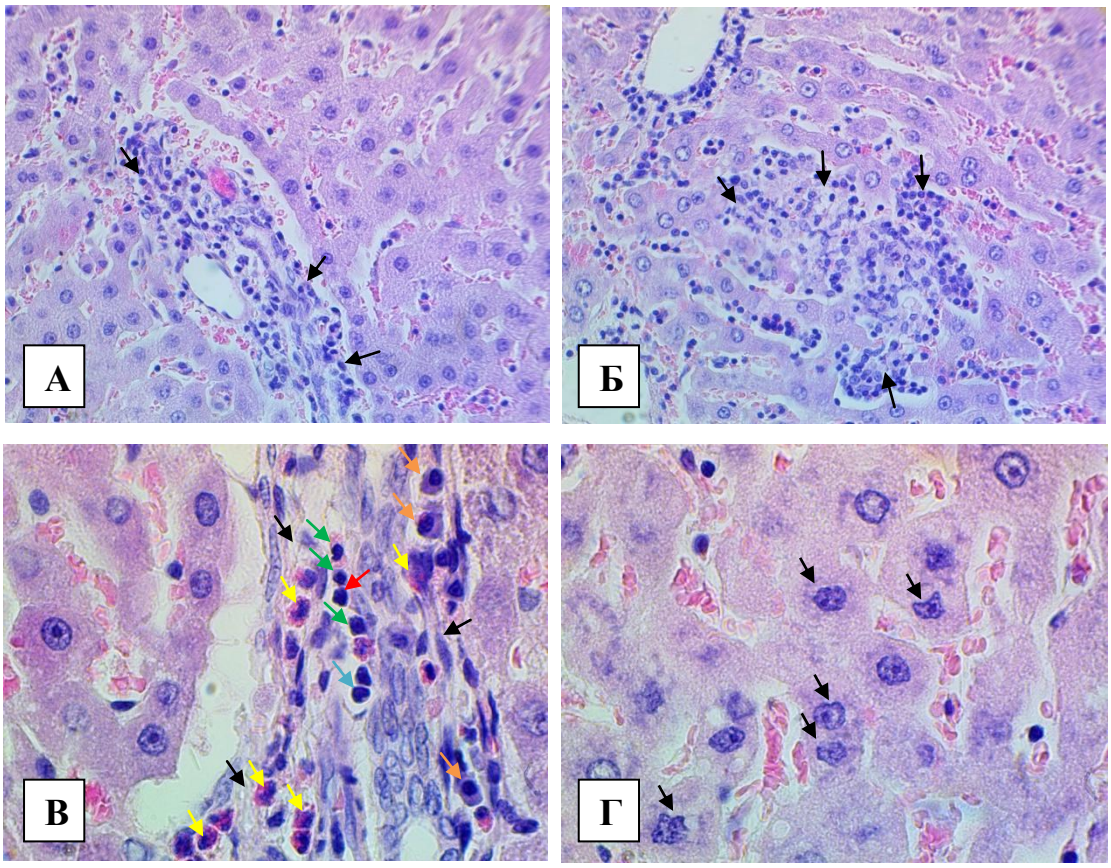



Рисунок 5 – Печень крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев. Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 40, 100. Цифровая камера AmScope (MU1000): А, Б – увеличение объектива ×40; В, Г – увеличение объектива ×100; А – полиморфно-клеточная инфильтрация области портальных зон (указаны черными стрелками); Б – отдельные скопления клеток воспалительного инфильтрата (указаны черными стрелками); В – полиморфно-клеточная инфильтрация области портальных зон (указаны черными стрелками), содержащая эозинофилы (указаны желтыми стрелками), лимфоциты (указаны зелеными стрелками), нейтрофилы (указан красной стрелкой), моноциты (указан голубой стрелкой), плазматические клетки (указаны оранжевыми стрелками); Г – деформированные ядра гепатоцитов (указаны черными стрелками)

Для сравнения количественных и качественных показателей печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, была проведена их морфометрия по микрофотографиям с полей зрения, полученным с помощью микроскопа МИКМЕД-6 и цифровой фотокамеры AmScope (MU1000) при увеличении объектива ×40 и ×100.

В Таблице 3 представлены данные, полученные в ходе морфометрии микрофотографий печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев.

Таблица 3 – Сравнение количественных характеристик структур печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

| Параметры | 2 месяца | | p |
|---|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | |
| Общее увеличение ×1000 | | | |
| Количество гепатоцитов на поле зрения, шт. | 37,88±1,60 | 34,60±1,25 | 0,177 |
| Количество ядер гепатоцитов на поле зрения, шт. | 25,63±1,18 | 25,80±1,39 | 0,927 |
| Количество двуядерных гепатоцитов на поле зрения, шт. | 3,50±0,68 | 3,00±0,55 | 0,617 |
| Доля двуядерных клеток от общего числа гепатоцитов на поле зрения, % | 9,16±1,29 | 8,73±0,93 | 0,774 |
| ППС одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 219,52±4,30 | 255,07±7,80 | 0,001* |
| ППС цитоплазмы одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 176,11±3,91 | 215,06±7,35 | 0,001* |
| ППС ядер одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 40,83±0,83 | 38,34±1,01 | 0,058 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение в одноядерных гепатоцитах | 0,25±0,01 | 0,20±0,01 | 0,001* |
| ППС двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 326,21±16,63 | 300,40±27,93 | 0,419 |
| ППС цитоплазмы двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 252,30±13,68 | 247,36±26,48 | 0,864 |
| ППС ядер двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 36,96±1,50 | 26,52±1,18 | 0,001* |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение в двуядерных гепатоцитах | 0,29±0,01 | 0,23±0,02 | 0,008* |
| Диаметр синусоидных капилляров, мкм | 4,36±0,11 | 5,85±0,19 | 0,001* |
| Общее увеличение ×400 | | | |
| ППС центральной вены, мкм$^2$ | 2970,43±259,90 | 3287,71±633,20 | 0,624 |
| ППС междольковой вены, мкм$^2$ | 1018,67±119,96 | 1214,26±93,47 | 0,410 |
| ППС междольковой артерии, мкм$^2$ | 78,26±11,26 | 77,79±14,25 | 0,984 |
| ППС междолькового желчного протока, мкм$^2$ | 55,93±5,48 | 54,01±9,77 | 0,861 |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$, ППС – площадь поперечного сечения.

Анализ Таблицы 3 показал, что у крыс опытной группы в сравнении с контрольной наблюдаются следующие изменения: статистически значимо увеличивается площадь поперечного сечения одноядерных гепатоцитов в 1,16 раза и площадь поперечного сечения их цитоплазмы в 1,22 раза, вместе с тем уменьшается значение показателя ядерно-цитоплазматического отношения в них в 0,8 раза; площадь поперечного сечения гепатоцитов, содержащих два ядра, статистически значимо не изменяется, однако наблюдается уменьшение площади поперечного сечения их ядер в 0,72 раза и ядерно-цитоплазматического отношения в 0,79 раза; увеличивается диаметр синусоидных капилляров в 1,34 раза.

Площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, были распределены с помощью метода сигмальных отклонений и представлены в виде гистограммы (Рисунок 6).

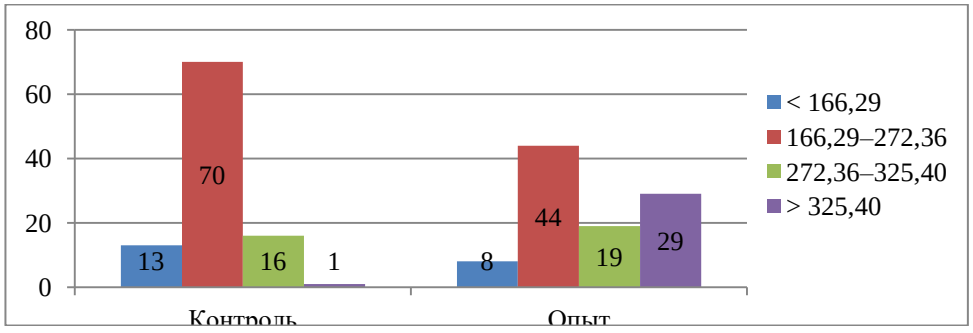



Рисунок 6 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, %

По данным Рисунка 6 в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, отмечалось: уменьшение доли одноядерных гепатоцитов, имеющих площадь поперечного сечения 166,29–272,36 мкм$^2$ на 26% ($p = 0,001$); увеличение доли одноядерных гепатоцитов, имеющих площади поперечного сечения 272,36–325,40 мкм$^2$ на 3% ($p = 0,576$) и > 325,40 мкм$^2$ на 28% ($p = 0,001$).

Доля двуядерных гепатоцитов от общего числа гепатоцитов в контрольной группе составляла 9,16 ± 1,29%, а в опытной группе – 8,73 ± 0,93%. Площади поперечного сечения двуядерных гепатоцитов также были распределены с помощью метода сигмальных отклонений (Таблица 4).

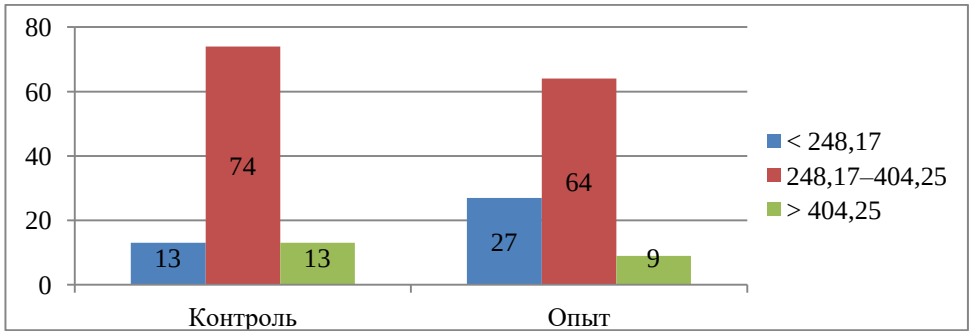



Рисунок 7 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, %

Из Рисунка 7 следует, что средняя площадь поперечного сечения гепатоцитов, содержащих два ядра, уменьшается за счет увеличение доли двуядерных гепатоцитов с площадью < 248,17 мкм$^2$ на 14% (p = 0,013).

Площади поперечного сечения ядер одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, были представлены в виде гистограммы после распределения их методом сигмальных отклонений (Рисунок 8).

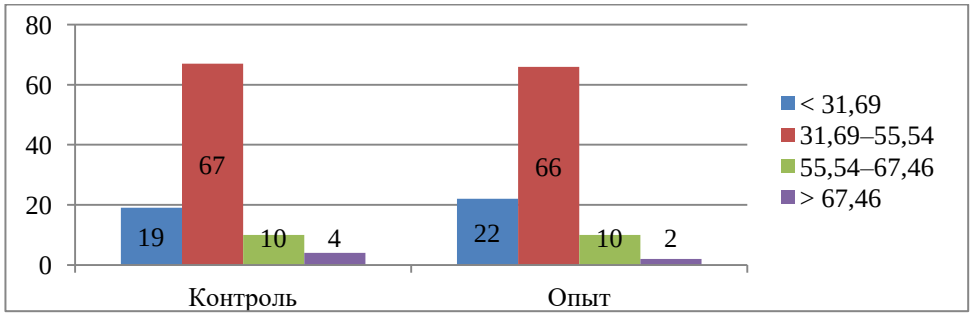



Рисунок 8 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения ядер одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, %

По данным Рисунка 8 в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, наблюдается увеличение доли ядер гепатоцитов с площадью поперечного сечения < 31,69 мкм$^2$ на 3% (p = 0,599) на фоне незначительного уменьшения доли ядер одноядерных гепатоцитов, имеющих площадь поперечного сечения 31,69–55,54 мкм$^2$ на 1% (p = 0,881) и > 67,46 мкм$^2$ на 2% (p = 0,407).

Площади поперечного сечения ядер двуядерных гепатоцитов печени крыс также распределялись с помощью метода сигмальных отклонений и представлялись в виде гистограммы (Рисунок 9).

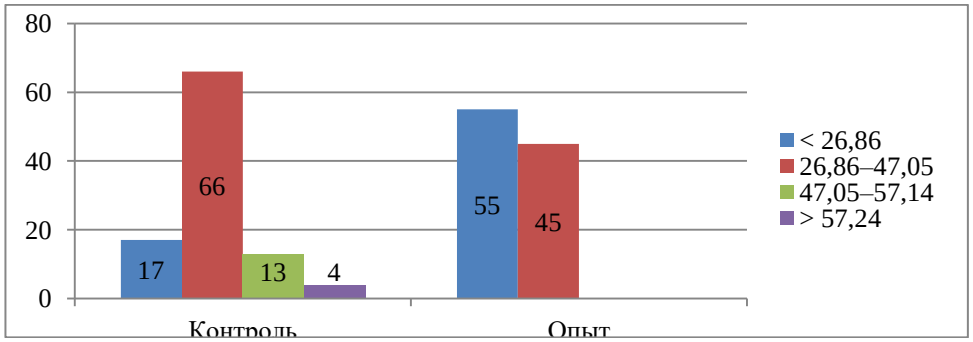



Рисунок 9 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения ядер двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, %

По данным гистограммы с Рисунка 9 средняя площадь поперечного сечения ядер двуядерных гепатоцитов уменьшается за счет увеличения доли ядер с площадью < 26,86 мкм$^2$ на 38% (p = 0,001) и уменьшения доли ядер с площадью 26,86–47,05 мкм$^2$ на 21% (p = 0,002).

Далее была определена корреляционная связь между площадью поперечного сечения гепатоцита и площадью поперечного сечения ядра в пределах одной экспериментальной группы (Таблица 4).

Таблица 4 – Корреляционная связь между площадью поперечного сечения гепатоцита и площадью поперечного сечения ядра гепатоцита печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

| Корреляционная пара | Срок эксперимента 2 месяца | |
|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| ППС одноядерного гепатоцита / ППС ядра одноядерного гепатоцита | 0,358155* | 0,369797* |
| ППС двуядерного гепатоцита / ППС ядра двуядерного гепатоцита | 0,419330* | 0,369797* |

*Примечание.* * – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$; ППС – площадь поперечного сечения.

В печени крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, выявлены сопоставимые прямые, средней силы корреляционные связи между площадью поперечного сечения одноядерных гепатоцитов и площадью поперечного сечения их ядер. В двуядерных гепатоцитах также наблюдались прямые средней силы корреляционные связи в контрольной и опытной группах. Однако в печени крыс опытной группы отмечалось снижение силы корреляционной связи между площадью поперечного сечения двуядерного гепатоцита и площадью поперечного сечения ядра двуядерного гепатоцитов, в сравнении с контрольной группой, что свидетельствовало о нарушении тесноты связи пропорционального изменения.

Таким образом, морфометрия площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов и их ядер, а также обработка полученных результатов различными способами, подтверждают изменение их микроскопического строения, проявляющееся увеличением средней площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов, за счет увеличения доли гепатоцитов с площадью > 325,40 мкм$^2$, что не исключает наличие полиплоидии гепатоцитов [3]. Однако в то же время

следует иметь ввиду, что изменение содержания ДНК не всегда приводит к изменению размеров ядра. Исследователями зафиксированы случаи, когда наблюдалось уменьшение размеров ядер, но при этом содержание ДНК не изменялось. В других ситуациях, несмотря на увеличение размеров ядер, содержание ДНК в них оставалось неизменными [4]. Следовательно, размеры ядра не связаны напрямую с содержанием в них ДНК. Следует отметить, что увеличение размеров гепатоцитов также может происходить за счет клеточной гипертрофии – один из механизмов клеточной регенерации печени [39]. Данный вариант имеет место быть в нашем случае, так как в печени крыс опытной группы наблюдается увеличение средней площади поперечного сечения гепатоцитов за счет увеличения занимаемой в ней цитоплазмы без изменения площади ядра.

Далее в Таблице 5 представлены данные морфометрии печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

Таблица 5 – Сравнение количественных характеристик структур печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

| Параметры | 9 месяцев | | p |
|---|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | |
| Общее увеличение ×1000 | | | |
| Количество гепатоцитов на поле зрения, шт. | 23,76±0,94 | 21,92±0,74 | 0,135 |
| Количество ядер гепатоцитов на поле зрения, шт. | 13,90±0,87 | 14,31±0,66 | 0,715 |
| Количество двуядерных гепатоцитов на поле зрения, шт. | 1,62±0,33 | 1,69±0,20 | 0,849 |
| Доля двуядерных клеток от общего числа гепатоцитов на поле зрения, % | 7,12±1,14 | 8,27±0,93 | 0,422 |
| ППС одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 458,76±12,85 | 456,21±12,11 | 0,887 |
| ППС цитоплазмы одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 370,49±11,50 | 395,33±12,84 | 0,161 |
| ППС ядер одноядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 74,75±1,46 | 72,98±1,20 | 0,348 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение в одноядерных гепатоцитах | 0,22±0,01 | 0,21±0,01 | 0,340 |
| ППС двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 464,63±34,09 | 559,55±56,24 | 0,148 |
| ППС цитоплазмы двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 349,60±29,05 | 441,44±48,48 | 0,106 |
| ППС ядер двуядерных гепатоцитов, мкм$^2$ | 57,51±2,99 | 59,06±3,86 | 0,752 |
| Ядерно-цитоплазматическое отношение в двуядерных гепатоцитах | 0,34±0,02 | 0,29±0,03 | 0,188 |
| Диаметр синусоидных капилляров, мкм | 6,99±0,11 | 9,77±0,11 | 0,001* |
| Общее увеличение ×400 | | | |
| ППС центральной вены, мкм$^2$ | 1588,84±91,43 | 2994,51±312,10 | 0,001* |
| ППС междольковой вены, мкм$^2$ | 824,08±87,12 | 1398,98±104,94 | 0,001* |
| ППС междольковой артерии, мкм$^2$ | 38,30±4,27 | 94,71±11,85 | 0,001* |
| ППС междолькового желчного протока, мкм$^2$ | 35,72±6,18 | 73,69±5,73 | 0,005* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$, ППС – площадь поперечного сечения.

Из Таблицы 5 следует, что в печени крыс опытной группы наблюдается статистически значимое изменение диаметра синусоидных капилляров в 1,39 раза, площади поперечного сечения центральной вены – в 1,88 раза, площади

поперечного сечения междольковых вен, артерии и желчного протока триады печени – в 1,69; 2,47 и 2,06 раза соответственно.

При сравнении результатов морфометрии печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев, были выявлены характерные для печени возрастные изменения: уменьшение количества гепатоцитов на поле зрения, увеличение площади одно- и двуядерных гепатоцитов, а также площади их ядер.

Проведено распределение площади поперечного сечения одно- и двуядерных гепатоцитов, площади поперечного сечения ядер одно- и двуядерных гепатоцитов с помощью метода сигмальных отклонений. Гистограмма распределения площади поперечного сечения гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, представлена на Рисунке 10.

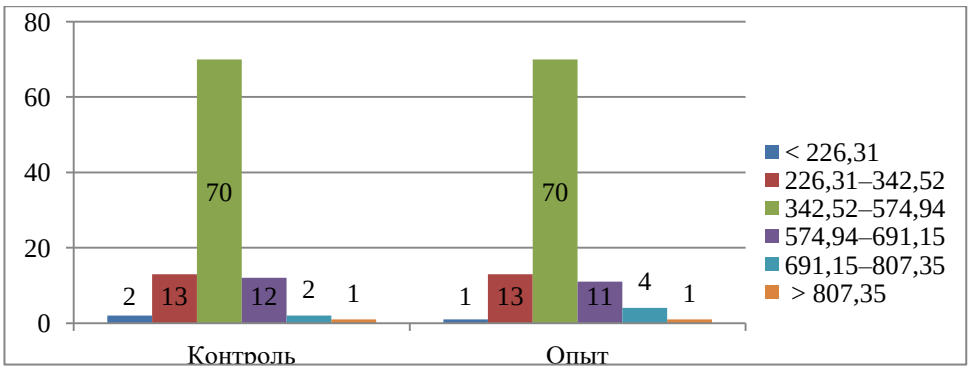



Рисунок 10 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

По данным гистограммы с Рисунка 10 в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, отмечается увеличение доли одноядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения 691,15–807,35 мкм$^2$ на 2 % ($p = 0,407$).

Площади поперечного сечения двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, распределенные методом сигмальных отклонений, также представлены в виде гистограммы (Рисунок 11).

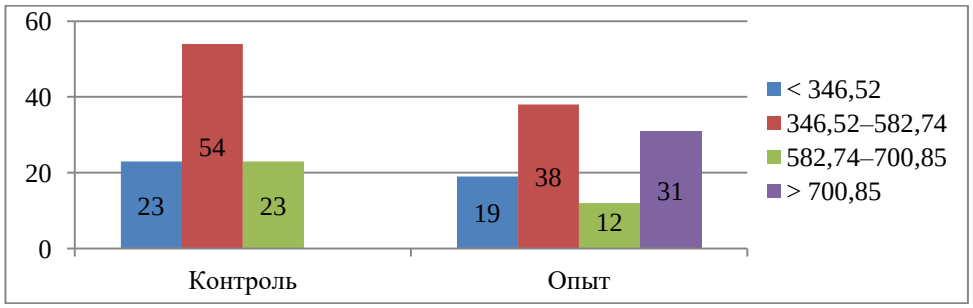



Рисунок 11 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

По данным Рисунка 11, несмотря на отсутствие статистической значимости при сравнении средних площадей поперечного сечения двуядерных гепатоцитов, при распределении их с помощью метода сигмальных отклонений и представления в виде гистограммы, обнаруживается появление доли клеток с площадью поперечного сечения двуядерных гепатоцитов > 700,85 мкм$^2$ ($p = 0{,}001$). Одновременно уменьшается доля двуядерных гепатоцитов с площадью < 346,52 мкм$^2$ на 4% ($p = 0{,}487$), 346,51–582,74 мкм$^2$ на 16% ($p = 0{,}023$), 582,74–700,85 мкм$^2$ на 11% ($p = 0{,}041$).

Далее на Рисунке 12 представлена гистограмма распределения площади поперечного сечения ядер одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев.

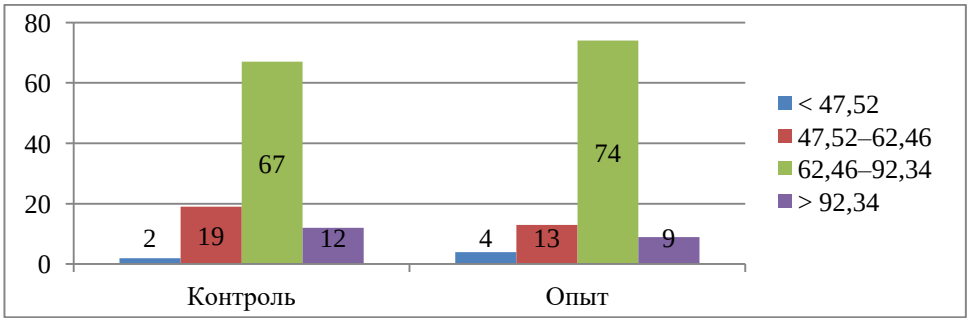



Рисунок 12 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения ядер одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

На гистограмме с Рисунка 12 отмечается увеличение доли ядер одноядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения < 47,52 на 2% (p = 0,407), 62,46–92,34 мкм$^2$ на 7% (p = 0,277), а также уменьшение доли ядер одноядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения 47,52–62,46 мкм$^2$ на 6% (p = 0,247), > 92,34 мкм$^2$ на 3% (p = 0,489).

Данные распределения площади ядер двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, с помощью метода сигмальных отклонений представлены в виде гистограммы на Рисунке 13.

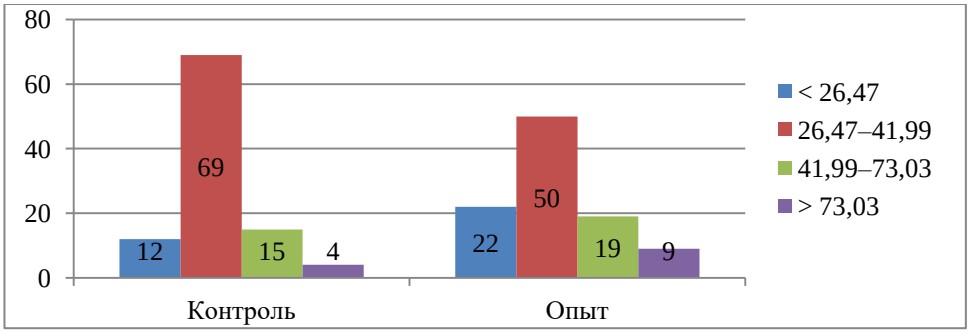



Рисунок 13 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения ядер двуядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

Рисунок 13 демонстрирует увеличение доли ядер двуядерных гепатоцитов, имеющих площади поперечного сечения < 26,47 мкм$^2$ на 10% (p = 0,059), 41,99–73,03 мкм$^2$ на 4% (p = 0,451), > 73,03 мкм$^2$ на 5% (p = 0,151) в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, в сравнении с контрольной. Одновременно происходит уменьшение доли ядер двуядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения 26,47–41,99 мкм$^2$ на 19% (p = 0,001).

Определяли корреляционную связь между площадью поперечного сечения гепатоцита и ядра в одно- и двуядерных гепатоцитах каждой экспериментальной группы через девять месяцев эксперимента (Таблица 6).

Таблица 6 – Корреляционная связь между площадью поперечного сечения гепатоцита и площадью поперечного сечения ядра гепатоцита печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

| Корреляционная пара | Срок эксперимента 9 месяцев | |
|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| ППС одноядерного гепатоцита / ППС ядра одноядерного гепатоцита | 0,539922* | 0,292527* |
| ППС двуядерного гепатоцита / ППС ядра двуядерного гепатоцита | 0,703297* | 0,755882* |

*Примечание.* * – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$; ППС – площадь поперечного сечения.

По данным с Таблицы 6 обнаруживаются прямые слабой силы корреляционные связи между площадью поперечного сечения гепатоцита и его ядром в одноядерных клетках печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, в сравнении с контрольной группой ($r_s = 0,07$; $p < 0,05$). В то же время в двуядерных гепатоцитах наблюдаются прямые сильные корреляционные связи как в контрольной, так и опытной группах.

Анализируя вышеизложенное можно заключить, что в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, наблюдаются статистически не значимые изменения в виде увеличения доли одноядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения 691,15–807,35 мкм$^2$ на 2% ($p = 0,407$). Среди двуядерных гепатоцитов уменьшается доля ядер двуядерных гепатоцитов с площадью < 346,52 мкм$^2$ на 4% ($p = 0,487$), 346,51–582,74 мкм$^2$ на 16% ($p = 0,023$), 582,74–700,85 мкм$^2$ на 11% ($p = 0,041$). Одновременно с этим появляются двуядерные гепатоциты с площадью поперечного сечения двуядерных гепатоцитов > 700,85 мкм$^2$ ($p = 0,001$). Учитывая данные распределения площади поперечного

сечения одноядерных гепатоцитов и их ядер на гистограмме, а также корреляционный анализ между площадью поперечного сечения гепатоцита и его ядра, можно констатировать, что через девять месяцев эксперимента в печени крыс опытной группы восстановление печени также происходит преимущественно за счет их гипертрофии.

Проведено измерение коэффициента формы и индекса контура ядра гепатоцитов в контрольной и опытной группах через два и девять месяцев от начала эксперимента. Данные замеров представлены в Таблице 7 в виде M ± m для каждой экспериментальной группы.

Таблица 7 – Коэффициент формы и индекс контура ядра гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев, у. е.

| Изучаемый параметр | Срок эксперимента | | | | p* | p** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца | | 9 месяцев | | | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | | |
| Коэффициент формы ядра | 3,410±0,005 | 3,474±0,009 | 3,532±0,007 | 3,521±0,008 | 0,001 | 0,239 |
| Индекс контура ядра | 1,082±0,003 | 1,042±0,005 | 1,008±0,003 | 1,015±0,004 | 0,001 | 0,192 |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних значений между контрольной и опытной группами, находившимися в эксперименте в течение двух месяцев, $p < 0,05$; ** – статистически значимые различия средних значений между контрольной и опытной группами, находившимися в эксперименте в течение девяти месяцев, $p < 0,05$.

Средние значения коэффициента формы и индекса контура ядра гепатоцитов печени были подсчитаны для каждой группы ядер одноядерных гепатоцитов, распределенных с помощью гистограммы (Таблица 8).

Таблица 8 – Коэффициент формы и индекс контура ядра одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, рассчитанные для группы площадей поперечного сечения одноядерных гепатоцитов в соответствии с распределением на гистограмме, у. е.

| ППС ядра гепатоцита, мкм$^2$ | Срок эксперимента 2 месяца | | | | ППС ядра гепатоцита, мкм$^2$ | Срок эксперимента 9 месяцев | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | | Опыт (n=20) | | | Контроль (n=20) | | Опыт (n=20) | |
| | КФ | ИК | КФ | ИК | | КФ | ИК | КФ | ИК |
| < 31,69 | 3,40 | 1,09 | 3,46 | 1,05 | < 47,52 | 3,45 | 1,05 | 3,58 | 0,98 |
| 31,69–55,54 | 3,41 | 1,08 | 3,49 | 1,04 | 47,52–62,46 | 3,54 | 1,00 | 3,54 | 1,00 |
| 55,54–67,46 | 3,44 | 1,06 | 3,43 | 1,06 | 62,46–92,34 | 3,53 | 1,01 | 3,50 | 1,02 |
| > 67,46 | 3,40 | 1,09 | 3,43 | 1,07 | > 92,34 | 3,53 | 1,01 | 3,52 | 1,01 |

*Примечание.* ППС – площадь поперечного сечения; КФ – коэффициент формы, ИК – индекс контура ядра.

По данным Smitha T. с соавторами (2011), коэффициент формы более 3,54 у. е. и индекс контура менее 1,00 у. е. позволяют заподозрить увеличение количества углублений на поверхности ядра, то есть могут свидетельствовать о деформации ядра [272].

При изучении средних значений коэффициента формы и индекса контура ядра с Таблицы 8 можно констатировать, что такие изменения, которые соответствовали бы вышеизложенным требованиям, не наблюдались. Однако анализ средних арифметических коэффициента формы и индекса контура ядра одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, с Таблицы 12 позволил выявить изменение данных параметров в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев, а именно среди ядер с площадью поперечного сечения < 47,52 мкм$^2$.

В Таблице 9 представлены коэффициенты корреляции между площадями поперечного сечения междольковых сосудов и желчного протока триады печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев.

Таблица 9 – Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между площадями поперечного сечения междольковых сосудов и желчного протока триады печени лабораторных крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев

| Корреляционная пара | Срок эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца | | 9 месяцев | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| Междольковая вена / междольковая артерия | -0,156409 | -0,016484 | 0,317391 | 0,409565* |
| Междольковая вена / междольковый желчный проток | 0,232072 | -0,049451 | 0,353913 | 0,357391 |
| Междольковая артерия / междольковый желчный проток | 0,005082 | 0,884615* | 0,488696* | 0,597391* |

*Примечание.* * – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$.

При анализе данных Таблицы 9 выявлено возрастание коэффициента корреляции между площадью поперечного сечения междольковой артерии и желчного протока ($r_s = 0,59$; $p < 0,05$) триады печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев. Подобные изменения коэффициента корреляции были выявлены и в печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев ($r_s = 0,88$; $p < 0,05$), в сравнении с показателями контрольной группы этого же эксперимента. Помимо этого, в эксперименте длительностью девять месяцев отмечалось появление прямых умеренных корреляционных связей ($r_s = 0,40$; $p < 0,05$) в печени крыс опытной группы между междольковой веной и артерией триады печени.

Обобщая вышеизложенное, можно констатировать, что поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев приводит к следующим статистически значимым изменениям в печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной: к увеличению площади поперечного сечения гепатоцитов (за счет увеличения доли гепатоцитов с площадью > 251,13 мкм$^2$) и площади занимаемой в ней цитоплазмы; уменьшению показателя ядерно-цитоплазматического отношения; уменьшению доли ядер одноядерных гепатоцитов, имеющих площадь поперечного сечения 51,67–62,97 мкм$^2$ на фоне статистически не значимого увеличения доли ядер гепатоцитов с площадью поперечного сечения < 29,07 мкм$^2$; увеличению диаметра синусоидных капилляров.

В то же время в печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, отмечались следующие изменения: увеличение размеров всех измеренных сосудов (центральных вен, междольковых вен, артерий, синусоидных капилляров) и междольковых желчных протоков. Вместе с тем наблюдалось появление деформированных ядер гепатоцитов, которые, в свою очередь, составляли долю ядер одноядерных гепатоцитов с площадью поперечного сечения < 47,52 мкм$^2$, обнаруживаемых при распределении их с помощью метода сигмальных отклонений.

## 3.2. Гистохимическое выявление нуклеиновых кислот методами Браше и Фельгена

Для выявления нуклеиновых кислот в гепатоцитах печени крыс применен метод Браше (РНК) и Фельгена (ДНК). Первый метод позволяет окрашивать ДНК хромосом метиленовым зеленым в зеленый цвет, а РНК ядрышек и цитоплазмы – в красный цвет. Второй метод используется для выявления ДНК

в ядрах клеток, которые окрашиваются в нем в красный цвет. В окрашенных препаратах печени определяли оптическую плотность ДНК и РНК в ядрах, а также оптическую плотность РНК в цитоплазме гепатоцитов. Данные, полученные при измерении оптической плотности, представлены в Таблице 10.

Таблица 10 – Содержание нуклеиновых кислот в ядрах гепатоцитов печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев, единицы оптической плотности (D)

| Оптическая плотность (D) | Срок эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца | | 9 месяцев | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| ДНК в ядрах гепатоцитов | 0,020 (0,010; 0,030) | 0,034 (0,022; 0,034)* | 0,046 (0,034; 0,046) | 0,052 (0,049; 0,058)* |
| РНК в ядрах гепатоцитов | 0,097 (0,076; 0,108) | 0,088 (0,055; 0,119) | 0,081 (0,063; 0,122) | 0,125 (0,108; 0,149)* |
| РНК в цитоплазме гепатоцитов | 0,075 (0,070; 0,091) | 0,097 (0,082; 0,108)* | 0,081 (0,076; 0,086) | 0,108 (0,097; 0,114)* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$.

Таблица 10 демонстрирует увеличение медианы оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов в 1,7 ($p = 0,001$) и 1,13 ($p = 0,001$) раза в печени крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев соответственно. В то же время у крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев, медиана оптической плотности РНК в ядрах гепатоцитов статистически значимо увеличивалась в 1,54 раза ($p = 0,001$), что, вероятно, свидетельствует об увеличении размеров ядрышка или их количества, в которых непосредственно сосредоточена РНК. Ранее Hernandez-Verdun D. (2005) отмечено, что функциональная активность клетки коррелирует с размером ядрышка [184], следовательно, можно предположить о повышении активности ядерной РНК гепатоцитов. Медиана оптической

плотности РНК в цитоплазме гепатоцитов увеличивалась в 1,29 и 1,33 раза через два и девять месяцев соответственно (p = 0,001).

## 3.3. Ядра гепатоцитов печени лабораторных крыс при обработке методом DAPI

DAPI или 4’,6-диамидино-2-фенилиндол – синий флуоресцентный краситель, используемый для выявления нуклеиновых кислот. Он способен связываться с малой бороздкой двуцепочечной ДНК. Данный флуоресцентный краситель способен проникать как через интактную клеточную мембрану и окрашивать ядра живых клеток, так и через поврежденную мембрану. К последним DAPI имеет большее сродство, поэтому его чаще всего используют для выявления клеток с поврежденными мембранами, так как проникновение красителя в такую клетку происходит значительно легче.

Препараты печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, были окрашены иммунофлуоресцентным методом для выявления DAPI-позитивных ядер гепатоцитов. На Рисунке 14 видно, что DAPI-позитивные ядра имеют синее свечение. В печени крыс контрольной группы ядра гепатоцитов имели более округлую форму и большие размеры в сравнении с ядрами гепатоцитов печени опытной группы. Кроме того, в печени лабораторных крыс опытной группы визуально отмечалось увеличение количества DAPI-позитивных ядер гепатоцитов наряду с уменьшением их размеров. Площадь DAPI-позитивных ядер гепатоцитов была измерена с помощью программы ImageJ: отмечалось уменьшение площади ядер гепатоцитов в печени крыс опытных групп на 11% (p = 0,001). DAPI-позитивные ядра гепатоцитов печени крыс контрольной группы занимали в среднем 22,92%, в опытной группе – 26,49% всей площади (S = 249873 px$^2$)

микрофотографии со случайного поля зрения (Об. ×40). Следовательно, несмотря на уменьшение размеров ядер гепатоцитов, происходит увеличение занимаемой ими площади, то есть возрастает число ядер гепатоцитов на поле зрения.

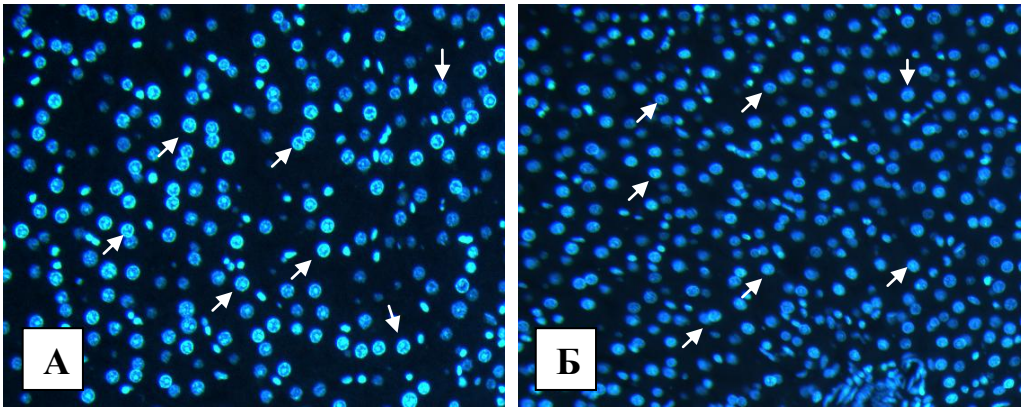



Рисунок 14 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев. Иммуногистохимическое выявление ядер гепатоцитов при помощи красителя DAPI (синяя флуоресценция). Микроскоп BX51 Olympus microscope (Tokyo, Japan). Об. 40. Ок. 10:
А – печень крыс контрольной группы; Б – печень крыс опытной группы. Белыми стрелками указаны ядра гепатоцитов. В печени крыс опытной группы наблюдается уменьшение размеров ядер гепатоцитов

В препаратах печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, также наблюдалось увеличение средней площади, занимаемой DAPI-позитивными ядрами гепатоцитов (в печени крыс контрольной группы – 27,68%, в печени крыс опытной группы – 39,88%), при замере их на микрофотографиях со случайных полей зрения (S = 249873 px$^2$), сделанных с использованием объектива с увеличением ×40.

Площади ядер гепатоцитов в препаратах, обработанных DAPI, так же как и в препаратах печени, окрашенных гематоксилином и эозином, уменьшались у крыс опытной группы. Морфометрия выявила их уменьшение на 4% в сравнении с идентичными показателями контрольной группы (p = 0,585).

Результаты, полученные при обработке фотографий, окрашенных DAPI, соответствовали ранее полученным в результате морфометрии печени, окрашенной гематоксилином и эозином, данным.

### 3.4. Выявление соединительной ткани по методу Ван-Гизона

Для выявления соединительной ткани в печени использовали метод Ван-Гизона. В печени всех экспериментальных животных соединительная ткань окрашивалась в красный цвет на фоне желтых гепатоцитов и определялась преимущественно в стенке центральных вен и в области портальных зон.

В гистологических препаратах печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния в течение двух месяцев, видимых изменений выявлено не было. Соединительная ткань тонким слоем располагалась в стенке центральных вен и в области портальных зон. Увеличения соединительной ткани, разрастание ее в печени не наблюдалось.

У крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния в течение девяти месяцев, также видимого разрастания соединительной ткани при окраске по Ван-Гизону не наблюдалось. Визуально были заметны морфологические изменения в печени, выявляемые в препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином: увеличение диаметра синусоидных капилляров, площади поперечного сечения центральных вен, междольковых артерий, вен и желчных протоков (Рисунок 15).

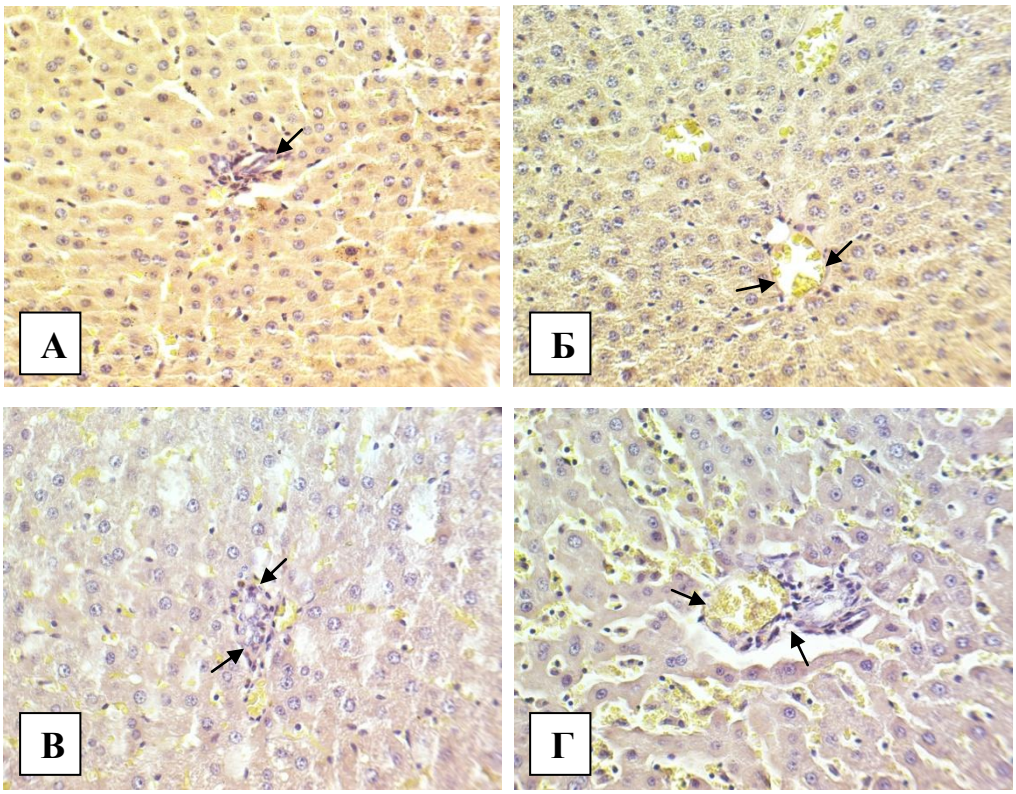



Рисунок 15 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев. Окраска по Ван-Гизону. Об. 40. Микроскоп МИКМЕД-6. Цифровая камера AmScope (MU1000): А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л; А, Б – печень крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев; В, Г – печень крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев. Стрелками указаны тонкие прослойки соединительной ткани, окрашенные красным цветом, располагающаяся в стенке центральной вены (Б) и в области портальных зон (А, В, Г)

Из этого следует, что поступление кремния в составе питьевой воды в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев не приводит к развитию фиброза печени у крыс.

## 3.5. Эозинофилы печени

Оценку количества эозинофилов и их морфометрию проводили на препаратах печени, окрашенных гематоксилином и эозином при увеличении объектива ×100. Эозинофилы распознавали по характерной для них крупной эозинофильной зернистости, равномерно расположенной в цитоплазме, и двудольному ядру (Рисунок 16).

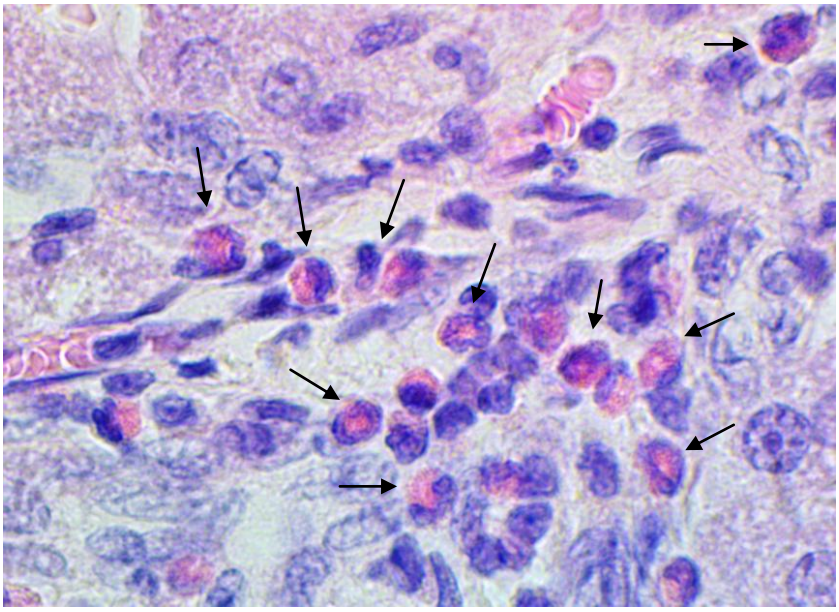


Рисунок 16 – Печень крысы, получавшей кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев. Окраска гематоксилином и эозином. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 100. Цифровая камера AmScope (MU1000). Эозинофилы указаны черными стрелками

Подсчитано среднее количество эозинофилов на микрофотографию со случайного поля зрения (Ув. ×1000). Так, в печени крыс контрольной группы, находившейся в эксперименте в течение двух месяцев, среднее количество эозинофилов составило 0,16 ± 0,05 клетки, а в опытной группе – 0,08 ± 0,04 клетки ($p = 0,22$). Вместе с тем обнаруживалось, что эозинофилы преимущественно локализовывались в области портальных зон, и их число там

для контрольной группы составило 2,62 ± 0,20 клетки, а для опытной – 3,25 ± 0,23 клетки соответственно (p = 0,04).

В печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, количество эозинофилов на микрофотографии со случайного поля зрения в контрольной группе составило 0,10 ± 0,04 клетки в среднем, а в опытной – 0,07 ± 0,03 (p = 0,47). В то же время количество исследуемых клеток в области портальных зон составило 1,75 ± 0,16 и 5,56 ± 0,73 для каждой контрольной и опытной групп соответственно (p = 0,001).

Средняя площадь эозинофилов в печени крыс контрольной группы через два месяца эксперимента составила 20,53 ± 0,81 мкм$^2$, а в опытной группе – 18,38 ± 0,68 мкм$^2$ (p = 0,047). В печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, площадь эозинофилов в контрольной и опытной группах практически не изменялась (в контрольной группе – 26,06 ± 0,83 мкм$^2$, в опытной группе – 27,06 ± 0,75 мкм$^2$) [122].

## 3.6. Тучные клетки печени

Для выявления тучных клеток депарафинированные срезы печени лабораторных животных окрашивались полихромным толуидиновым синим. Общий фон препаратов имел голубую окраску. Тучные клетки в основном выявлялись в соединительной ткани в области портальных зон печени. Клетки преимущественно имели ортохромную и метахроматичную окраску и разные размеры (Рисунок 17).

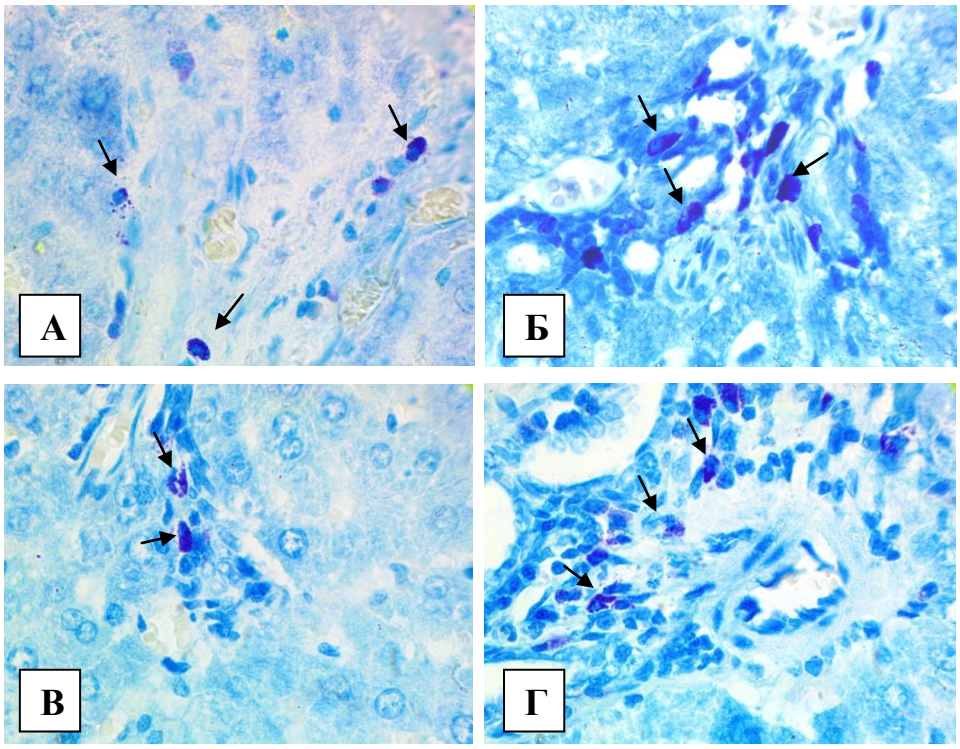



Рисунок 17 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев. Окраска толуидиновым синим. Микроскоп МИКМЕД-6. Цифровая камера AmScope (MU1000). Об. 100: А, Б – печень крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев; В, Г – печень крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев; А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс опытной группы, получавшей кремний в концентрации 20 мг/л. Тучные клетки указаны черными стрелками.

В печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, количество тучных клеток в контрольной группе составило 2,77 ± 0,32 клетки на микрофотографию со случайного поля зрения (S = 15025,15 мкм$^2$), а в опытной группе – 3,09 ± 0,33 (p = 0,492). Средняя площадь тучных клеток составила 23,61 ± 2,01 и 30,72 ± 0,99 мкм$^2$ соответственно (p = 0,002). При распределении площадей тучных клеток печени у крыс опытной группы, получавшей водорастворимый кремний в течение двух месяцев, по методу сигмальных отклонений, было замечено уменьшение доли тучных клеток с малой (p = 0,01) и увеличение доли с большой (p = 0,001) площадью (Таблица 10).

Таблица 10 – Распределение тучных клеток печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев, по площади клеток, % (по методу сигмальных отклонений)

| Размер тучных клеток (по методу сигмальных отклонений) | Площадь, мкм$^2$ | Доля тучных клеток печени крыс (2 месяца) | | Площадь, мкм$^2$ | Доля тучных клеток печени крыс (9 месяцев) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Контроль, % | Опыт, % | | Контроль, % | Опыт, % |
| Доля тучных клеток малой площади | <13,16 | 15 | 5* | <18,71 | 15 | 4* |
| Доля тучных клеток средней площади | 13,16-44,47 | 74 | 64 | 18,71-36,11 | 71 | 66 |
| Доля тучных клеток с большой площадью | >44,47 | 11 | 31* | >36,11 | 14 | 30* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$.

Количество тучных клеток на микрофотографию со случайного поля зрения (S = 15025,15 мкм$^2$) у крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, составило 4,28 ± 0,50 и 3,32 ± 0,27 клетки для контрольной и опытной групп соответственно ($p = 0,206$). Средняя площадь клеток для контрольной группы составила 27,42 ± 0,84 мкм$^2$, для опытной группы – 32,64 ± 1,09 мкм$^2$ ($p = 0,001$). Так же как и в предыдущем эксперименте, в печени крыс опытной группы отмечается уменьшение доли тучных клеток с малой ($p = 0,013$) и увеличение доли с большой ($p = 0,009$) площадью [31].

Тинкториальные характеристики тучных клеток печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев, представлены в Таблице 11.

Таблица 11 – Тинкториальные свойства тучных клеток печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев, %

| Параметр | 2 месяца | | 9 месяцев | |
|---|---|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| Доля ортохромных тучных клеток, % | 63 | 25* | 7 | 39* |
| Доля метахроматичных тучных клеток, % | 37 | 75* | 93 | 61* |
| Доля недегранулированных тучных клеток с невизуализирующимся ядром, % (Т-0) | 63 | 25* | 7 | 40* |
| Доля недегранулированных тучных клеток с визуализирующимся ядром, % (Т-1) | 0 | 13* | 18 | 35* |
| Доля тучных клеток с дегрануляцией, но неповрежденной мембраной % (Т-2) | 33 | 61* | 73 | 24* |
| Доля тучных клеток с полной дегрануляцией, % (Т-3) | 4 | 1 | 2 | 1 |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$.

В печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной через два месяца эксперимента наблюдалось увеличение доли метахроматичных тучных клеток ($p = 0,001$). Долю недегранулированных тучных клеток в печени крыс контрольной группы 82% составляли ортохромные тучные клетки, в опытной группе преобладали метахроматичные – 63%.

В печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, так же как и в двухмесячном эксперименте, тучные клетки преимущественно имели метахроматичную окраску, однако в сравнении с

контрольной наблюдалось увеличение доли ортохромных тучных клеток (p = 0,001). Доля недегранулированных тучных клеток контрольной группы преимущественно представлена метахроматичными клетками (75%), а в опытной – ортохромными (52%).

## 3.7. Биогенные амины печени

### 3.7.1. Гистаминсодержащие структуры печени

При визуальном просмотре препаратов печени лабораторных животных, обработанных методом Кросса, Эвана, Роста (1971), на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ-4 (Ув. ×100, ×400, ×900) четко определялись печеночные дольки, гепатоциты, центральные вены, люминесцирующие гранулярные клетки (ЛГК). Последние располагались преимущественно в области сосудов, некоторые были замечены и между печеночными балками.

В печени крыс, получавших питьевую воду с добавлением кремния в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, в сравнении с контрольной группой выраженных изменений в люминесцентной морфологии обнаружено не было. Было заметно изменение люминесценции гистамина от центральной вены (желто-зеленый) к периферии дольки (темно-зеленый).

У крыс опытной группы, находившихся в идентичном эксперименте в течение девяти месяцев, визуально отмечалось увеличение площади поперечного сечения центральных вен, а также изменение формы печеночных долек (отклонение от формы правильного шестиугольника). ЛГК преимущественно располагались около центральных вен и портальных зон печеночной дольки (Рисунок 18).

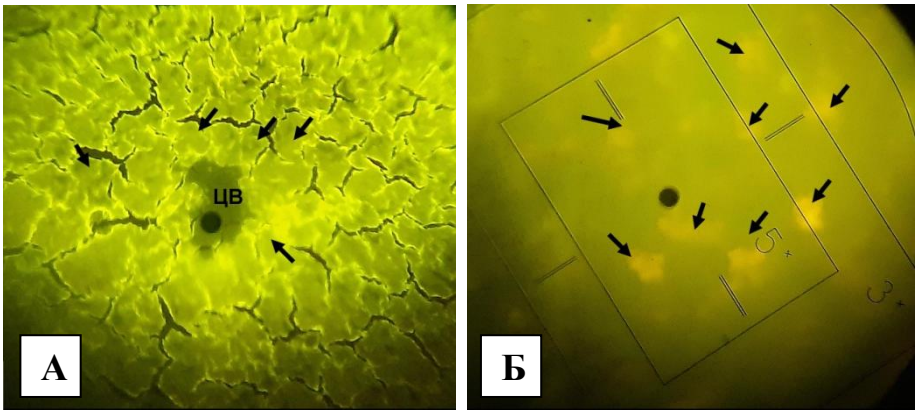



Рисунок 18 – Люминесцентная морфология печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев: А – стрелками показаны гепатоциты, зонд установлен на центральной вене печени. Ок. 10. Об. 10. Зонд 0.5; Б – стрелками показаны люминесцирующие гранулярные клетки печени. Ок. 10. Об. 90. Зонд 0.5. Метод Cross – Ewen – Rost. Микроскоп ЛЮМАМ-1

Измерение интенсивности люминесценции проводилось в оболочках центральных вен, так как известно, что именно гистамин способен изменять тонус сосудов, расслабляя их [227]. Следовательно, по изменению содержания гистамина в оболочках центральных вен или же в их близи можно судить о роли данного биогенного амина. Ранее Романова Л. П. (2006) в своей работе измеряла интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах при изучении регенерации печени плодов крыс после механической травмы и обнаружила статистически значимое повышение его содержания после эксперимента [87]. Определение интенсивности люминесценции биогенных аминов в гепатоцитах печени проводили и другие авторы [21]. Основными же источниками гистамина являются люминесцирующие гранулярные клетки, которые содержат наибольшую его концентрацию. В связи с этим было принято решение провести измерение интенсивности люминесценции гистамина в вышеназванных структурах печени. Данные замеров интенсивности люминесценции гистамина в условных единицах в виде M ± m представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Интенсивность люминесценции гистамина в структурах печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев, у. е.

| Изучаемые структуры печени | Срок эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца | | 9 месяцев | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| Гепатоциты | 0,30±0,004 | 0,37±0,006* | 0,42±0,003 | 0,44±0,003* |
| Оболочки центральных вен | 0,21±0,004 | 0,21±0,003 | 0,38±0,003 | 0,39±0,003* |
| ЛГК | 1,02±0,016 | 1,11±0,029* | 1,10±0,016 | 1,06±0,014* |
| Микроокружение ЛГК | 0,68±0,008 | 0,83±0,025* | 0,72±0,011 | 0,71±0,011 |

*Примечание.* * – статистически значимые различия средних величин, $p < 0,05$.

Из Таблицы 12 следует, что в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в течение двух месяцев, увеличивается интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах в 1,23 раза ($p = 0,001$), в люминесцирующих гранулярных клетках – в 1,08 раза ($p = 0,003$), в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК) – в 1,22 раза ($p = 0,001$). Через девять месяцев от начала эксперимента в печени крыс опытной группы наблюдается увеличение интенсивности люминесценции изучаемого биогенного амина в гепатоцитах ($p = 0,001$) и оболочках центральных вен ($p = 0,023$), а также снижение его в люминесцирующих гранулярных клетках ($p = 0,031$) [20].

Определяли силу корреляционных связей между интенсивностью люминесценции гистамина в ЛГК и их микроокружении (Таблица 13).

Таблица 13 – Корреляционный анализ показателей обеспеченности гистамином люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев

| Корреляционная пара | Срок эксперимента | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 2 месяца | | 9 месяцев | |
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| ЛГК / МО ЛГК | 0,998701* | 0,999127* | 0,998982* | 0,999342* |

*Примечание.* * – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$.

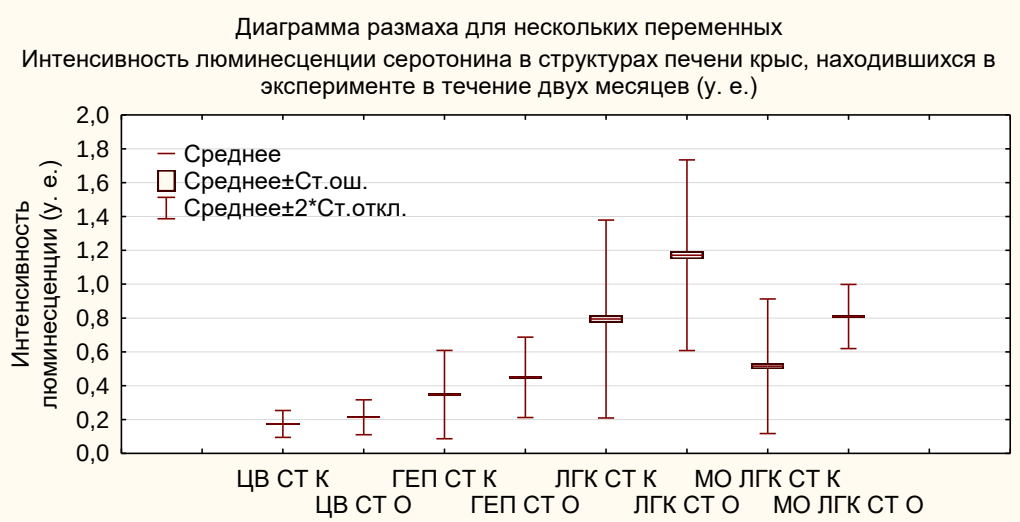
Исходя из Таблицы 13, в печени крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев, обнаруживалась прямая высокая корреляционная связь между исследуемыми параметрами.

### 3.7.2. Серотонин- и катехоламинсодержащие структуры печени

В препаратах печени крыс, обработанных методом Фалька – Хилларпа в модификации Крохиной Е. М. [59], четкие границы долек не обнаруживались. Ориентиром служили центральные вены. Общий фон препарата имел темно-зеленый цвет. Люминесцирующие гранулярные клетки распознавали по их ярко-золотисто-желтому свечению. Интенсивность люминесценции серотонина и катехоловых аминов замерялась в тех же самых структурах печени (гепатоциты, оболочки центральных вен, люминесцирующие гранулярные клетки и их микроокружение), что и в серийных срезах, параллельно обработанных методом Кросса, Эвана, Роста для выявления гистамина. Серотонин и катехоловые амины, так же как и гистамин, участвуют в регуляции тонуса сосудов [79]. Дезаминирование свободного серотонина, разрушение норадреналина происходят в печени с участием фермента моноаминоксидазы А [79, 196]. Тучные клетки

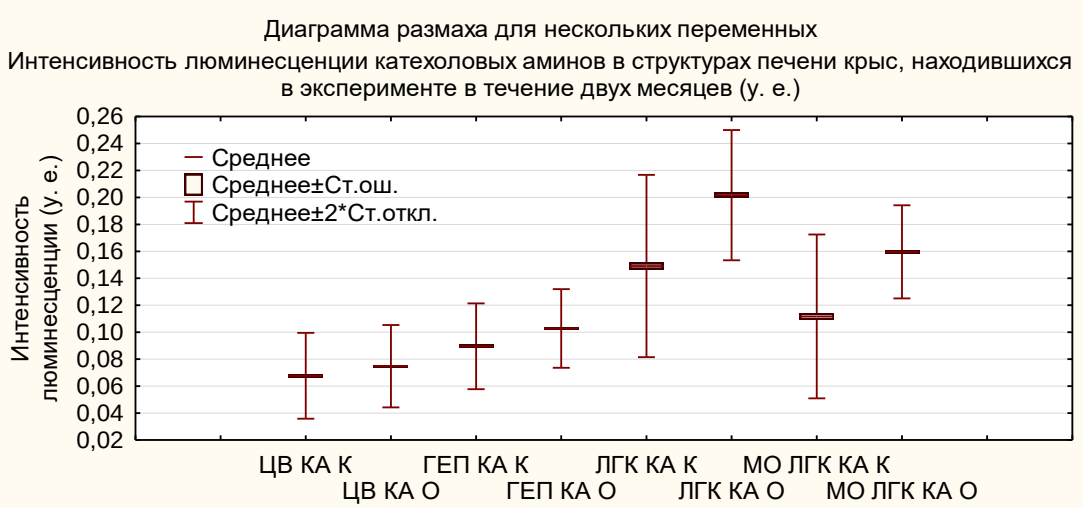
могут быть источниками серотонина. Он может вырабатываться и храниться в их гранулах [189]. Серотонин, высвобождаемый из тучных клеток и тромбоцитов, способен выступать в качестве хемоаттрактанта и участвовать в рекрутизации эозинофилов [239, 248]. Моноциты и их производные (дендритные клетки и макрофаги) также экспрессируют на своей поверхности широкий спектр 5-НТ-рецепторов [70]. Установлено, что воздействие на 5-НТ-рецепторы 4-го и 5-го типов способствует секреции интерлейкинов (IL-1β, IL-6, IL-8/CXCL8 (интерлейкин-8, interleukin-8), IL-12p40 (интерлейкин-12β, interleukin-12β)) и TNF-α, тогда как активация 5-НТ-рецепторов 3-го типа модулирует секрецию IL-6, IL-8/CXCL8 и IL-1β, но не оказывает влияния на продукцию IL-12p40 и TNF-α [70]. При этом сами макрофаги тоже могут быть источником серотонина [97].

Данные замеров структур печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, представлены на Рисунках 19 и 20.




| Изучаемая структура | Контроль | Опыт |
|---|---|---|
| Оболочки центральной вены (ЦВ) | 0,17±0,002 | 0,21±0,003* |
| Гепатоциты (ГЕП) | 0,35±0,008 | 0,45±0,007* |
| ЛГК | 0,79±0,021 | 1,17±0,022* |
| МО ЛГК | 0,52±0,016 | 0,81±0,007* |
| * – статистически значимые различия средних величин, p = 0,000000; | | |

Рисунок 19 – Интенсивность люминесценции серотонина в структурах печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев: СТ – интенсивность люминесценции серотонина; К – контрольная группа; О – опытная группа




| Изучаемая структура | Контроль | Опыт |
|---|---|---|
| Оболочки центральной вены (ЦВ) | 0,06±0,001 | 0,07±0,001* |
| Гепатоциты (ГЕП) | 0,09±0,001 | 0,10±0,001* |
| ЛГК | 0,15±0,002 | 0,20±0,002* |
| МО ЛГК | 0,11±0,002 | 0,16±0,001* |
| * – статистически значимые различия средних величин, p = 0,000000; | | |

Рисунок 20 – Интенсивность люминесценции катехоловых аминов в структурах печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев: КА – интенсивность люминесценции катехоловых аминов; К – контрольная группа; О – опытная группа

Рисунки 19 и 20 четко демонстрируют статистически значимое увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев [100].

Для оценки взаимосвязи между изменением интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс контрольной и опытной групп проведен корреляционный анализ данных (Рисунок 21).

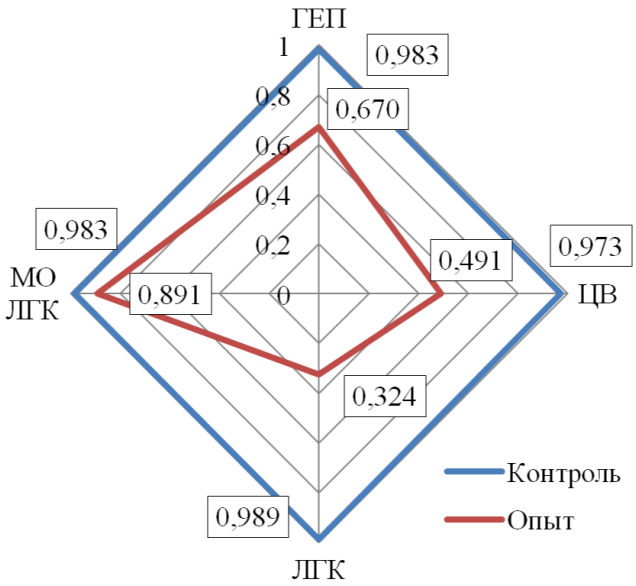
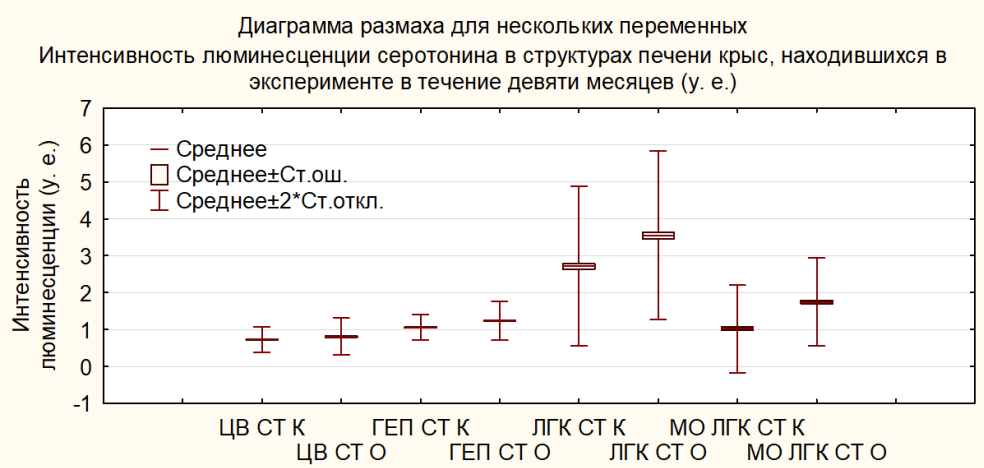



Рисунок 21 – Корреляционные связи между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах (ГЕП), оболочках центральных вен (ЦВ), люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК), микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК) печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

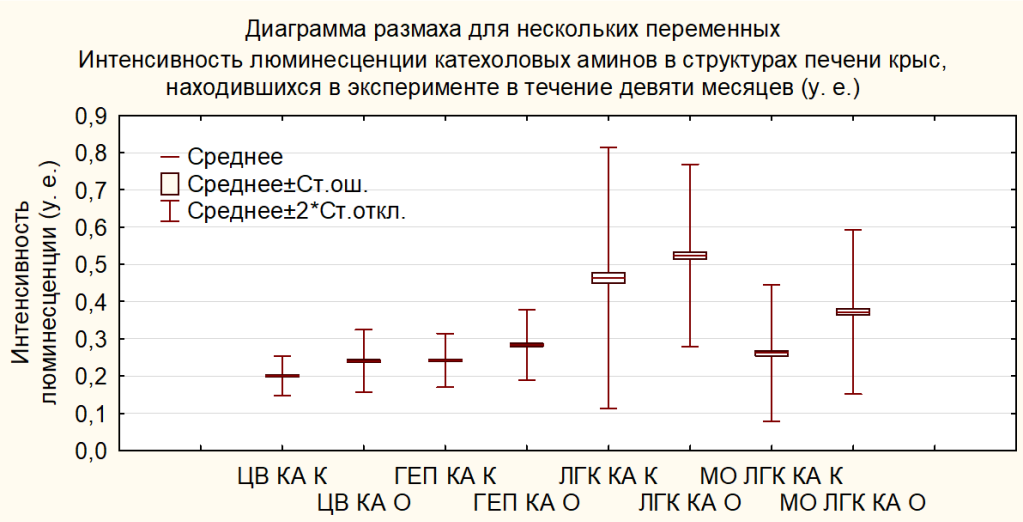
Корреляционный анализ показал наличие сильных прямых корреляционных связей между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс контрольной группы ($r_s > 0,97$; $p < 0,05$). В печени крыс опытной группы обнаруживались прямые слабые корреляционные связи между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах и люминесцирующих гранулярных клетках ($r_s = 0,32$; $p < 0,05$), интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в оболочках центральных вен ($r_s = 0,49$; $p < 0,05$) и гепатоцитах ($r_s = 0,67$; $p < 0,05$), прямые сильные – между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток ($r_s = 0,89$; $p < 0,05$).

В печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, также измерена интенсивность люминесценции серотонина и катехоловых аминов (Рисунок 22, 23).




| Изучаемая структура | Контроль | Опыт |
|---|---|---|
| Оболочки центральной вены (ЦВ) | 0,73±0,013 | 0,81±0,018** |
| Гепатоциты (ГЕП) | 1,06±0,013 | 1,24±0,020* |
| ЛГК | 2,71±0,081 | 3,55±0,085* |
| МО ЛГК | 1,02±0,044 | 1,75±0,046* |
| * – статистически значимые различия средних величин, p = 0,000000; | | |
| ** – статистически значимые различия средних величин, p = 0,0003; | | |

Рисунок 22 – Интенсивность люминесценции серотонина в структурах печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев: СТ – интенсивность люминесценции серотонина; К – контрольная группа; О – опытная группа




| Изучаемая структура | Контроль | Опыт |
|---|---|---|
| Оболочки центральной вены (ЦВ) | 0,20±0,001 | 0,24±0,003* |
| Гепатоциты (ГЕП) | 0,24±0,002 | 0,28±0,003* |
| ЛГК | 0,46±0,013 | 0,52±0,009** |
| МО ЛГК | 0,26±0,007 | 0,37±0,008* |
| * – статистически значимые различия средних величин, p = 0,000000; | | |
| ** – статистически значимые различия средних величин, p = 0,0001; | | |

Рисунок 23 – Интенсивность люминесценции катехоловых аминов в структурах печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев: КА – интенсивность люминесценции катехоловых аминов; К – контрольная группа; О – опытная группа

Анализ данных, представленных на Рисунках 22 и 23, показывает, что в печени крыс опытной группы через девять месяцев от начала эксперимента наблюдается статистически значимое увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов ($p < 0,05$).

По результатам эксперимента замечено, что показатели интенсивности люминесценции биогенных аминов в печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, были выше, чем у животных, которые были в эксперименте два месяца. Тем не менее общая тенденция к увеличению интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов на фоне поступления с питьевой водой кремния сохранялась на обоих сроках эксперимента [100].

Между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс контрольной и опытной групп определяли корреляционные связи (Рисунок 24).

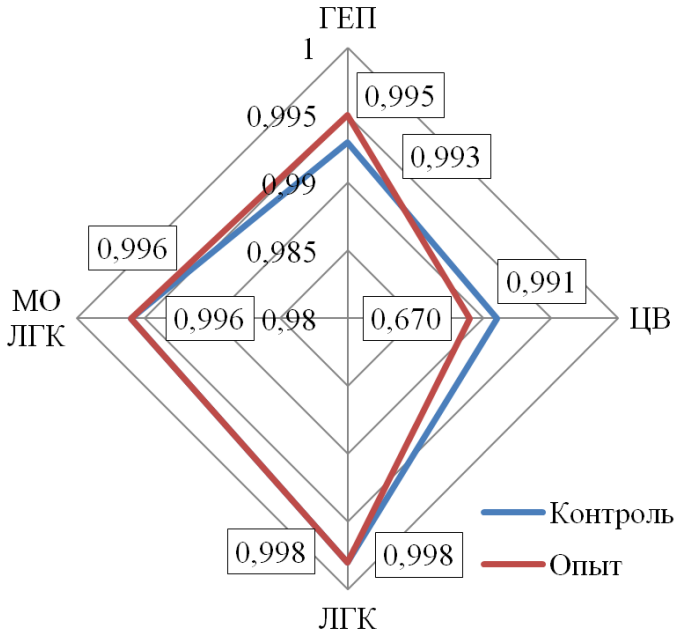



Рисунок 24 – Корреляционные связи между интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах (ГЕП), оболочках центральных вен (ЦВ), люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК), микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК) печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

Корреляционный анализ количественных данных в печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, выявил высокие прямые корреляционные связи между люминесценцией серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах, люминесцирующих гранулярных клетках и их микроокружении как в контрольной, так и в опытной группах ($r_s$ = 0,99; $p < 0,05$). Параллельно в оболочках центральных вен выявлялись высокие прямые корреляционные связи ($r_s$ = 0,99; $p < 0,05$) между теми же биогенными аминами у крыс контрольной группы, а в опытной группе – умеренные прямые ($r_s$ = 0,67; $p < 0,05$).

## 3.8. Iba-1- и CD68-позитивные макрофаги печени крыс

Iba-1 или кальций-связывающий пептид известен как маркер микроглии головного мозга. Тем не менее Iba-1 позитивные клетки выявляются и в других тканях, включая печень [17]. Белок Iba-1 обнаруживается на поверхности всех клеток моноцитарно-макрофагального происхождения, в том числе макрофагов, которые экспрессируют на своей поверхности CD163, CD16 и CD68. CD68 экспрессируется преимущественно только на поверхности активированных макрофагов [214, 295, 300]. Маркер CD68 – представитель семейства скавенджер-рецепторов, следовательно, его экспрессия повышается на поверхности макрофагов, отвечающих за воспалительные стимулы [210].

Анализ препаратов печени показал, что Iba-1- и CD68-позитивные клетки при иммуногистохимическом окрашивании имели разную форму (от округлой до вытянутой с отростками) и различную степень интенсивности коричневой окраски. Они располагались около центральных вен печеночных долек, между печеночными балками и в области портальных зон. Визуально отмечено, что в печени крыс опытной группы Iba-1-позитивные клетки имели преимущественно светло-коричневую окраску. Iba-1-позитивные клетки, в

сравнении с CD68-позитивными, были визуально крупнее и со множеством отростков (Рисунок 25).

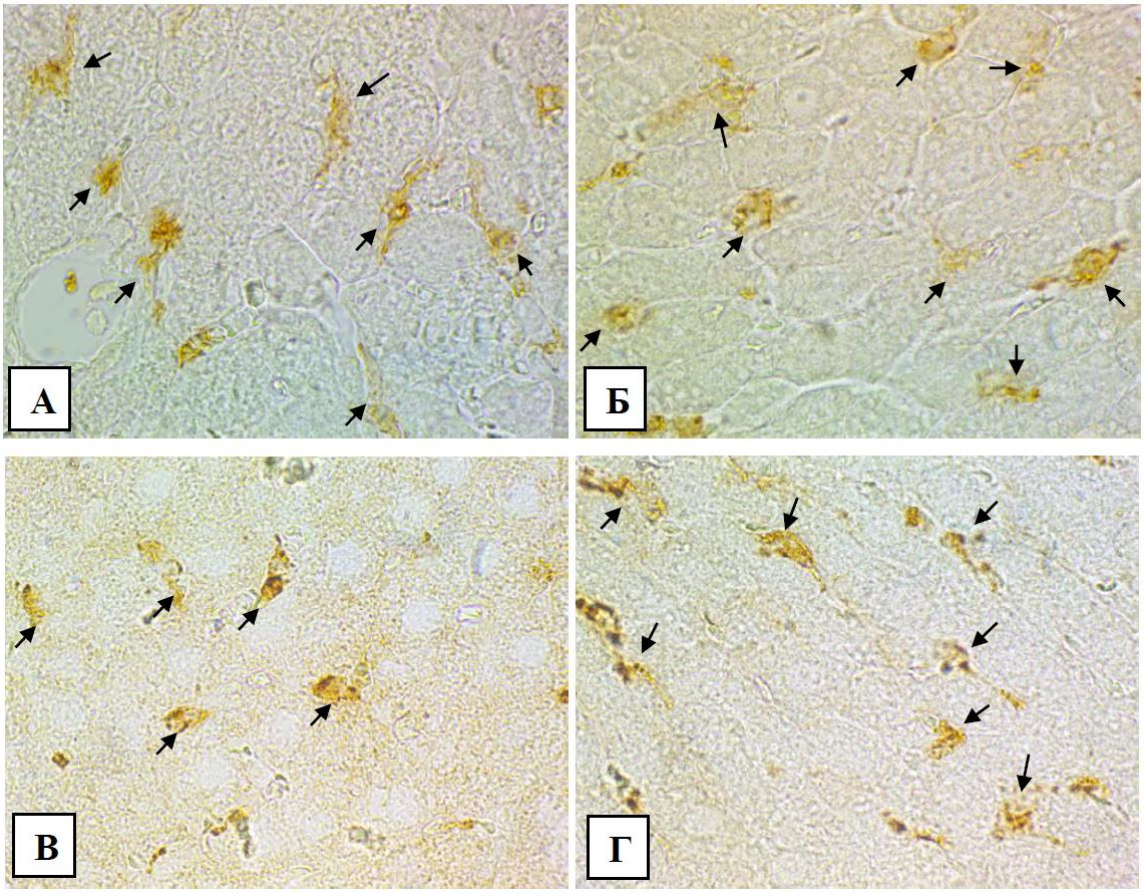



Рисунок 25 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев. Иммуногистохимическое выявление Iba-1- и CD68-позитивных клеток при помощи моноклональных антител. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 100. Цифровая камера AmScope (MU1000):
А, Б – Iba-1-позитивные клетки печени крыс; В, Г – CD68-позитивные клетки печени крыс; А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс опытной группы. Стрелками указаны Iba-1- (А, Б) и CD68-позитивные клетки (В, Г)

Результаты морфометрии подтвердили визуальные наблюдения (Таблица 14).

Таблица 14 – Сравнение количественных характеристик Iba-1$^+$ и CD68$^+$ макрофагов печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

| Параметр | Iba-1$^+$ макрофаги | | CD68$^+$ макрофаги | |
|---|---|---|---|---|
| | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
| Площадь макрофагов, мкм$^2$ | 43,44 (26,61; 69,83) | 37,87 (23,33; 58,95)* | 29,95 (17,69; 47,30) | 29,85 (18,23; 48,36) |
| Периметр макрофагов, мкм | 28,61 (20,21; 41,01) | 27,50 (19,65; 38,43)* | 22,88 (15,44; 31,69) | 21,87 (15,75; 29,89) |
| Площадь, занимаемая макрофагами, относительно площади микрофотографии, % | 1,23 (0,94; 1,95) | 1,43 (1,23; 1,90) | 1,01 (0,90; 1,18) | 1,25 (0,95; 1,85)* |
| Индекс контура клетки | 4,34 (3,93; 4,89) | 4,48 (4,07; 5,00)* | 4,19 (3,68; 4,59) | 3,99 (3,67; 4,30)* |
| Коэффициент формы клетки | 0,66 (0,52; 0,81) | 0,63 (0,50; 0,75)* | 0,71 (0,59; 0,92) | 0,79 (0,31; 1,31)* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия, $p < 0,05$. Площадь микрофотографии = 93119,06 мкм$^2$.

Так, медиана площади Iba-1-позитивных клеток в печени крыс опытной группы уменьшалась в 0,87 раза ($p = 0,001$), а медиана периметра клеток – в 0,96 раза ($p = 0,08$). Распределение клеток по площади на малые, средние, большие и очень большие выявило, что среди Iba-1-позитивных клеток наблюдается увеличение доли малых и средних, а также уменьшение доли больших по размеру клеток (Таблица 15).

Таблица 15 – Распределение популяций $Iba1^+$ и $CD68^+$ макрофагов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, по размеру клеток, %

| Размер макрофагов | Площадь, мкм$^2$ | Доля Iba-1$^+$ макрофагов | | Площадь, мкм$^2$ | Доля $CD68^+$ макрофагов | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Контроль, % | Опыт, % | | Контроль, % | Опыт, % |
| Малые | 4,45–35,46 | 39 | 47 | 1,85–19,79 | 30 | 28 |
| Средние | 35,46–66,48 | 33 | 36 | 19,79–37,73 | 33 | 35 |
| Большие | 66,48–97,49 | 17 | 11 | 37,63–55,67 | 20 | 18 |
| Очень большие | > 97,49 | 11 | 6 | > 55,67 | 17 | 19 |

Медиана площади CD68-позитивных клеток печени крыс опытной группы, в сравнении с контрольной, практически не изменялась ($p = 0,63$). Уменьшалось значение медианы периметра клеток в 0,95 раза ($p = 0,10$). При определении коэффициента формы и индекса контура клеток выявлено, что CD68-позитивные макрофаги опытной группы, среди всех исследуемых групп, имели наиболее приближенные показатели к значениям идеального круга.

Среднее количество Iba-1- и CD68-позитивных клеток печени крыс на микрофотографию со случайного поля зрения ($S = 93119,06$ мкм$^2$) для контрольной группы составило $26,38 \pm 0,62$ и $26,53 \pm 1,75$, для опытной – $34,24 \pm 2,59$ и $32,87 \pm 1,64$ соответственно. Следовательно, наблюдалось возрастание Iba-1-позитивных клеток в 1,29 раза ($p = 0,02$), CD68-позитивных клеток – в 1,32 раза ($p = 0,01$) в печени крыс опытной группы. Медиана площади, занимаемой Iba-1 и CD68-позитивными макрофагами, относительно площади микрофотографии со случайного поля зрения увеличивалась в 1,16 ($p = 0,38$) и 1,23 ($p = 0,01$) раза соответственно.

С помощью программы ImageJ была замерена интенсивность иммунофлуоресценции каждой Iba-1- и CD68-позитивной клетки отдельно. Выявлено уменьшение интенсивности иммунофлуоресценции в Iba-1-позитивных клетках (красная флуоресценция) печени крыс опытной группы в 0,89 раза ($p = 0,01$) и увеличение ее в CD68-позитивных структурах (зеленая флуоресценция) в 1,05 раза ($p = 0,27$). Полученные данные были представлены в виде графиков, построенных с использованием плагина Graphics RGB Profile Plot программы ImageJ по микрофотографиям препарата печени крыс контрольной и опытной групп с одновременной экспрессией Iba-1 и CD68 (Рисунок 26).

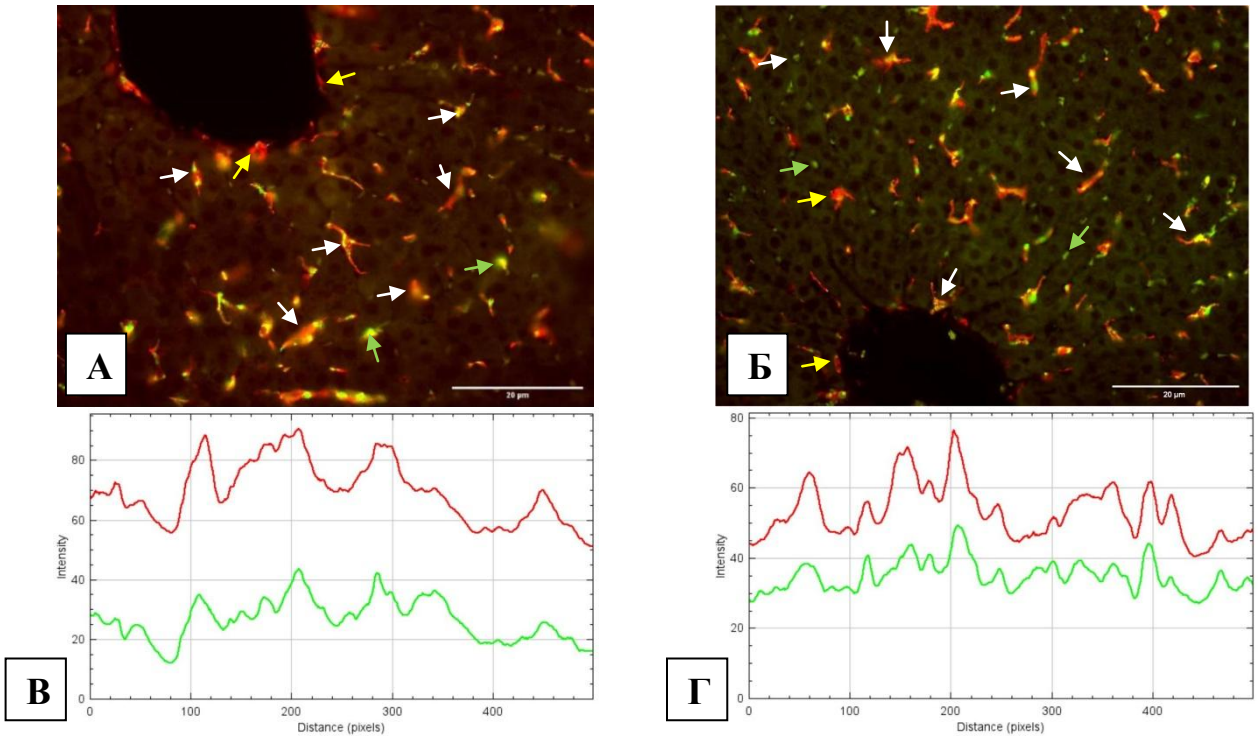



Рисунок 26 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев. Иммуногистохимическое выявление Iba-1- и CD68-позитивных клеток при помощи моноклональных антител, меченых флюорохромом (Iba-1– красная флуоресценция; CD68 – зеленая флуоресценция). Микроскоп BX51 Olympus microscope (Япония). Об. 40: А, В – печень крыс контрольной группы; Б, Г – печень крыс опытной группы. Белыми стрелками указаны клетки экспрессирующие оба маркера (Iba-1 и CD68), желтыми стрелками – экспрессирующие Iba-1, зелеными стрелкам – экспрессирующие CD68 клетки. В, Г – графики интенсивности флуоресценции Iba-1- и CD68-позитивных клеток. Красная линия графика отображает интенсивность иммунофлуоресценции Iba-1-позитивных клеток, зеленая линия – CD68-позитивных клеток

В печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, по тому же принципу, что и в предыдущем случае, проводили количественную оценку CD68-позитивных клеток (Таблица 15).

Таблица 15 – Сравнение количественных характеристик $CD68^+$ макрофагов печени лабораторных крыс контрольной и опытной групп, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

| Параметр | Контроль (n=20) | Опыт (n=20) |
|---|---|---|
| Площадь макрофагов, мкм$^2$ | 79,41 (53,75; 108,23) | 40,76 (22,84; 65,51)* |
| Периметр макрофагов, мкм | 44,99 (32,04; 59,44) | 28,33 (17,98; 38,56)* |
| Площадь, занимаемая макрофагами, относительно площади микрофотографии, % | 5,85 (4,98; 6,21) | 2,29 (1,85; 2,68)* |
| Индекс контура клетки | 5,04 (4,37; 5,71) | 4,42 (3,83; 4,73)* |
| Коэффициент формы клетки | 0,49 (0,38; 0,65) | 0,64 (0,56; 0,85)* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия, $p < 0,05$. S микрофотографии = 93119,06 мкм$^2$

По данным Таблицы 15 выявлено статистически значимое уменьшение медианы площади и периметра CD68-позитивных клеток печени в 0,51 и 0,63 раза в печени крыс опытной группы соответственно ($p = 0,001$).

Медиана площади, занимаемой макрофагами, относительно площади микрофотографии со случайного поля зрения снижалась в 0,39 раза в печени крыс опытной группы ($p = 0,001$). Зафиксировано уменьшение индекса контура и увеличение коэффициента формы клетки ($p = 0,001$), что свидетельствует об округлении клеток и уменьшении их отростчатости, изначально характерной для клеток Купфера печени (Рисунок 27).

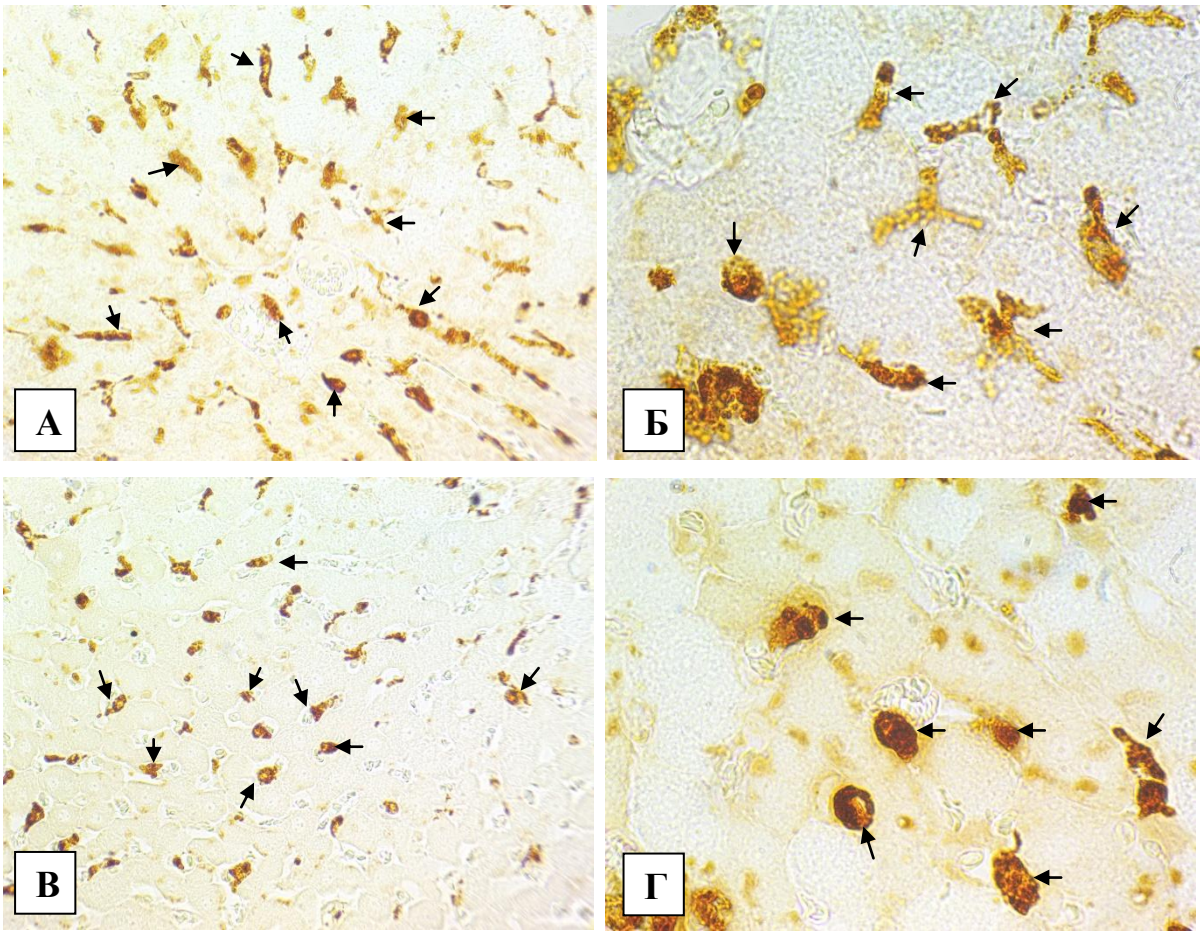



Рисунок 27 – Печень крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев. Иммуногистохимическое выявление CD68-позитивных клеток при помощи моноклональных антител. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 40 (А, В) и 100 (Б, Г). Цифровая камера AmScope (MU1000):
А, Б – CD68-позитивные клетки печени крыс контрольной группы;
В, Г – CD68-позитивные клетки печени крыс опытной группы.
Черными стрелками указаны CD68-позитивные клетки

Распределение CD68-позитивных клеток печени по размерам на малые, средние, большие и очень большие выявило статистически значимое увеличение доли макрофагов малого ($p = 0,001$) и среднего ($p = 0,034$) размера и уменьшение доли очень больших клеток ($p = 0,001$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Распределение популяций $CD68^+$ макрофагов печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

| Размер макрофагов | Площадь, мкм$^2$ | Доля $CD68^+$ макрофагов | |
|---|---|---|---|
| | | Контроль, % | Опыт, % |
| Малые | 5,74-27,71 | 3 | 31* |
| Средние | 27,71-49,68 | 18 | 31* |
| Большие | 49,68-71,65 | 21 | 18 |
| Очень большие | >71,65 | 58 | 20* |

*Примечание.* * – статистически значимые различия $p < 0,05$.

Количество CD68-позитивных клеток на микрофотографию со случайного поля зрения в печени крыс контрольной группы составило 52,16 ± 1,07, а для опытной группы – 55,87 ± 2,52 клеток, что соответствует данным, полученным при измерении площадей клеток и их общей площади, занимаемой на микрофотографию.

Интенсивность светопропускания цитоплазматической мембраны CD68-позитивных клеток печени составила 110,20 ± 11,06 и 102,47 ± 1,66 у. е., цитоплазмы – 88,15 ± 8,15 и 83,96 ± 1,82 у. е. для контрольной и опытной групп соответственно [83, 86].

## 3.9. Иерархический кластерный и факторный анализы данных

Кластерный анализ – это метод статистического анализа, используемый для упорядочения объектов исследования в сравнительно однородные группы по тем или иным признакам и свойствам. Данный метод нередко используется в медицине. Так, например, с помощью кластерного анализа были выявлены прогностически важные профили генов, экспрессирующихся при раке молочной железы [154]. Известно, что иерархический кластерный анализ

морфологических параметров используется для объективного описания и классификации морфологических изменений при гомеостатических и невропатологических состояниях [228, 298, 299].

Перед проведением кластерного и факторного анализов была произведена нормализация выборки [140]. Для этого была использована следующая формула, которая не чувствительна к выбросам:

$$x_i = 0{,}5 \times \tanh(0{,}01 \times \frac{x-M}{\sigma} + 1),$$

где $x$ – исходные данные, $x_i$ – нормализованные данные, $M$ – среднее арифметическое, σ – стандартное отклонение.

Факторный анализ представляет собой совокупность моделей и методов, которые ориентированы на выявление и анализ внутренних причин (факторов), формирующих процесс, на основании информации об их каких-либо внешних проявлениях (признаков, характеристик). Иными словами, несмотря на то, что фактор неизвестен, данный метод позволяет объединять несколько параметров в одну группу, на основании чего, используя имеющийся материал, возможно построение гипотезы [16, 34].

### 3.9.1. Кластерный анализ морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев

Для построения дендрограммы по данным замеров структур печени лабораторных крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев (Рисунок 28, 29), использован метод полной связи (метод дальнего соседа), который наиболее предпочтителен при существенном различии исходных данных [34].

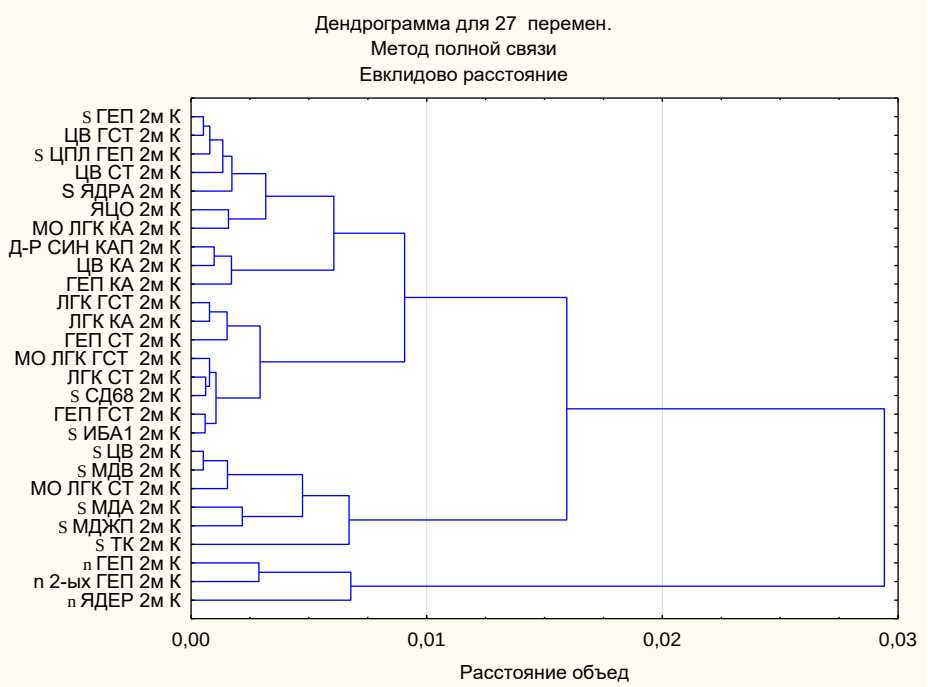



Рисунок 28 – Дендрограмма морфометрических данных печени лабораторных крыс контрольной группы, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

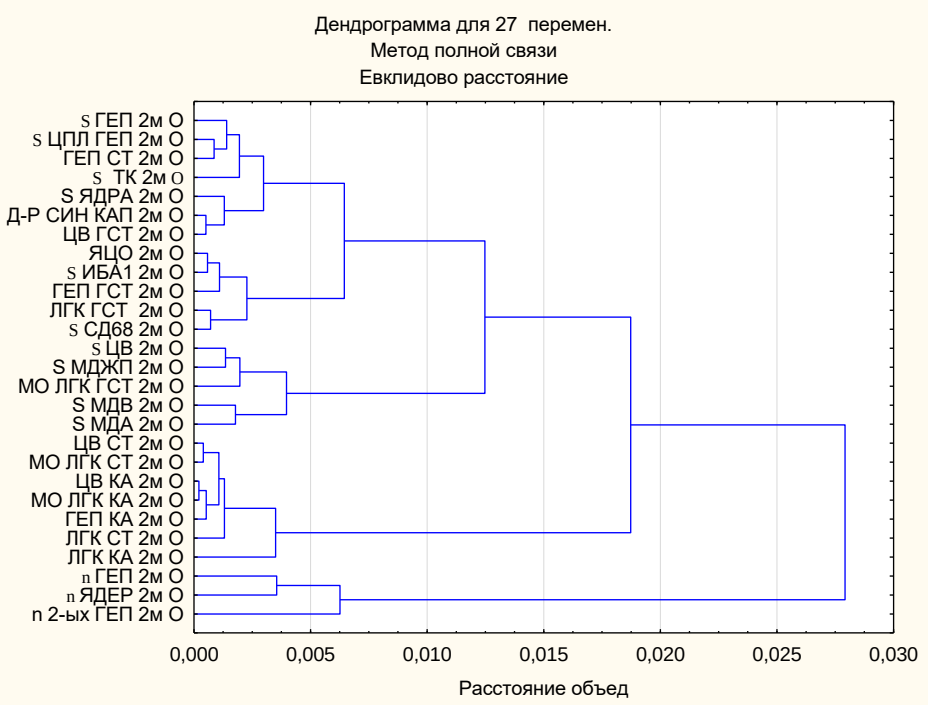



Рисунок 29 – Дендрограмма морфометрических данных печени лабораторных крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев

По дендрограммам, объединяющим структуры печени крыс контрольной и опытной групп, четко выделяется 10 и 11 взаимосвязанных между собой кластеров соответственно (Рисунок 28, 29).

При анализе дендрограмм контрольной и опытной групп обнаруживалось объединение показателей интенсивности люминесценции гистамина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК ГСТ) с площадью поперечного сечения центральных вен (S ЦВ), междольковых артерий (S МДА), вен (S МДВ) и желчного протока (S МДЖП) в один кластер в печени крыс опытной группы, в то время как в контрольной группе вместо гистамина (МО ЛГК ГСТ) присутствовал серотонин (МО ЛГК СТ). Другой кластер, включающий в себя площадь одноядерных гепатоцитов (S ГЕП), площадь цитоплазмы одноядерных гепатоцитов (S ЦПЛ ГЕП) и площадь ядер одноядерных гепатоцитов (S ЯДРА), интегрировал с двумя биогенными аминами – гистамином (ЦВ ГСТ) и серотонином (ЦВ СТ). Однако в опытной группе к вышеуказанным параметрам присоединялись площадь тучных клеток (S ТК) и диаметр синусоидных капилляров (Д-Р СИН КАП). Вероятно, наблюдается активация тучных клеток, что в принципе объясняется увеличением их площадей и возрастанием доли метахроматичных дегранулирующих клеток. Объединение интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах (ГЕП ГСТ) и люминесцирующих гранулярных клеток (ЛГК ГСТ) с Iba-1- (S ИБА1) и CD68-позитивными клетками (S СД68), соответственно, в один кластер, также подтверждает ведущее влияние гистамина в печени крыс опытной группы.

В целях понимания механизмов взаимодействия замеренных параметров печени лабораторных крыс на поступление кремния с питьевой водой в течение двух месяцев в концентрации 20 мг/л проведен более подробный анализ кластеров. Так, в первый кластер в печени крыс опытной группы (2 месяца) объединены площадь одноядерного гепатоцита (S ГЕП 2м О), площадь цитоплазмы одноядерного гепатоцита (S ЦПЛ ГЕП 2м О), интенсивность

люминесценции серотонина в гепатоцитах (ГЕП СТ 2м О), площадь тучных клеток (S ТК 2м О). Данное взаимодействие объясняется тем, что тучные клетки способны синтезировать серотонин, а печень непосредственно участвует в процессах его утилизации [78, 79]. Второй кластер включает диаметр синусоидных капилляров (Д-Р СИН КАП 2м О), интенсивность люминесценции гистамина в оболочках центральных вен (ЦВ ГСТ 2м О), площадь ядер одноядерных гепатоцитов (S ЯДРА 2м О). Обнаруживаемое взаимодействие между интенсивностью люминесценции гистамина в оболочках центральных вен и диаметром синусоидных капилляров связано с тем, что гистамин принимает непосредственное участие в регуляции тонуса сосудов, а именно расслаблении [227]. Включение во второй кластер площади ядра одноядерного гепатоцита, возможно, связано с его участием в регуляции метаболизма гистамина [198]. Особый интерес представляет третий (ядерно-цитоплазматическое отношение одноядерных гепатоцитов (ЯЦО 2м О), площадь Iba-1-позитивных клеток (S ИБА1 2м О), интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах (ГЕП ГСТ 2м О)) и четвертый кластеры (интенсивность люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК ГСТ 2м О), площадь CD68-позитивных клеток (S СД68 2м О)), объединенные между собой. Обнаруженные изменения позволяют сделать вывод, что увеличение интенсивности люминесценции гистамина непосредственно связано с изменением площади макрофагов, экспрессирующих изучаемые маркеры Iba-1 и CD68 [232]. В свою очередь, гистамин оказывает воздействие на состояние гепатоцитов, проявляющееся изменением ядерно-цитоплазматического отношения. Ранее установлено, что гистамин влияет на клетки печени, участвует в регуляции процессов гликогенолиза, глюконеогенеза, а также уреагенеза [171]. Пятый (площадь поперечного сечения центральной вены (S ЦВ 2м О), площадь поперечного сечения междолькового желчного протока (S МДЖП 2м О), интенсивность люминесценции гистамина в микроокружении люминесцирующих

гранулярных клеток (МО ЛГК ГСТ 2м О)) и шестой (площадь поперечного сечения междольковой вены (S МДВ 2м О), площадь поперечного сечения междольковой артерии (S МДА 2м О)) кластеры можно объединить в связи с тем, что гистамин обладает миорелаксирующим действием на сосуды [229]. Вероятно, с этим связаны изменения, наблюдаемые в печени крыс опытной группы, в том числе выявленные при замере площади поперечного сечения центральных и междольковых вен. Интенсивность люминесценции серотонина в оболочках центральных вен (ЦВ СТ 2м О) и интенсивность люминесценции серотонина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК СТ 2м О) образуют седьмой кластер, объединяющийся с восьмым (интенсивность люминесценции катехоловых аминов в оболочках центральных вен (ЦВ КА 2м О), интенсивность люминесценции катехоловых аминов в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК КА 2м О), интенсивность люминесценции катехоловых аминов в гепатоцитах (ГЕП КА 2м О)), девятым (интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК СТ 2м О)) и десятым (интенсивность люминесценции катехоловых аминов в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК КА 2м О)) кластерами. Можно предположить, что объединение данных показателей в одну большую группу связано с общей тенденцией к росту этих биогенных аминов. Одиннадцатый кластер объединил в себе количественные характеристики, а именно количество гепатоцитов на поле зрения (n ГЕП 2м О), количество ядер гепатоцитов на поле зрения (n ЯДЕР 2м О) и количество двуядерных гепатоцитов на поле зрения (n 2-ых ГЕП 2м О).

### 3.9.2. Кластерный анализ морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев

В печени крыс, находившихся в эксперименте в течение девяти месяцев, также использован метод полной связи (метод дальнего соседа) для кластеризации. Данные кластерного анализа количественных замеров печени крыс контрольной и опытной групп представлены в виде дендрограмм (Рисунок 30, 31).

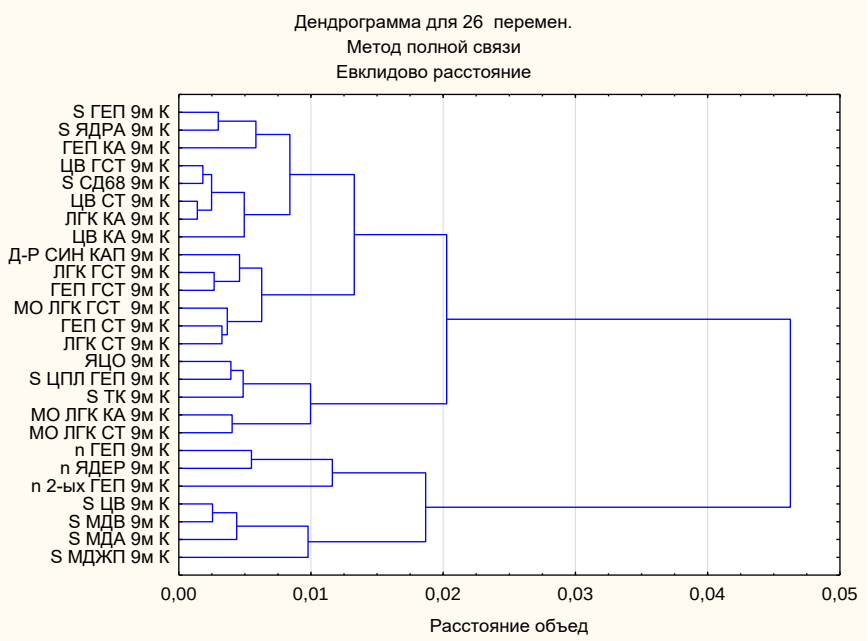



Рисунок 30 – Дендрограмма морфометрических данных печени лабораторных крыс контрольной группы, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

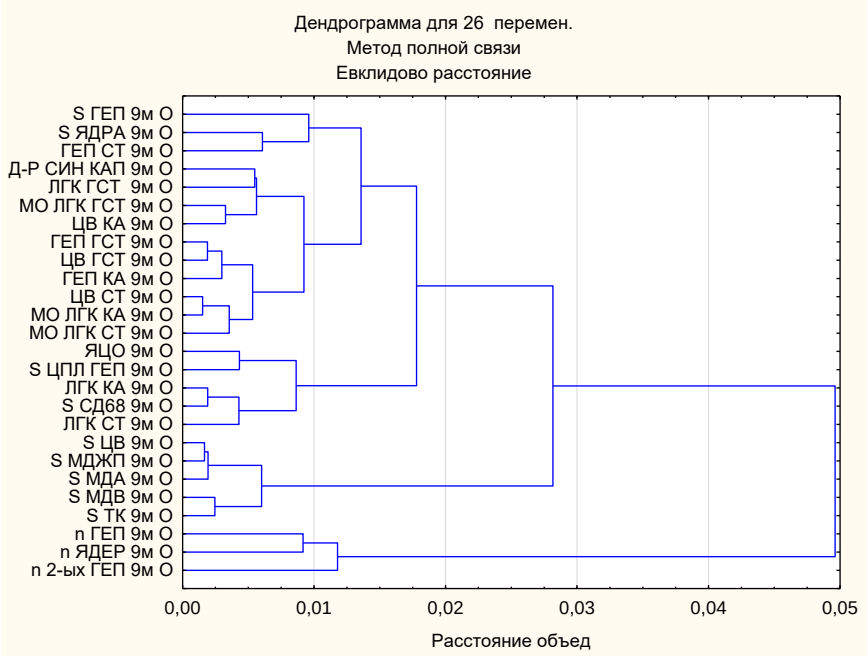



Рисунок 31 – Дендрограмма морфометрических данных печени лабораторных крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев

При сравнении данных кластерного анализа печени крыс контрольной и опытной групп обнаружено преобладание серотонина как ведущего биогенного амина. Интересным является объединение площади CD68-позитивных клеток (S СД68) с интенсивностью люминесценции катехоловых аминов и серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК КА; ЛГК СТ) в печени крыс опытной группы, которые, вероятно, являются одними и теми же клетками, в то время как в контрольной группе площади CD68-позитивных клеток (S СД68) объединяются в один кластер с интенсивностью люминесценции гистамина в оболочках центральных вен (ЦВ ГСТ). Увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в изучаемых структурах печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев, в сравнении с теми же показателями контрольной группы и данными, полученными при цитоспектрофлуориметрии печени крыс опытной группы, находившейся в эксперименте в течение двух месяцев, позволило предположить, что они являются ведущими медиаторами, участвующими в

процессах, возникающих в печени. Кроме того, в печени крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев, наблюдался несколько иной способ кластеризации в сравнении с печенью крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в течение двух месяцев (Рисунок 28). Так, первый кластер сформировывался из средней площади одноядерного гепатоцита (S ГЕП 9м О), площади ядер одноядерных гепатоцитов (S ЯДРА 9м О) и интенсивности люминесценции серотонина в гепатоцитах (ГЕП СТ 9м О). Катехоловые амины и серотонин относятся к митогенам. Так, установлено, что норадреналин (ко-митоген) опосредованно через «перекрестные помехи» может усиливать действие стимулирующих пролиферацию цитокинов EGF (эпидермальный фактор роста), TGF-α (трансформирующий фактор роста-α), HGF (фактор роста гепатоцитов), PDGF (фактор роста тромбоцитов), инсулина. Серотонин же относится к непрямым митогенам, влияющим на пролиферацию гепатоцитов посредством аутокринной секреции TGF-α из гепатоцитов через $5\text{-}HT_{2B}$/Gq/фосфоинозитид-специфическую фосфолипазу C (PLC)/$Ca^{2+}$ путь. Секретируемый гепатоцитами TGF-α способствует синтезу ДНК в ядре, а также пролиферации самих клеток [249]. Соответственно, биогенные амины непосредственно будут влиять на состояние ядерного аппарата клетки.

Второй кластер содержит в себе такие параметры, как диаметр синусоидных капилляров (Д-Р СИН КАП 9м О) и интенсивность люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК ГСТ 9м О), а третий – интенсивность люминесценции гистамина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК ГСТ 9м О) и интенсивность люминесценции катехоловых аминов в оболочках центральных вен (ЦВ КА 9м О). Относительно последнего кластера отметим, что ранее в работах Козлова В. А. (2009) было обнаружено отрицательное коррелирование между интенсивностью люминесценции гистамина и

катехоловых аминов [48]. Кроме того, известно, что действие данных биогенных аминов диаметрально противоположное [150]. Следующие параметры, такие как интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах (ГЕП ГСТ 9м О), интенсивность люминесценции гистамина в оболочках центральных вен (ЦВ ГСТ 9м О), интенсивность люминесценции катехоловых аминов в гепатоцитах (ГЕП КА 9м О), объединены в четвертый кластер. Пятый кластер включает в себя интенсивность люминесценции серотонина в оболочках центральных вен (ЦВ СТ 9м О), интенсивность люминесценции катехоловых аминов и серотонина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток (МО ЛГК КА 9м О, МО ЛГК СТ 9м О); шестой кластер группирует два параметра – ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО 9м О) и средняя площадь цитоплазмы гепатоцита (S ЦПЛ ГЕП 9м О).

Седьмой кластер объединяет в себе такие показатели, как интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК СТ О), площадь CD68-позитивных клеток (S СД68 9м О), а также интенсивность люминесценции катехоловых аминов в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК КА 9м О). CD68-позитивные клетки способны участвовать в процессах поглощения серотонина путем метаболизма его до 5-гидроксииндолуксусной кислоты [273]. Серотонин необходим макрофагам для внутриклеточной регуляции процессов фагоцитоза [79]. Кроме того, обнаружено, что с возрастом содержание серотонина в крови увеличивается [120]. Установлено участие макрофагов в метаболизме катехоловых аминов. Выявлено, что фактор дифференцировки роста (GDF3) в активируемых инфламмасомой макрофагах влияет на уровень моноаминоксидазы А, участвующей в разрушении норадреналина [196]. Вероятно, CD68-позитивные макрофаги в данном случае участвуют в метаболизме этих биогенных аминов, которые обнаруживаются в большем количестве в печени крыс опытной группы, в сравнении с контрольной. Данная взаимосвязь была обнаружена и в печени крыс контрольной группы, находившихся в эксперименте в течение

девяти месяцев, что позволило сделать предположение о старении организма лабораторных крыс на данном сроке эксперимента в сравнении с предыдущим, где подобных прямых взаимодействий в ходе кластерного анализа не наблюдалось.

Восьмой кластер включает в себя площадь поперечного сечения центральной вены (S ЦВ 9м О), площадь поперечного сечения междолькового желчного протока (S МДЖП 9м О), площадь поперечного сечения междольковой артерии (S МДА 9м О). С последним связывается девятый кластер – площадь поперечного сечения междольковой вены (S МДВ 9м О), площадь тучных клеток (S ТК 9м О). Обозначенное взаимодействие, вероятно, связано с деятельностью тучных клеток, а именно высвобождением медиаторов и расширением сосудов печени. Что же касается десятого кластера, то он такой же по составу, как и в печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев.

### 3.9.3. Факторный анализ морфометрических данных печени крыс через два месяца от начала эксперимента

Для проведения факторного анализа в первую очередь использовалась, так же как и в предыдущем методе, нормализация данных. Путем построения графика «Каменистой осыпи» для каждой из экспериментальных групп выделены два ведущих фактора. Пример одного из графиков представлен на Рисунке 32. В целях более легкой интерпретации данных использован метод вращения факторов – «Варимакс исходных», который приводит к еще большему увеличению или уменьшению малых нагрузок факторов. Данные представлены в виде графиков (Рисунок 33, 34) и Таблицы 17.

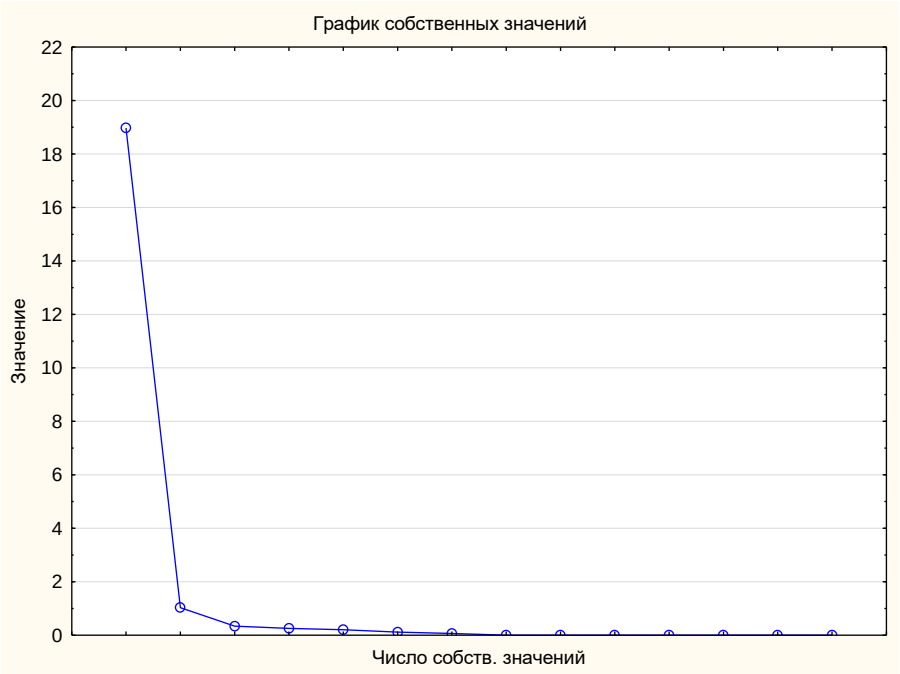



Рисунок 32 – График «Каменистой осыпи» для факторного анализа морфометрических данных печени лабораторных крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

Проведен факторный анализ замеренных структур печени лабораторных крыс контрольной и опытной групп (Рисунок 33, 34).

В печени крыс контрольной группы определяется один фактор, объединяющий девять параметров: S ЯДРА 2м К, S СД68 2м К, ЯЦО К 2м, S ИБА1 2м К, S ГЕП 2м К, S ЦПЛ ГЕП 2м К, S ЦВ 2м К, Д-Р СИН КАП 2м К, ЛГК ГСТ 2м К (Рисунок 33, Таблица 17). Вместе с тем в печени крыс опытной группы выделяются восемь параметров, объединяемых первым фактором и имеющих большие нагрузки (S ЦВ 2м О, ЛГК СТ О, S МДА 2м О, ЛГК ГСТ 2м О, S МДЖП 2м О, S МДВ 2м О, S ТК 2м О, Д-Р СИН КАП 2м О); семь параметров – вторым фактором (ЛГК КА О, S ЯДРА 2м О, S ИБА1 2м О, S СД68 2м О, S ГЕП 2м О, S ЦПЛ ГЕП 2м О; ЯЦО 2м О) (Рисунок 34, Таблица 17).

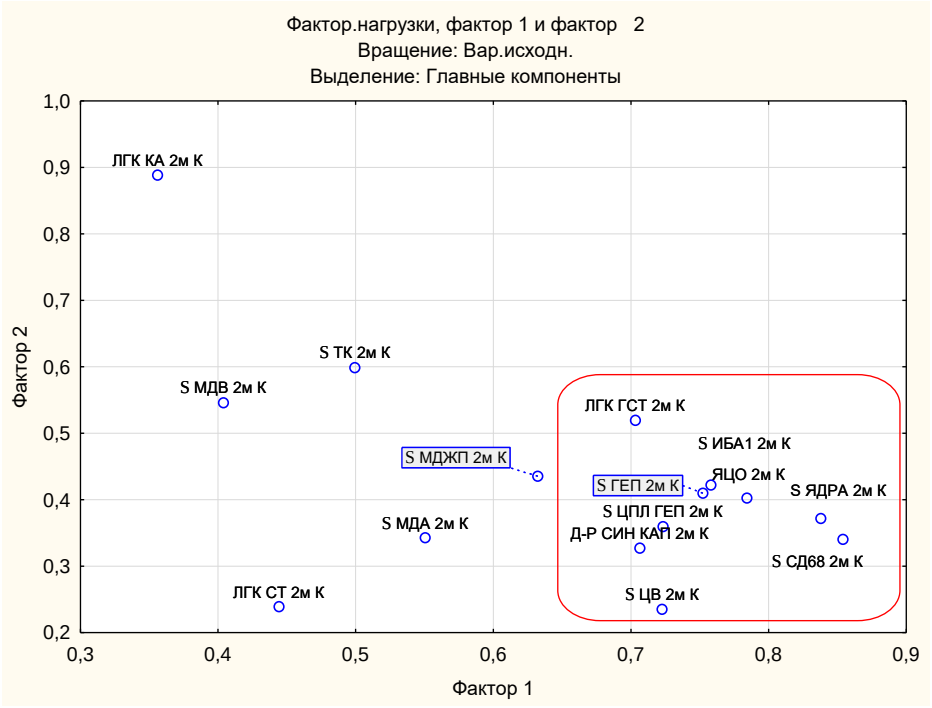



Рисунок 33 – Факторный анализ морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

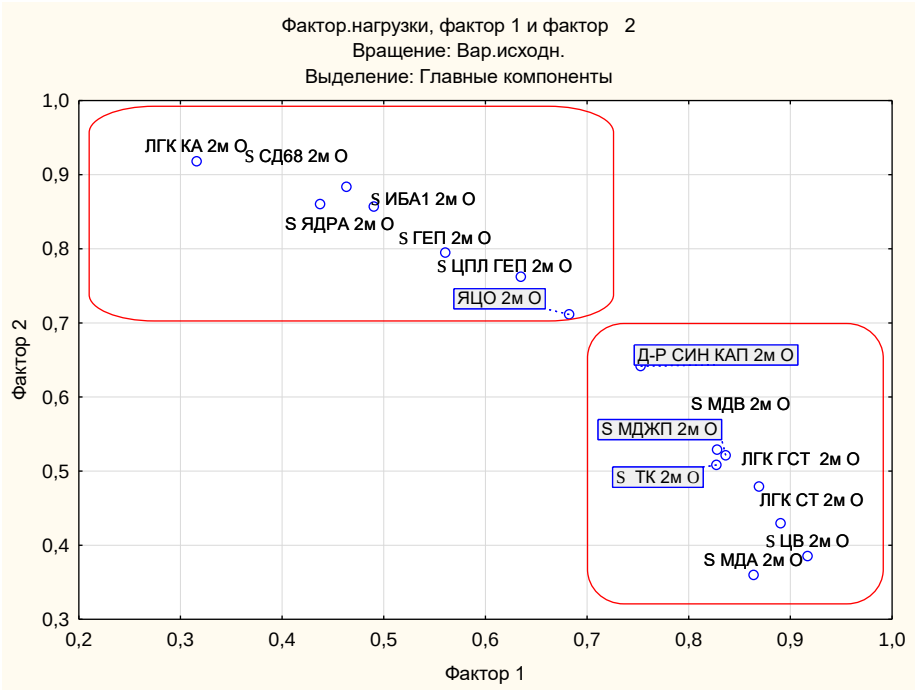



Рисунок 34 – Факторный анализ морфометрических данных печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

Таблица 17 – Факторная модель взаимодействия морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

| Параметр | Контроль | | Опыт | |
|---|---|---|---|---|
| | Фактор 1 | Фактор 2 | Фактор 1 | Фактор 2 |
| S ГЕП 2м | 0,752323* | 0,409980 | 0,560553 | 0,795009* |
| S ЯДРА 2м | 0,837965* | 0,371799 | 0,463396 | 0,883359* |
| ЯЦО 2м | 0,784270* | 0,402505 | 0,682486 | 0,711478* |
| S ЦПЛ ГЕП 2м | 0,723216* | 0,359634 | 0,634795 | 0,762196* |
| Д-Р СИН КАП 2м | 0,706452* | 0,327185 | 0,752798* | 0,641544 |
| S ЦВ 2м | 0,722726* | 0,235138 | 0,917080* | 0,385223 |
| S МДВ 2м | 0,403873 | 0,546064 | 0,828061* | 0,529052 |
| S МДА 2м | 0,550540 | 0,342813 | 0,863800* | 0,359901 |
| S МДЖП 2м | 0,632326 | 0,435314 | 0,836443* | 0,521305 |
| ЛГК ГСТ 2м | 0,703184* | 0,519834 | 0,869110* | 0,478829 |
| ЛГК СТ 2м | 0,444207 | 0,238984 | 0,890640* | 0,429813 |
| ЛГК КА 2м | 0,356068 | 0,888562* | 0,315884 | 0,917719* |
| S ТК 2м | 0,499470 | 0,598630 | 0,827464* | 0,508343 |
| S ИБА1 2м | 0,758066* | 0,422415 | 0,490394 | 0,856947* |
| S СД68 2м | 0,854006* | 0,340294 | 0,437445 | 0,860306* |
| Общая дисперсия | 6,665780 | 3,134685 | 7,701839 | 6,729789 |
| Доля общей дисперсии | 0,444385 | 0,208979 | 0,513456 | 0,448653 |

*Примечание.* ***** – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$.

Выявлено, что параметры, объединяемые первым фактором в печени крыс контрольной группы и вторым фактором в печени крыс опытной группы, имеют схожий состав (Рисунок 33, 34). Наряду с этим в печени крыс опытной группы появляются параметры (все сосуды, тучные клетки и люминесцирующие гранулярные клетки, содержащие серотонин и гистамин), которые объединяются первым фактором. Вероятно, тучные клетки

вырабатывают данные биогенные амины и оказывают влияние на состояние замеренных сосудов печени.

### 3.9.4. Факторный анализ морфометрических данных печени крыс через девять месяцев от начала эксперимента

По тому же принципу, что изложен выше, обработаны замеры печени крыс контрольной и опытной групп, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев. Результаты представлены в виде Рисунков 35 и 36, а также Таблицы 18.

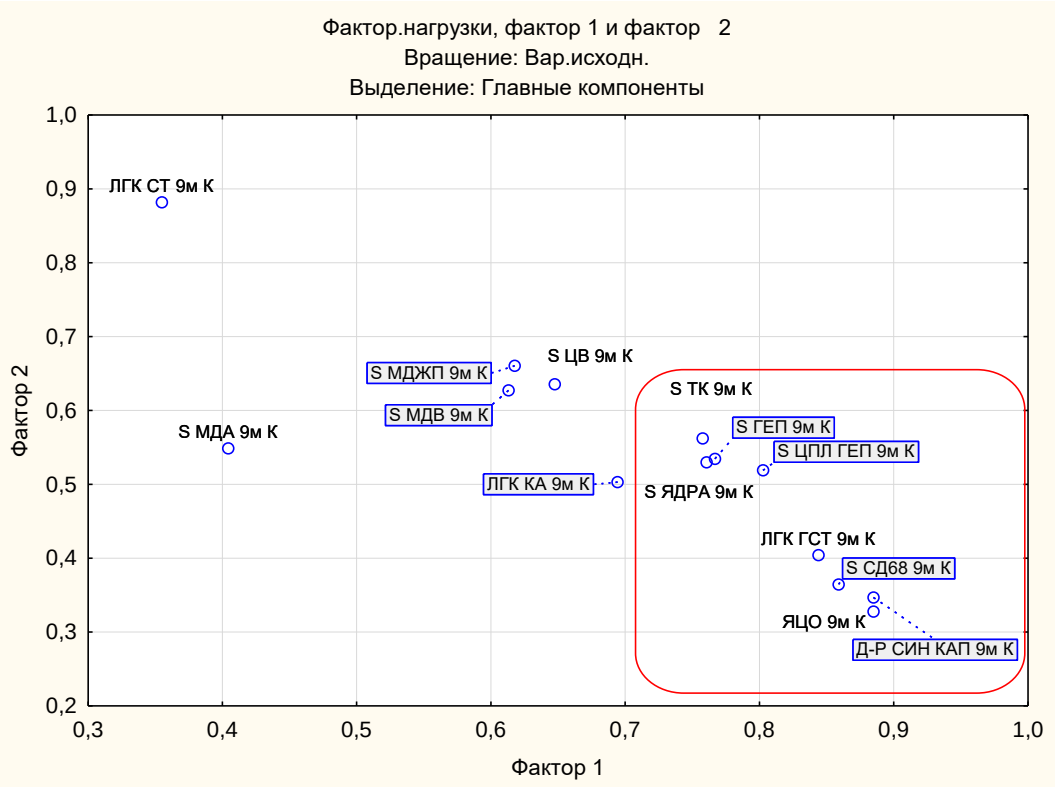



Рисунок 35 – Факторный анализ морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

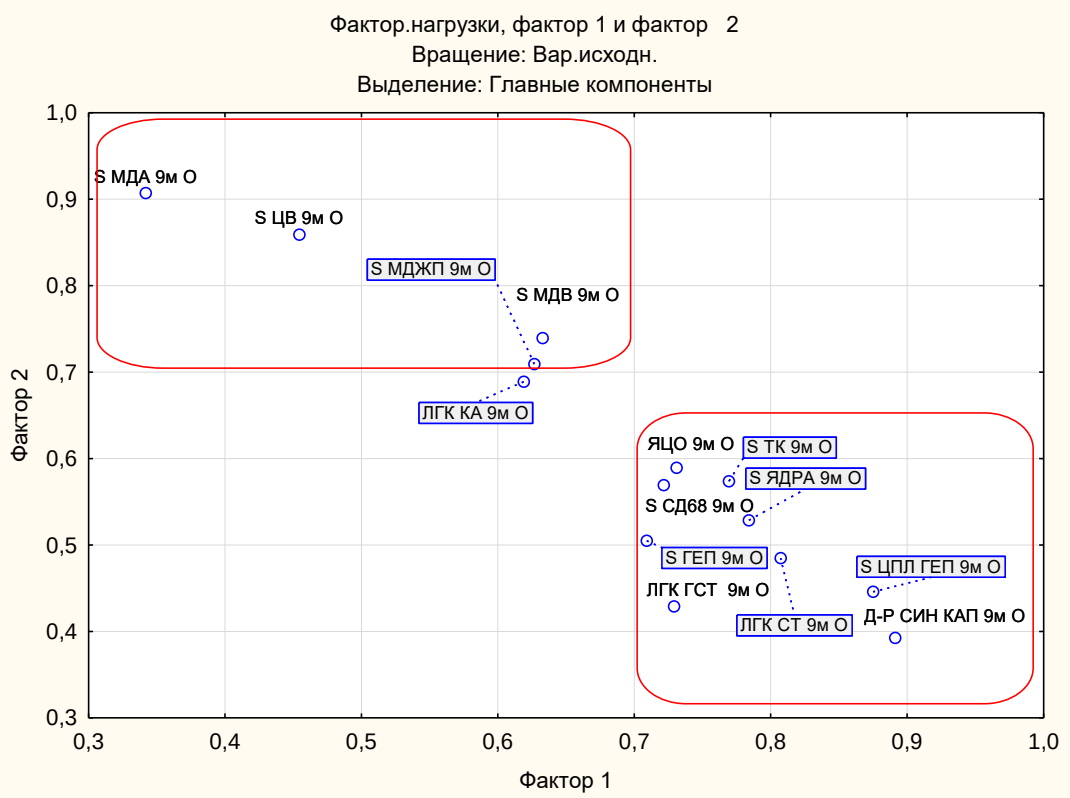



Рисунок 36 – Факторный анализ морфометрических данных печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

В печени крыс контрольной группы первым фактором объединяются восемь параметров: Д-Р СИН КАП 9м К, ЯЦО 9м К, S СД68 9м К, ЛГК ГСТ 9м К, S ЦПЛ ГЕП 9м К, S ГЕП 9м К, S ТК 9м К (Рисунок 35, Таблица 18). В опытной группе первый фактор объединяет те же параметры, что и в контрольной группе, а также интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК СТ 9м О). Кроме того, так же как в печени крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в течение двух месяцев, формируется второй фактор, который в данном случае группирует четыре параметра (S МДА 9м О, S ЦВ 9м О, S МДВ 9м О, S МДЖП 9м О) (Рисунок 36, Таблица 18).

Интересным является то, что второй фактор обнаруживается только в печени крыс опытной группы и имеет схожий состав. Следовательно, можно с

уверенностью сказать, что данные изменения связаны с действием водорастворимого кремния, поступающего в концентрации 20 мг/л.

Таблица 18 – Факторная модель взаимодействия морфометрических данных печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «Варимакс»)

| Параметр | Контроль | | Опыт | |
|---|---|---|---|---|
| | Фактор 1 | Фактор 2 | Фактор 1 | Фактор 2 |
| S ГЕП 9м | 0,766782* | 0,534449 | 0,709115* | 0,505038 |
| S ЯДРА 9м | 0,760702* | 0,529718 | 0,783956* | 0,528739 |
| ЯЦО 9м | 0,885024* | 0,327784 | 0,730953* | 0,589321 |
| S ЦПЛ ГЕП 9м | 0,802623* | 0,518945 | 0,875031* | 0,445963 |
| Д-Р СИН КАП 9м | 0,884889* | 0,346716 | 0,891148* | 0,392657 |
| S ЦВ 9м | 0,647534 | 0,635474 | 0,454414 | 0,859162* |
| S МДВ 9м | 0,613107 | 0,627274 | 0,632866 | 0,739371* |
| S МДА 9м | 0,404398 | 0,548920 | 0,341927 | 0,907274* |
| S МДЖП 9м | 0,617676 | 0,660661 | 0,626626 | 0,709274* |
| ЛГК ГСТ 9м | 0,843903* | 0,404403 | 0,729015* | 0,428960 |
| ЛГК КА 9м | 0,694416 | 0,503138 | 0,618929 | 0,688990 |
| ЛГК СТ 9м | 0,354826 | 0,881918* | 0,807369* | 0,484901 |
| S ТК 9м | 0,757823* | 0,561947 | 0,769266* | 0,573781 |
| S СД68 9м | 0,858985* | 0,364664 | 0,721514* | 0,569460 |
| Общая дисперсия | 7,349822 | 4,241514 | 7,006865 | 5,393387 |
| Доля общей дисперсии | 0,524987 | 0,302965 | 0,500490 | 0,385242 |

*Примечание.* ***** – корреляции, значимые на уровне $p < 0,05$.

Особый интерес среди структур печени крыс опытной группы, объединяемых первым фактором, представляют площадь цитоплазмы одноядерных гепатоцитов (S ЦПЛ ГЕП 9м О), диаметр синусоидных капилляров (Д-Р СИН КАП 9м О), интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК СТ 9м О), которые имеют

корреляцию от 0,8 до 0,9 в данной группе. В метаболизме серотонина принимает участие моноаминоксидаза А, обнаруживаемая в гепатоцитах, а именно в цитоплазме клетки на внешней мембране митохонодрий [79]. Серотонин, в свою очередь, участвует в регуляции тонуса сосудов, влияет на содержание мРНК [257] в сторону его увеличения, что также наблюдалось в эксперименте.

Анализ данных кластерного и факторного анализов позволил сделать предположение о непосредственной взаимосвязи между исследуемыми морфометрическими параметрами. На обоих сроках эксперимента важными участниками развивающегося в печени процесса, вызванного поступлением кремния, являются макрофаги и тучные клетки. Однако через девять месяцев эксперимента на фоне воспалительного процесса наблюдаются признаки старения печени (увеличение площадей гепатоцитов, цитоплазмы, ядер гепатоцитов, уменьшение диаметра сосудов и другие), проявляющегося преобладанием серотонина как ведущего медиатора, который увеличивает свою люминесценцию в органе и участвует в процессах физиологической регенерации [79]. Кроме того, обнаруживаемое ранее появление гепатоцитов в состоянии апоптоза (увеличение ядер с малой площадью и деформацией контура), увеличение количества двуядерных гепатоцитов в печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной, вероятно, свидетельствуют об усилении процессов репаративной регенерации [47], что также объясняется увеличением количества эозинофилов и интенсивности люминесценции серотонина.

# ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовано воздействие водорастворимого кремния, поступающего в составе питьевой воды в концентрации 20 мг/л, на печень лабораторных животных [91, 92]. Обнаруженные в микроскопическом строении печени лабораторных крыс изменения через два и девять месяцев эксперимента частично совпадают с данными, представленными в разделе диссертации 1.5. «Токсическое действие соединений кремния на печень в эксперименте». Однако эти исследования преимущественно затрагивают вопросы изучения изменений в печени при воздействии токсических доз диоксида кремния, которые нередко приводят к развитию фиброза [12, 261]. Тем не менее: расширение синусоидных капилляров, центральных вен, стаз крови в них, полиморфно-клеточная инфильтрация области портальных зон, появление ядер в состоянии пикноза, некроз гепатоцитов выявляемые в ряде работ [14, 128, 179, 195, 212], – определялись и в печени крыс, получавших кремний в предельно допустимых концентрациях.

Ранее была обнаружена взаимосвязь между способом введения наночастиц кремния в организм и их биодоступностью. Так, внутрибрюшинное введение наночастиц аморфного диоксида кремния вызывало более выраженные изменения в микроскопическом строении печени (в том числе развитие фиброза), чем поступающий перорально, несмотря на разницу в дозах вводимого кремния [129, 224, 233, 261]. В то же время в проведенных нами экспериментах при окраске препаратов печени по методу Ван-Гизона видимых изменений в виде разрастания соединительной ткани, характерного для фиброза, не обнаруживалось. Вероятно, это связано с концентрацией поступающего кремния с питьевой водой перорально, сроком действия, а также способностью печени к регенерации.

Преобладающее большинство авторов считает, что независимо от способа поступления соединений кремния изменения, возникающие в печени, связаны с прямым повреждающим воздействием данного микроэлемента и опосредованным, через активированные макрофаги печени.

Механизмы прямого токсического воздействия кремния на печень в настоящий момент не до конца изучены. Тем не менее известно, что ежедневное внутрибрюшинное введение наночастиц мезопористого кремния в течение 30 дней приводит к развитию воспаления и фиброза в печени путем активации цепи передачи сигнала TLR4/MyD88/NF-kB (толл-подобный рецептор 4/цитозольный адаптерный белок, содержащий домен TIR, участвующих в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов/универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла) и JAK2/STAT3 (цитоплазматическая тирозинкиназа, являющаяся промежуточным звеном в JAK-STAT сигнальном пути, и приводящяя к активации генов посредством транскрипции/сигнальный белок и активатор транскрипции), а также подавлением пути Nrf2-ARE/HO-1 (редокс-чувствительный транскрипционный фактор – антиоксидант-отвечающий элемент/член семейства белков теплового шока, идентифицированных как HSP32) [224].

Наибольший интерес исследователей вызывает изучение процесса повреждения печени через активацию макрофагов. В печени обнаруживаются две популяции макрофагов – клетки Купфера и макрофаги, произошедшие из моноцитов. Клетки Купфера представляют собой резидентные макрофаги печени и находятся в стенках синусоидов, составляя около 30% всех его клеток [297]. К основным функциям клеток Купфера относятся поддержание гомеостаза путем уничтожения патогенов и различных чужеродных веществ, участие в рециркуляции эритроцитов и апоптотических клеток, поддержание воспаления, а также передача сигнала между клетками иммунной системы [133, 155, 172, 280, 284, 288]. Исследования на лабораторных мышах показали, что

клетки Купфера имеют эмбриональное происхождение [125, 146, 259, 287]. Происхождение клеток Купфера было аналогичным как для крыс, так и для человека [231, 278, 279, 297]. Если происходит повреждение клеток Купфера, то они замещаются оставшимися клетками или циркулирующими в крови моноцитами [143, 144]. Так, при повреждении печени и высвобождении клетками Купфера воспалительных цитокинов моноциты могут рекрутироваться из крови в очаги воспаления и при необходимости дифференцироваться в макрофаги [124, 182, 188]. Кроме того, ранее было обнаружено, что макрофаги, располагающиеся в перипортальной зоне, обладают большей фагоцитарностью, чем макрофаги, находящиеся рядом с центральной веной [151, 269, 270].

Обе популяции макрофагов печени участвуют в процессах обнаружения и удаления патогенов через рецепторы опознавания паттерна или образ-распознающие рецепторы (PRRs). К группе этих рецепторов относятся Toll-подобные (TLR) и NOD-подобные (NLR) рецепторы. Взаимодействие с этими рецепторами приводит к высвобождению различных воспалительных цитокинов, которые, в свою очередь, индуцируют воспалительный процесс в печени [176].

При исследовании активности клеток Купфера было выявлено, что они поглощали больше пегилированных квантовых точек и наночастиц золота, чем другие клетки печени и макрофаги селезенки. Но в то же время не было обнаружено разницы в поглощении наночастиц кремнезема клетками Купфера и макрофагами селезенки [223]. Ngo W. с соавторами (2022) предполагают, что это связано с разным сродством популяций макрофагов к тем или иным микроэлементам. Существуют исследования, подтверждающие, что поступление аморфного диоксида кремния может способствовать активации клеток Купфера [297].

В настоящий момент в зависимости от поляризации принято разделять макрофаги на две популяции: М1 и М2. Первые участвуют в воспалительном процессе, вторые – в процессах репарации печени [209, 210, 211]. В то же время

Iba-1-позитивные клетки могут менять свою поляризацию с М1- в М2-поляризованные [293].

Изучали реакцию Iba-1- и CD68-позитивных клеток печени лабораторных крыс. Маркер Iba-1 чаще используется для идентификации микроглии в центральной нервной системе [123, 255, 256]. Последние экспериментальные данные свидетельствуют о том, что Iba-1 можно идентифицировать на макрофагах печени [238]. Ранее данный маркер использовали Дьячкова И. М. (2009) и Гордова В. С. (2014) для идентификации макрофагов в тимусе [23, 35, 37]. Макрофаги, экспрессирующие Iba-1, способны также экспрессировать CD68 [191]. Так, выявлено, что в печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в течение двух месяцев, происходит уменьшение медианы площади Iba-1-позитивных клеток. При этом медиана площади CD68-позитивных клеток входила в состав средних Iba-1-позитивных клеток при распределении их по размеру. В препаратах, обработанных иммунофлуоресцентным методом, также фиксировали макрофаги с коэкспрессией обоих маркеров, что в принципе соответствует результатам морфометрии макрофагов и имеющимся литературным данным [191, 194]. Кроме того, было заметно увеличение среднего количества иммунопозитивных клеток на микрофотографию. Можно предположить, что эти изменения связаны с привлечением моноцитов из циркулирующей крови.

Изменение средней площади Iba-1-позитивных клеток за счет увеличения клеток с малой и средней площадью также объясняется привлечением моноцитов в печень. При анализе графиков интенсивности иммунофлуоресценции Iba-1- и CD68-позитивных клеток печени крыс опытной группы замечено увеличение интенсивности люминесценции CD68 и уменьшение экспрессии Iba-1. Вероятно, это связано с тем, что некоторые макрофаги с коэкспрессией из-за развивающегося воспалительного процесса в печени в большей степени экспрессируют маркер CD68 на своей поверхности, перекрывающий флуоресценцию Iba-1.

Одновременно была изучена реакция CD68-позитивных клеток печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев. Обнаружено отличие в размерах CD68-позитивных клеток. Так, CD68-позитивные клетки печени крыс через девять месяцев от начала эксперимента имели большие размеры, чем эти же клетки через два месяца эксперимента. Предположительно данные различия отчасти связаны как с возрастными особенностями животных, так и с длительностью воздействия водорастворимого кремния. Например, в исследованиях макрофагов перитонеальной жидкости мышей различных возрастных групп было выявлено накопление липофусцина в цитоплазме клеток с возрастом и усиление окислительных процессов в организме животных, в которых фагоциты играют ключевую роль, способствуя иммуностарению [250]. В печени крыс опытной группы, получавших кремний в течение девяти месяцев, выявлено уменьшение площади CD68-позитивных клеток за счет увеличения клеток малой площади и уменьшения клеток средней и большой площади. Параллельно обнаружено изменение формы клеток: становились более округлыми. Наблюдаемые изменения CD68-позитивных клеток, в совокупности с предыдущими данными, подтверждают предположения об активация CD68-позитивных макрофагов, которые, в свою очередь, способны индуцировать воспалительный процесс.

Лебедева Е. И. (2023) обнаружила, что количество CD68-позитивных клеток увеличивается прямо пропорционально стадиям фиброза печени, вызванного тиоацетамидом, до момента трансформации его в цирроз. На более поздних сроках эксперимента разницы в количестве CD68-позитивных клеток между контрольной и опытной группами не было обнаружено [62].

Следовательно, увеличение количества Iba-1- и CD68-позитивных клеток в печени крыс опытной группы через два месяца эксперимента и выравнивание количества CD68-позитивных клеток в контрольной и опытной группах через девять месяцев носит адаптационный характер.

Изучение архитектоники ядер гепатоцитов печени имеет важнейшее диагностическое значение. Имеющиеся в настоящий момент исследования позволяют утверждать, что изменение их морфометрических характеристик выражается в прогностической ценности при изучении воздействия на ткань печени тех или иных патогенов. Одним из значимых возрастных изменений ядер клеток является увеличение их диаметра [3]. При сравнении размерных характеристик ядер гепатоцитов печени лабораторных крыс, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев, наблюдали подобные изменения. С возрастом идет увеличение количества полиплоидных гепатоцитов, и данный процесс, скорее, носит адаптивный характер, направленный на замещение потерянных и поврежденных клеток путем амитоза. Увеличение плоидности ядра, как правило, сопровождается увеличением размеров гепатоцитов. Кроме того, существенной разницы в объеме гепатоцитов, содержащих один или два ядра, с одинаковыми наборами хромосом, нет [241]. Экспериментально-морфологические исследования выявили, что появление полиплоидных гепатоцитов в печени нередко связано с переключением специфических функций печени в режим экономии вместо затрачивания энергии в процессе клеточного деления. Сравнение диплоидных и полиплоидных гепатоцитов выявило, что последние индуцируют гены, направленные против патогенов, повреждения ДНК и окислительного стресса, а также ингибируют гены, ответственные за апоптоз. Многие авторы не исключают наличие взаимосвязи между появлением полиплоидных гепатоцитов и защитным ответом на процесс накопления поврежденной ДНК в ядре. При патологических состояниях, которые сопровождаются потерей функции печени, она способна компенсировать ее путем увеличения геномов. Отсюда следует, что, чем быстрее в печени развивается полиплоидизация, тем более существенным является ее повреждение [178, 183, 241].

В печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, наблюдались уменьшение средней площади ядер в одно- и

двуядерных гепатоцитах, числа двуядерных гепатоцитов и увеличение средней площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов и их цитоплазмы. Увеличение площади поперечного сечения гепатоцитов и их цитоплазмы является одним из механизмов регенерации печени при повреждении. Данный способ необходим для быстрого восстановления ее массы [10]. Козлова М. А. (2022) описывает подобные изменения как начальные этапы адаптации к патогенному воздействию путем внутриклеточной регенерации, которая сопровождается гипертрофией гепатоцитов без их пролиферации, а уменьшение доли двуядерных гепатоцитов – снижением их регенеративных возможностей [49]. Nagy P. с соавторами (2001) также показали, что при токсическом воздействии на печень ее регенерация может происходить за счет гипертрофии клеток вследствие резкого подавления синтеза ДНК [247]. Однако по данным цитофотометрии оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов можно заметить увеличение их медиан в печени крыс опытной группы.

Через девять месяцев эксперимента с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л средняя площадь поперечного сечения одно- и двуядерных гепатоцитов и их ядер не изменялась между контрольной и опытной группами. При распределении площадей одноядерных гепатоцитов по методу сигмальных отклонений не было выявлено статистически значимых изменений. Среди двуядерных гепатоцитов появлялись клетки, имеющие большие площади, которых не было в контрольной группе. Учитывая отсутствие изменений в распределении ядер и данные корреляционного анализа (площадь гепатоцита / площадь ядра), можно также предположить о механизме клеточной регенерации печени за счет гипертрофии клеток. В то же время, выявленное увеличение оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов, не исключает активизацию процесса клеточной регенерации путем пролиферации.

Принимая во внимание данные морфометрии ядер гепатоцитов и показатели цитофотометрии оптической плотности ДНК можно предположить об увеличении доли полиплоидных гепатоцитов с хромосомным набором 4n и

8n в печени крыс опытной группы в сравнении с контрольной группой как через два, так и через девять месяцев эксперимента.

Помимо всего, в печени крыс опытной группы через девять месяцев эксперимента зафиксировано появление ядер гепатоцитов с площадью < 47,52 мкм$^2$ имеющих деформированную форму, что, вероятно, свидетельствует об их апоптозе [113]. Дополнительно в печени крыс опытной группы через девять месяцев от начала эксперимента наблюдалось увеличение оптической плотности РНК в ядрах и цитоплазме гепатоцитов. Ранее Бонашевская Т. И. (1977), изучая воздействие некоторых химических веществ на печень, обнаружила, что при повышении концентрации химических веществ, а также в отдельных экспериментах на минимальном уровне воздействия наблюдалось повышение содержания РНК и усиление активности окислительных ферментов, которую автор оценивала как раннюю фазу адаптации [8]. Основываясь на этом, можно предположить о формировании постепенной адаптации гепатоцитов печени лабораторных крыс на длительное поступление кремния с питьевой водой.

В препаратах, окрашенных с помощью DAPI для выявления ядер гепатоцитов, обнаруживались изменения, схожие с полученными при морфометрии ядер гепатоцитов печени, обработанных гематоксилином и эозином. Выявленные двумя различными методами аналогичные результаты лишний раз подтверждают, что это связано с действием кремния, поступающего с питьевой водой.

При изучении препаратов печени, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечено увеличение количества эозинофилов в области портальных зон печеночных долек печени крыс опытных групп через два и девять месяцев эксперимента. В печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев и получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л, среднее количество эозинофилов в области портальных зон в сравнении с данными контрольной группы возрастало в 1,38 и 3,29 раза соответственно.

Известно, что небольшое количество эозинофилов обнаруживается в печени в стабильном состоянии [126], а при патологических процессах, таких как вирусный гепатит и острое повреждение печени, их количество значительно возрастает [142, 170, 205]. Увеличение количества эозинофилов было описано у пациентов с печеночной недостаточностью, вызванной ацетаминофеном. В экспериментах на лабораторных мышах, которые получали ацетаминофен, четыреххлористый углерод или конканавалин А, было выявлено увеличение количества эозинофилов за счет привлечения их из циркулирующей крови. Данный процесс непосредственно связан с их взаимодействием с макрофагами. Так, ST2 (стимулирующий фактор роста, экспрессируемый геном 2, также известный как IL1RL1) экспрессируется на Т-хелперах 2-го типа, тучных клетках и эозинофилах. Эозинофилы продуцируют IL-4/IL-13 в ответ на воздействие IL-33, уровень которого также повышается при повреждении печени ацетаминофеном. Эксперименты *in vitro* показали, что IL-33, стимулируя высвобождение IL-4 эозинофилами, способствует выработке CCL24 макрофагами [170]. Последние, в свою очередь, участвуют в привлечении эозинофилов в печень.

Зайцева Н. В. с соавторами (2016) при внутрижелудочном введении диоксида кремния крысам-самцам в дозе 0,1; 1; 10 и 100 мг/кг массы тела в течение 30 дней и в составе корма в течение 62 дней обнаруживали выраженные клеточные инфильтрации области портальных зон, содержащие эозинофилы, макрофаги, лимфоциты и плазматические клетки [14].

Считалось, что эозинофилы являются цитотоксическими клетками, участвующими в аллергических реакциях, реагирующими на проникновение различных паразитов. Новые исследования Wang Y. с коллективом (2021) и Long X. с соавторами (2022) подтверждают гипотезу о смене этой парадигмы [169, 181]. Так, было обнаружено, что эозинофилы могут выполнять защитную функцию, в том числе при остром повреждении печени, модулируя местный иммунный ответ, а также участвовать в процессах регенерации печени.

Установлено, что тучные клетки, дегранулируя, высвобождают биоактивные вещества (гистамин, триптазу, химазу), воспалительные цитокины (TGF-β, TNF-α и IL-1β), липидные медиаторы (лейкотриен B4, лейкотриен D4, простагландин), участвующие в повреждении печени [220]. Одним из главных биоаминов тучных клеток является гистамин. Он участвует в регуляции разных физиологических процессов и обнаруживается во многих тканевых структурах [18, 60, 139, 185]. Гистамин синтезируется из аминокислоты гистидина с помощью L-гистидин-декарбоксилазы [8, 60, 147]. Действие гистамина опосредуется взаимодействием его с одноименными рецепторами и последующей активацией аденилатциклазы с образованием цАМФ [8, 60, 138]. В свою очередь, на поверхности тучных клеток отмечается высокая экспрессия H4-рецепторов. К функциям гистамина относится участие в регуляции энергетического обмена, метаболизме глюкозы и липидов, заживлении ран [60, 213]. Гистамин может выполнять и иммуномодулирующую функцию (участвовать в пролиферации клеток, увеличивать активность макрофагов, оказывать митогенный эффект на фибробласты) [99, 213]. Исследования Zhou K. с соавторами (2016) выявили непосредственную взаимосвязь между содержанием гистамина в печени и тяжестью течения фиброза печени [186]. Misto A. с соавторами (2019) обнаружили, что гистамин, выделяемый тучными клетками печени, участвует в контроле кетогенеза, вызванного голоданием [219].

Помимо тучных клеток источником гистамина могут быть тромбоциты, лейкоциты (нейтрофилы, моноциты, лимфоциты), хондроциты, гладкомышечные клетки сосудов, кератиноциты кожи, макрофаги и другие клетки [276, 285]. В метаболизме гистамина задействованы два фермента, которые также обнаруживаются и в печени: гистамин-N-метилтрансфераза и диаминоксидаза (гистаминаза). Известно, что гистамин-N-метилтрансфераза является внутриклеточным ферментом и помогает регулировать уровень гистамина путем разложения его в цитоплазме клеток до N-метилгистамина, а

диаминоксидаза – это внеклеточный фермент и он метаболизирует гистамин до имидазолуксусной кислоты [60].

Ранее исследователями было установлено, что у пациентов с циррозом печени и портальной гипертензией уменьшается экспрессия Н2-рецепторов на поверхности гепатоцитов, воротной вене, печеной артерии и вене [187]. Другими авторами было описано изменение люминесцентной морфологии печени у больных с хронической алкогольной болезнью и наркоманией. Выявлено, что у лиц с хронической алкогольной болезнью, статистически значимо увеличивается интенсивность люминесценции катехоловых аминов и серотонина в гепатоцитах печени в сравнении с гепатоцитами печени лиц, которые имели наркотическую зависимость. У первых, в том числе, практически отсутствовали люминесцирующие гранулярные клетки [21]. Отсюда не исключается участие гепатоцитов печени в метаболизме изучаемых биогенных аминов.

В результате собственных исследований было выявлено увеличение интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах печени лабораторных крыс опытных групп на обоих сроках эксперимента (два и девять месяцев). Установлено увеличение люминесценции гистамина в ЛГК печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев.

Кроме того, при измерении интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов обнаружено увеличение их в печени крыс опытной группы на обоих сроках эксперимента. Однако через девять месяцев от начала эксперимента интенсивность их люминесценции увеличивалась практически в 2 раза как в контрольной, так и в опытной группах. Подобные изменения связаны с возрастом животных [120]. Основным источником серотонина также выступают тучные клетки. Секреция тучными клетками серотонина и других медиаторов приводит к расширению сосудов, что улучшает проникновение тучных и других клеток к месту воспаления. Экспрессия транспортера обратного захвата серотонина обнаружена на тучных клетках, макрофагах и

В-лимфоцитах [286]. Макрофаги поглощают серотонин путем метаболизма его до 5-гидроксииндолуксусной кислоты, а также катехоловые амины [273]. GDF3 в активируемых инфламмасомой макрофагах влияет на уровень моноаминоксидазы А, участвующей в разрушении норадреналина [196]. Кроме того, ранее, при описании кластеров, уже было упомянуто участие этих биогенных аминов в регенерации печени [249]. Объединение данных, полученных при морфометрии гепатоцитов, цитоплазмы и ядер гепатоцитов, с показателями интенсивности люминесценции биогенных аминов в один кластер также подтверждает их участие в процессах регенерации печени.

Кроме участия серотонина в процессах регенерации не исключено также и его повреждающее действие. Так, данные Nocito A. с соавторами (2007) свидетельствовали, что в результате катаболизма серотонина под действием моноаминоксидазы повышается уровень активных форм кислорода и перекисей липидов. Авторы пришли к выводу, что серотонин способствовал прогрессированию стеатогепатита за счет окислительного стресса [258].

Цитокин IL-33, упомянутый ранее как один из компонентов системы активации эозинофилов печени, участвует также в процессах активации тучных клеток, способствуя увеличению количества дегранулирующих и продуцирующих хемокины клеток [193].

Считается, что степень метахромазии тучных клеток или степень связывания красителя с кислыми окончаниями гликозаминогликанов зависит от количества свободных кислых радикалов, сульфгидрильных групп и от силы связи комплекса мукополисахарид-белок (гепарин-белок) [67, 84]. Вместе с тем бытует мнение, что при развитии патологии любого генеза возможно замещение нормальной популяции тучных клеток на незрелые формы с другими цитофизиологическими признаками [54].

Можно предположить, что увеличение площади тучных клеток, в том числе за счет преобладания доли клеток с большой площадью и дегрануляцией, в печени крыс опытной группы, находившихся в эксперименте с поступлением

водорастворимого кремния в течение двух месяцев, связано с повышением их активности, тогда как через девять месяцев от начала эксперимента, несмотря на то, что площадь тучных клеток практически не изменялась в сравнении с контрольной, отмечался рост недегранулирующих клеток малой площади. Подобные изменения тучных клеток были выявлены в работе Гордовой В. С. (2014) при изучении воздействия водорастворимого кремния на тимус лабораторных крыс в течение девяти месяцев. Следовательно, проявляется системный характер воздействия кремния на популяцию тучных клеток всего организма [23].

Собственные исследования автора диссертации на лабораторных кроликах, получавших с питьевой водой в течение трех месяцев водорастворимый кремний в концентрации, превышавшей предельно допустимую, выявили более выраженные изменения (увеличение средней площади гепатоцитов и их ядер, среднего диаметра синусоидных капилляров; уменьшение количества двуядерных гепатоцитов; понижение оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов; увеличение интенсивности гистамина в ЛГК; лейкоцитарная инфильтрация портальных зон; появление участков фокальных некрозов гепатоцитов; разрастание соединительной ткани с образованием портального фиброза и соединительнотканных (порто-портальных) септ), чем у крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л [51]. Эти данные демонстрируют, что водорастворимый кремний способен попадать в кровоток и оказывать повреждающее действие на печень независимо от вида животного. При этом поступление более высоких доз кремния уже за три месяца приводит к развитию фиброза печени. Следовательно концентрация кремния, поступающего с водой, и длительность его воздействия также будут играть немаловажную роль.

Проведенный кластерный и факторный анализы позволили объединить между собой морфометрические параметры. Предполагаемый механизм взаимодействия некоторых клеток иммунной системы и их влияние на структурные компоненты печени представлены на Рисунке 37.

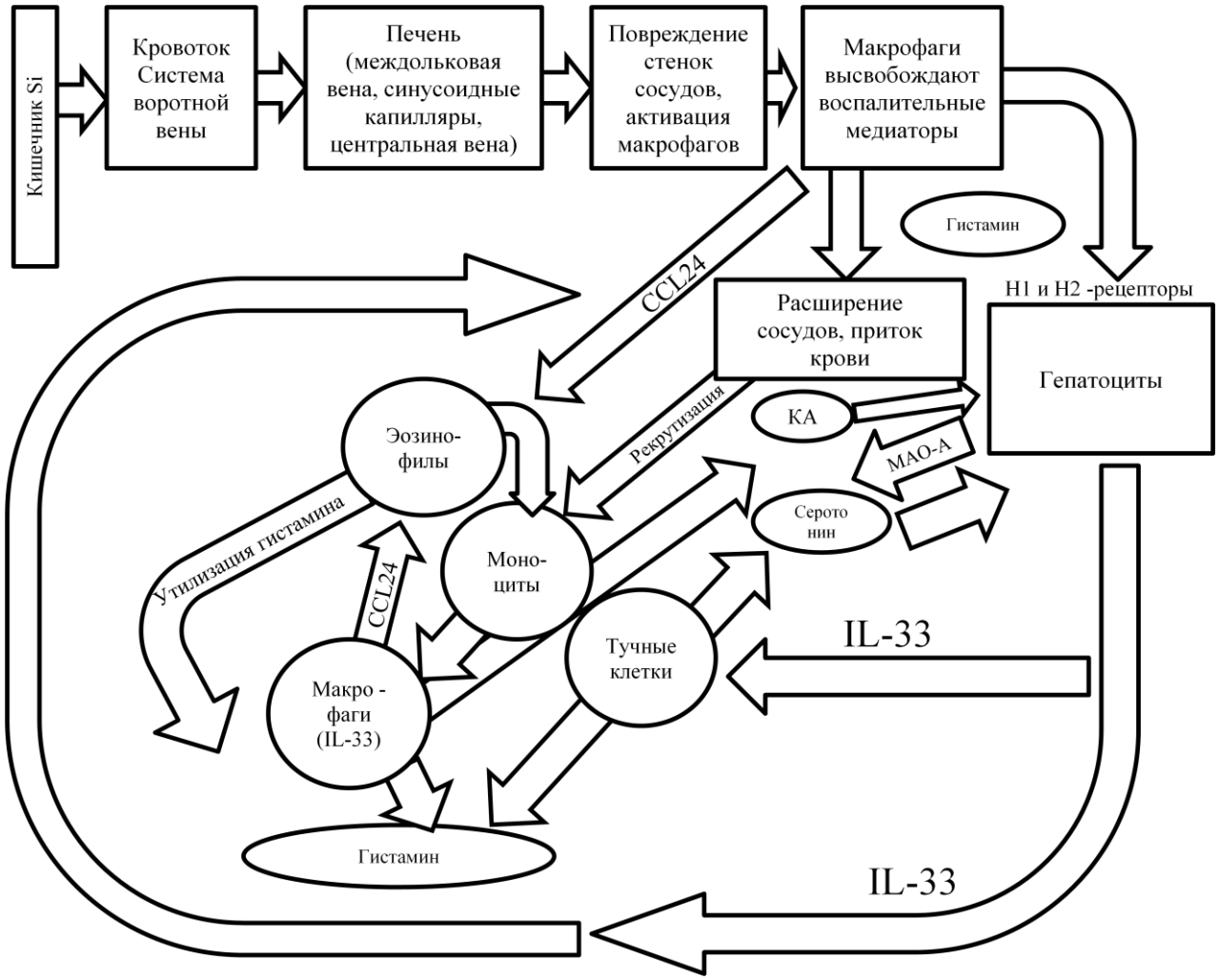



Рисунок 37 – Механизм взаимодействия некоторых клеток иммунной системы и их влияние на структурные компоненты печени

На обоих сроках эксперимента важными участниками процесса, развивающегося в печени воспаления, являются макрофаги, тучные клетки и эозинофилы. Однако через девять месяцев эксперимента на фоне воспалительного процесса наблюдаются признаки старения печени (увеличение площадей гепатоцитов, цитоплазмы, ядер гепатоцитов, уменьшение диаметра сосудов и другие), проявляющегося преобладанием серотонина как ведущего медиатора, который увеличивает свою люминесценцию в органе. Приведенные изменения подтверждаются кластеризацией и факторизацией данных.

Помимо изложенных выше механизмов действия водорастворимого кремния на печень, полученные данные позволяют предположить, что они способны влиять на состояние антиоксидантной системы клеток подобно наночастицам аморфного диоксида кремния.

Li J. с соавторами (2022) обнаружили, что внутривенное введение наночастиц аморфного диоксида кремния (0,6 мг/л) в течение десяти дней влияло на функционирование дыхательной цепи митохондрий, проявляющееся снижением уровня белков в I–V комплексах, в то же время отмечалось повышение их в АТФ-синтазе V-типа лизосом. Введение кремния в большей дозировке (6 мг/л) через зонд не вызывало явных изменений в митохондриях. Кроме того, авторы отметили, что в группе крыс, получавших внутривенные инъекции, изменился цикл трикарбоновых кислот, тогда как пероральное введение через зонд вызывало минимальные воздействия. Однако было установлено, что оба вида воздействия значительно влияли на антиоксидантную систему клетки. В том числе пероральное введение аморфного диоксида кремния приводило к повышению уровня серина, глицина, 6-фосфоглюконата, рибозо-5-фосфата, дигидрофолиевой кислоты, флавинадениндинуклеотида, никотинамидадениндинуклеотида, окисленного глутатиона и снижению НАДФН-оксидазы и соотношения восстановленный глутатион / окисленный глутатион (GSH / GSSG) [197].

Badawy M. M. с соавторами (2023) исследовали воздействие аморфного диоксида кремния на печень, почки и надпочечники крыс. С учетом того, что магний обладает антиоксидантной активностью и является кофактором ферментов, необходимых для биосинтеза антиоксиданта глутатиона, ответственного за поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза, изучили одновременное воздействие этих двух микроэлементов. Авторы обнаружили, что в группе крыс, одновременно получавших магний в дозе 50 мг/кг в сутки и аморфный диоксид кремния, растворенный в дистиллированной воде, в дозе 100 мг/кг в сутки через пероральный зонд в течение 90 дней, явно

выраженных изменений в гистологическом строении печени в сравнении с контрольной группой обнаружено не было. В то же время в группе, получавшей только аморфный диоксид кремния в дозе 100 мг/кг в сутки, наблюдались расширение синусоидных капилляров и вакуолизация гепатоцитов с различной степенью пикноза ядер [212].

Последнее описание имело схожесть с изменениями в печени крыс, подвергшихся воздействию водорастворимого кремния, представленного в результатах диссертационного исследования.

Ранее в работе Гордовой В. С. с соавторами (2021) были опубликованы данные о реакции надпочечников, щитовидной железы и поджелудочной железы на воздействие водорастворимого кремния (10 мг/л) и магния (30 мг/л), которые поступали с дистиллированной водой в течение 1,5 месяцев. Обнаружено изменение активности щитовидной железы по типу толерантной стратегии адаптации. Статистически значимых изменений в интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в клубочковой зоне надпочечников не было обнаружено. Однако в пучковой зоне отмечалось повышение интенсивности люминесценции данных биогенных аминов. В то же время в группе животных, получавших с питьевой водой только кремний, отмечались понижение активности щитовидной железы и протекание резистентной (стрессорной) стратегии адаптации в пучковом и корковом слоях надпочечников [24].

Badawy M. M. с соавторами (2023) было отмечено, что гистологическое строение надпочечников крыс, получавших оба микроэлемента с питьевой водой (кремний и магний), было «почти нормальным» [212]. Следовательно, поступающий с питьевой водой магний в предложенном авторами количестве не способен полностью предупреждать патогенное действие поступающего перорально кремния.

Проведенный ранее Толмачевой Н. В. (2011) анализ питьевых вод в зонах оптимума и бедствия выявил дисбаланс между некоторыми микроэлементами,

в том числе кремнием и магнием [116]. Анализ воды, представленный в настоящей работе (Приложение А), подтвердил сохраняющуюся проблему, особенно в местах с отсутствием централизованного водоснабжения. При этом выявленная высокая заболеваемость сердечно-сосудистыми заболеваниями в муниципальных округах, относящихся к «кремниевым», не исключает участие кремния в процессах атерогенеза [80, 103].

Основываясь на этих данных, можно утверждать, что действие кремния, поступающего с питьевой водой, носит системный характер, негативное действие которого усиливается при дисбалансе микроэлементов, в том числе при низком содержании магния в питьевой воде, что характерно для «кремниевых» биогеохимических провинций. Сохраняющееся отсутствие массового централизованного водоснабжения увеличивает риск развития заболеваний, вызванных поступающим с питьевой водой кремнием. Наряду с повышенным использованием аморфного диоксида кремния в промышленных производствах лица, проживающие в данных зонах, оказываются еще более подверженными его воздействию. Не следует забывать о том, что изменения, вызванные водорастворимыми формами или наночастицами кремния, наблюдаемые в печени, идентичны.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что выбранная доза кремния, поступающая с питьевой водой, через два месяца эксперимента приводит к развитию воспалительного процесса в печени, которое проявляется изменениями в микроскопическом строении печени (увеличением площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов, поперечного сечения цитоплазмы одноядерных гепатоцитов и уменьшением ядерно-цитоплазматического отношения), увеличением количества тучных клеток с преобладанием среди них метахроматичных дегранулирующих клеток, увеличением количества Iba-1- и CD68-позитивных макрофагов с уменьшением площади первых, а также увеличением количества эозинофилов в области портальных зон. Помимо этого, отмечалось увеличение интенсивности люминесценции гистамина в структурах печени, в особенности в люминесцирующих гранулярных клетках.

Через девять месяцев эксперимента с поступлением водорастворимого кремния в концентрации 20 мг/л с питьевой водой площади гепатоцитов, цитоплазмы гепатоцитов и их ядер были сопоставимы в контрольной и опытной группах, распределение их методом сигмальных отклонений не выявляло статистически значимых различий. В печени крыс опытной группы наблюдались полиморфно-клеточная инфильтрация портальных зон, отдельные скопления клеток воспалительного инфильтрата, которые не обнаруживались в печени крыс контрольной группы. Кроме того, зафиксировано увеличение оптической плотности РНК в ядрах, РНК в цитоплазме гепатоцитов печени крыс опытной группы, а также увеличение интенсивности люминесценции серотонина в оболочках центральных вен, гепатоцитах, люминесцирующих гранулярных клетках и их микроокружении на фоне статистически значимого снижения интенсивности люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках. Количество CD68-позитивных макрофагов также

выравнивалось, однако медиана их площади была меньше в группе, получавшей длительно питьевую воду с кремнием в концентрации, соответствующей предельно допустимой. Среди тучных клеток преобладали ортохромные дегранулирующие клетки, и их среднее количество также уменьшалось. В то же время сохранялись расширенные синусоидные капилляры, а также увеличивались площади поперечных сечений центральных вен, междольковых сосудов и желчных протоков. Эти данные позволяют заключить, что при длительном поступлении кремния с питьевой водой в печени происходит активация механизмов репаративной регенерации, на фоне сохраняющихся признаков воспаления.

Представленные в диссертации данные свидетельствуют о том, что водорастворимый кремний, поступающий с питьевой водой в предельно допустимой концентрации, способен проникать в печень по системе воротной вены и оказывать как прямое повреждающее воздействие, так и опосредованное, через клетки иммунной системы с развитием асептического воспалительного процесса.

## ВЫВОДЫ

1. В печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л, через два месяца эксперимента наблюдается увеличение средней площади поперченного сечения одноядерных гепатоцитов на 16%, уменьшение средней площади поперченного сечения ядер двуядерных гепатоцитов на 29%, уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения в одно- и двуядерных гепатоцитах на 20 и 21% соответственно; через девять месяцев – возрастают площади поперечного сечения центральных вен на 88%, междольковых сосудов (вен – на 70%, артерий – на 147%) и желчного протока – на 106%. На обоих

сроках эксперимента отмечается увеличение диаметра синусоидных капилляров (через два месяца – на 34%, через девять месяцев – на 39%).

2. Воздействие водорастворимого кремния приводит: к повышению оптической плотности ДНК на 70 и 13%, РНК в цитоплазме гепатоцитов – на 29 и 33% через два и девять месяцев эксперимента соответственно; РНК в ядрах гепатоцитов – на 54% через девять месяцев эксперимента.

3. Количество эозинофилов в области портальных зон печени увеличивается на 24% через два месяца и более чем в три раза (на 217%) через девять месяцев; площадь тучных клеток увеличивается на 30 и 19% через два и девять месяцев соответственно; площадь Iba-1-позитивных макрофагов уменьшается на 13%, количество Iba-1- и CD68-позитивных клеток увеличивается на 29 и 32% соответственно через два месяца; площадь CD68-позитивных макрофагов уменьшается на 48% через девять месяцев эксперимента с поступлением кремния.

4. При ежедневном пероральном поступлении кремния с питьевой водой интенсивность люминесценции гистамина увеличивается через два месяца в гепатоцитах на 23%, в ЛГК – на 8% и в их микроокружении – на 22%, а через девять месяцев показатель практически не отличается в контрольной и опытной группах. Интенсивность люминесценции серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах, оболочках центральных вен, люминесцирующих гранулярных клетках и в их микроокружении увеличивается на обоих сроках.

5. В печени крыс, получавших водорастворимый кремний, кластерный анализ установил связи между макрофагами и люминесцирующими гистаминсодержащими структурами печени через два месяца и с люминесцирующими структурами, содержащими катехоловые амины и серотонин, через девять месяцев (Евклидово расстояние $< 0,05$); факторный анализ обнаружил второй фактор, отсутствующий в контрольных группах и объединяющий морфометрические параметры сосудов печени, тучных клеток и содержащие гистамин клетки через два месяца, а также площадь центральной

вены, междольковых сосудов и желчного протока – через девять месяцев ($r > 0,7$).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Диссертационная работа проведена на лабораторных крысах и относится к доклиническим исследованиям. Полученные в ходе исследования изменения в микроморфологии, количественной характеристике клеток иммунной системы (эозинофилов, тучных клеток, CD68-позитивных клеток), биоаминном статусе печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в предельно допустимой концентрации (20 мг/л) в течение двух и девяти месяцев, могут быть приняты во внимание при определении безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, содержащих соединения кремния.

2. Данные об изменении гистоструктуры печени в ответ на поступление кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух и девяти месяцев необходимо учитывать при ведении пациентов, длительно проживающих на территориях с высоким содержанием кремния в питьевой воде, которые встречаются в Свердловской, Тюменской, Кировской, Томской областях, Ямало-Ненецком автономном округе, Приморском крае, Чувашской Республике, а также в других регионах.

3. Результаты диссертационной работы могут послужить основой для новых исследований с целью разработки методов профилактики и поиска способов коррекции состояний, вызываемых поступлением кремния с питьевой водой.

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспартатаминотрансфераза

ГЕП – гепатоцит

ГЕП ГСТ К – интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах печени крыс контрольной группы

ГЕП ГСТ О – интенсивность люминесценции гистамина в гепатоцитах печени крыс опытной группы

ГЕП КА К – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в гепатоцитах печени крыс контрольной группы

ГЕП КА О – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в гепатоцитах печени крыс опытной группы

ГЕП СТ К – интенсивность люминесценции серотонина в гепатоцитах печени крыс контрольной группы

ГЕП СТ О – интенсивность люминесценции серотонина в гепатоцитах печени крыс опытной группы

Д-Р СИН КАП – диаметр синусоидного капилляра

КА – катехоловые амины

ЛГК – люминесцирующие гранулярные клетки

ЛГК ГСТ К – интенсивность люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс контрольной группы

ЛГК ГСТ О – интенсивность люминесценции гистамина в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс опытной группы

ЛГК КА К – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс контрольной группы

ЛГК КА О – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс опытной группы

ЛГК СТ К – интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс контрольной группы

ЛГК СТ О – интенсивность люминесценции серотонина в люминесцирующих гранулярных клетках печени крыс опытной группы

МДА – междольковая артерия

МДВ – междольковая вена

МДЖП – междольковый желчный проток

МО ЛГК ГСТ К – интенсивность люминесценции гистамина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс контрольной группы

МО ЛГК ГСТ О – интенсивность люминесценции гистамина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс опытной группы

МО ЛГК КА К – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс контрольной группы

МО ЛГК КА О – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс опытной группы

МО ЛГК СТ К – интенсивность люминесценции серотонина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс контрольной группы

МО ЛГК СТ О – интенсивность люминесценции серотонина в микроокружении люминесцирующих гранулярных клеток печени крыс опытной группы

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ППС – площадь поперечного сечения

СТ – серотонин

ТК – тучные клетки

ЦВ – центральная вена печеночной дольки печени

ЦВ ГСТ К – интенсивность люминесценции гистамина в оболочках центральных вен печени крыс контрольной группы

ЦВ ГСТ О – интенсивность люминесценции гистамина в оболочках центральных вен печени крыс опытной группы

ЦВ СТ К – интенсивность люминесценции серотонина в оболочках центральных вен печени крыс контрольной группы

ЦВ СТ О – интенсивность люминесценции серотонина в оболочках центральных вен печени крыс опытной группы

ЦВ КА К – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в оболочках центральных вен печени крыс контрольной группы

ЦВ КА О – интенсивность люминесценции катехоловых аминов в оболочках центральных вен печени крыс опытной группы

ЦПЛ ГЕП – цитоплазма гепатоцита

ФМЭЛ – насадка фотометрическая люминесцентная

ЭЗФ – эозинофилы

ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение

CD – кластер дифференциации

5-HT – серотониновые рецепторы

CXCL8 – хемокин или интерлейкин-8

DAPI – 4’,6-диамидино-2-фенилиндол

EGF – эпидермальный фактор роста

GDF3 – фактор дифференцировки роста-3

HGF – фактор роста гепатоцитов

HO-1 – член семейства белков теплового шока (HSP), идентифицированных как HSP32

Iba-1 – кальций-связывающий пептид

IL – интерлейкин

JAK2 – цитоплазматическая тирозинкиназа, являющаяся промежуточным звеном в JAK-STAT сигнальном пути и приводящая к активации генов посредством транскрипции

MyD88 – цитозольный адаптерный белок, содержащий домен TIR, участвующих в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов

NF-κB – универсальный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла

NLR – NOD-подобные рецепторы

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор

PDGF – фактор роста тромбоцитов

TGF – трансформирующий фактор роста

TLR – толл-подобный рецептор

TNF – фактор некроза опухоли

S – площадь фигуры

STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции

ST2 – стимулирующий фактор роста, экспрессируемый геном 2, также известный как IL1RL1

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрахимова, Й. Р. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (часть 1) : учебно-методическое пособие / Й. Р. Абдрахимова, Ф. А. Абдрахимов. – Казань : Альянс, 2019. – 25 с.

2. Абдрахимова, Й. Р. Биоимиджинг клеток: анализ флуоресцентных изображений митохондрий с помощью ImageJ (часть 2) : учебно-методическое пособие / Й. Р. Абдрахимова, Ф. А. Абдрахимов. – Казань : Альянс, 2019. – 26 с.

3. Андреев, В. П. Клиническая морфология печени: ядерный аппарат гепатоцитов / В. П. Андреев, В. М. Цыркунов, Р. И. Кравчук // Гепатология и гастроэнтерология. – 2020. – № 2. – С. 126–142.

4. Арешидзе, Д. А. Механизмы поддержания и изменений формы и размеров клеточного ядра (обзор) / Д. А. Арешидзе // Морфологические ведомости. – 2022. – Т. 30, № 3. – С. 73–80.

5. Артишевский, А. А. Гистология с техникой гистологических исследований / А. А. Артишевский, А. С. Леонтюк, Б. А. Слука. – Мн. : Вышэйш. шк., 1999. – 236 с.

6. Бережная, Н. М. Тучные клетки и гистамин: физиологическая роль / Н. М. Бережная, Р. И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2003. – № 3. – С. 29–38.

7. Блинкова, Н. Б. 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.

8. Бонашевская, Т. И. Морфологическая характеристика процессов адаптации печени к воздействию некоторых химических веществ / Т. И. Бонашевская // Гигиена и санитария. – 1977. – № 4. – С. 47–52.

9. Бонь, Е. И. Характеристика медиаторов и модуляторов, их биологическая роль в функционировании нервной системы / Е. И. Бонь //

Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2021. – № 1(122). – С. 6–14.

10. Бродский, В. Я. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка / В. Я. Бродский, И. В. Урываева. – М. : Наука, 1981. – 259 с.

11. Быков, В. Л. Развитие и гетерогенность тучных клеток / В.Л. Быков // Морфология. – 2000. – Т. 117, № 2. – С. 86–92.

12. Взаимодействие тканевых макрофагов и тучных клеток как начало органного ремоделирования в рамках хронической токсичности наночастиц кремнезема / Г. Ю. Юкина, С. Г. Журавский, А. А. Паневин [и др.] // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 2. – С. 70–79.

13. Влияние кремнийсодержащей воды «Ардви» на регенерацию мягких тканей и долгосрочную оставленную мышечную болезненность / О. А. Толмачев, В. О. Толмачев, С. Л. Тихонов [и др.] // Человек. Спорт. Медицина. – 2017. – № 6 (17). – С. 73–84.

14. Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию внутренних органов у крыс при пероральном введении / Н. В. Зайцева, М. А. Землянова, В. Н. Звездин [и др.] // Анализ риска здоровью. – 2016. – № 4. – С. 80–94.

15. Влияние наночастиц диоксида кремния на морфологию печени крысы при парентеральном введении / Г. Ю. Юкина, Е. Г. Сухорукова, И. В. Половников, Е. А. Крыжановская // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2021. – Т. 10, № 4. – С. 85–88.

16. Воронов, Л. Н. Изменчивость как фактор определения степени пластичности морфоэкологической адаптаций у птиц / Л. Н. Воронов, Н. П. Воронов // Русский орнитологический журнал. – 2023. – Т. 32, № 2266. – 290–297.

17. Выявление популяции клеток Купфера в печени крысы с использованием моноклональных и поликлональных антител к микроглиальному маркеру Iba-1 / И. А. Никитина, В. А. Разенкова, О. В. Кирик, Д. Э. Коржевский // Медицинский академический журнал. – 2023. – Т. 23, № 1. – С. 85–94.

18. Гистаминовые рецепторы (молекулярно-биологические и фармакологические аспекты) : монография / А. А. Спасов, М. В. Черников, П. М. Васильев, В. А. Анисимова. – Волгоград : Издательство ВолгГМУ, 2007. – 152 с.

19. Гистаминсодержащие клетки лимфоидных органов лабораторных грызунов в эксперименте / В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, А. И. Коршунова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – № 3. – С. 107–115.

20. Гистаминсодержащие структуры печени крыс при воздействии соединений кремния на различных сроках эксперимента / Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева [и др.] // Наука и инновации - 2020 : материалы Пятнадцатой Международной научной школы, Йошкар-Ола, 15–22 августа 2020 года. – Йошкар-Ола : Поволжский государственный технологический университет, 2020. – С. 108–111.

21. Голубцова, Н. Н. Люминесцентно-морфологические особенности печени человека в норме и при патологии / Н. Н. Голубцова, Е. Н. Игнатьева, К. В. Нестерин // Здравоохранение Чувашии. – 2012. – № 2. – С. 38–43.

22. Гордова, В. С. Основы биосилификации: (обзор литературы) / В. С. Гордова, С. П. Сапожников, В. Е. Сергеева [и др.] // Вестник Чувашского университета. Естественные и технические науки. – 2013. – № 3. – С. 401–409.

23. Гордова, В. С. Структурно-функциональное состояние лимфоидных органов лабораторных крыс при длительном поступлении соединения кремния с питьевой водой: автореф. дис. … канд. мед. наук : 03.03.04 / Гордова Валентина Сергеевна. – Чебоксары, 2014. – 19 с.

24. Гордова, В. С. Морфологическая адаптация внутренних органов к поступлению в организм водорастворимого соединения кремния : монография / В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, С. П. Сапожников. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2021. – 208 с.

25. ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» [Электрон. ресурс]. – URL: https://docs.cntd.ru/document/1200127789 (дата обращения: 13.02.2024).

26. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [Электрон. ресурс]. – URL: https://docs.cntd.ru/document/1200115791 (дата обращения: 13.02.2024).

27. Григорьев, И. П. Современные технологии визуализации тучных клеток для биологии и медицины (обзор) / И. П. Григорьев, Д. Э. Коржевский // Современные технологии в медицине. – 2021. – Т. 13, № 4. – С. 93–109.

28. Григорьева, Е. А. Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературным данными) / Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева // Acta Medica Eurasica. – 2022. – № 4. – С. 108–120.

29. Григорьева, Е. А. Морфологические особенности печени при воздействии водорастворимого соединения кремния / Е. А. Григорьева // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16, № 4. – С. 71–72.

30. Григорьева, Е. А. Морфологическая характеристика структур печени при поступлении кремния с питьевой водой в различные сроки эксперимента / Е. А. Григорьева, А. И. Коршунова // Актуальные проблемы биомедицины - 2020 : сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием, Санкт-Петербург, 26–27 марта 2020 года. – СПб : Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, 2020. – С. 368–369.

31. Григорьева, Е. А. Реакция тучных клеток печени крыс на длительное поступление водорастворимого соединения кремния / Е. А. Григорьева // XII Международная (XXI Всероссийская) Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых : сборник тезисов, Москва, 16 марта 2017 года. – М. : Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, 2017. – С. 147.

32. Гунин, А. Г. Гистология в схемах и таблицах : учебное пособие для студентов медицинских вузов / А. Г. Гунин. – М. : Практическая медицина, 2019. – 288 с.

33. Джоши, Д. Наглядная гепатология : учебное пособие / Д. Джоши, Д. Кин, Э. Брин. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 162 с.

34. Дубровская, Л. И. Компьютерная обработка естественнонаучных данных методами многомерной прикладной статистики : учебное пособие / Л. И. Дубровская, Г. Б. Князев. – Томск : ТМЛ-Пресс, 2011. – 120 с.

35. Дьячкова, И. М. Изменения IBA-1 позитивных клеток тимуса при воздействии кремния и кальция / И. М. Дьячкова // Вопросы клинической и экспериментальной медицины: материалы региональной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения проф. Амосовой В. В. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2009. – С. 190–192.

36. Дьячкова, И. М. Структурно-функциональное состояние тимуса лабораторных крыс, употреблявших питьевую воду с добавлением соединений кальция и кремния / И. М. Дьячкова, В. Е. Сергеева, С. П. Сапожников // Здравоохранение Чувашии. – 2011. – № 3. – С. 48–52.

37. Дьячкова, И. М. Структурно-функциональное состояние тимуса лабораторных крыс, употребляющих питьевую воду с добавлением соединений кальция и кремния : автореф. дис. … канд. биол. наук : 03.03.04, 03.03.01 / Дьячкова Ираида Михайловна. – Чебоксары, 2011. – 20 с.

38. Ельчанинов, А. В. Макрофаги / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2023. – 208 с.

39. Ельчанинов, А. В. Регенерация печени млекопитающих : Межклеточные взаимодействия / А. В. Ельчанинов, Т. Х. Фатхудинов. – М. : Наука, 2020. – 126 с.

40. Заболеваемость мочекаменной болезнью в Российской Федерации (2005–2016 годы) / О. И. Аполихин, А. В. Сивков, В. А. Комарова [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2018. – № 4. – С. 4–14.

41. Зиматкин, С. М. Гистология, цитология и эмбриология: краткий курс : учебное пособие / С. М. Зиматкин. — Мн. : Вышэйш. шк., 2020. — 304 с.

42. Зиматкин, С. М. Сравнительная анатомия печени и желчевыводящих путей человека и крысы / С. М. Зиматкин // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2016. – Т 15, № 3. – С. 18–23.

43. Изменения протеомных профилей микросом печени крыс под действием наночастиц диоксида кремния / О. Н. Тананова, Е. А. Арианова, И. В. Гмошинский [и др.] // Биомедицинская химия. – 2015. – Т. 61, № 1. – С. 92–98.

44. Ильина, Л. Ю. Мегакариоциты селезёнки при экспериментальном амилоидозе и воздействии красного вина / Л. Ю. Ильина, В. А. Козлов, С. П. Сапожников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 11. – С. 639–642.

45. Информационный бюллетень № 23 «Оценка влияния факторов среды обитания на здоровье населения Чувашской Республики» [Электрон. ресурс] – URL: https://21.rospotrebnadzor.ru/content/679/62718/ (дата обращения: 13.02.2024).

46. К вопросу о поведении кремния в природе и его биологической роли / В. В. Вапиров, В. М. Феоктистов, А. А. Венскович, Н. В. Вапирова // Ученые записки Петрозаводского государственного университета. – 2017. – № 2 (163). – С. 95–102.

47. Казакова, И. А. Механизмы влияния макрофагов на репаративную регенерацию : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.03.01 / Казакова Ирина Александровна. – Екатеринбург, 2014. – 25 с.

48. Козлов, В. А. Тучноклеточная популяция почки и почечной капсулы / В. А. Козлов, О. С. Бусова. – М. : Щербинская типография, 2009. – 104 с.

49. Козлова, М. А. Влияние светового режима и хронической алкогольной интоксикации на морфофункциональное состояние печени и структуру её циркадных ритмов в эксперименте : автореф. дис. … канд. биол. наук : 1.5.22. / Козлова Марина Александровна. – СПб., 2022. – 22 с.

50. Колесников, М. П. Формы кремния в растениях / Успехи биологической химии. – 2001. – Т. 41. – С. 301–332.

51. Комплексная оценка морфологических изменений в печени кроликов при воздействии водорастворимого кремния в течение трех месяцев / Е. А. Григорьева, В. С. Дедикина, Р. Д. Михейкин [и др.] // Acta medica Eurasica. – 2023. – № 3. – С. 84–93.

52. Компьютерные лабораторные работы по физическим методам исследования структуры веществ : учебное пособие / О. Н. Каныгина, А. А. Юдин ; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ОГУ, 2021 – 118 с.

53. Кондашевская, М. В. Гепарин тучных клеток – новые сведения о старом компоненте (обзор литературы) / М. В. Кондашевская // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2021. – Т 76, № 2. – С. 149–158. – doi: https://doi.org/10.15690/vramn.762.

54. Кондашевская, М. В. Тучные клетки и гепарин - ключевые звенья в адаптивных и патологических процессах / М. В. Кондашевская // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2010. – № 6. – С. 49–54.

55. Кондашевская, М. В. Экосистема тучных клеток – ключевой полифункциональный компонент организма животных и человека / М. В. Кондашевская. – М. : Группа МДВ, 2019. – С. 92.

56. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.

57. Краткий курс гистологической техники : учебно-методическое пособие / М. О. Мавликеев, С. С. Архипова, О. Н. Чернова [и др.]. – Казань : Казан. ун-т, 2020. – 107 с.

58. Кремний, его биологическое действие при энтеральном поступлении в организм и гигиеническое нормирование в питьевой воде. Обзор литературы / Ю. А. Рахманин, Н. А. Егорова, Г. Н. Красовский [и др.] // Гигиена и санитария. – 2017. – Т. 96, № 5. – С. 492–498.

59. Крохина, Е. М. Симпатический (адренергический) компонент эффективной иннервации сердечной мышцы / Е. М. Крохина, П. Н. Александров // Кардиология. – 1969. – Т. 9, № 3. – С. 97–102.

60. Кучер, А. Н. Гены гистаминового метаболического пути и многофакторные заболевания человека / А. Н. Кучер, Н. А. Черевко // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 1. – С. 15–32.

61. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – Киев : Вища школа, 1983. – 383 с.

62. Лебедева, Е. И. Изменение количества и соотношения CD68+/CD206+ клеток в печени крыс на различных стадиях фиброза индуцированного тиоацетамидом / Е. И. Лебедева // Клеточные технологии в экспериментальной медицине : сборник научных трудов по материалам II Международной научно-практической конференции, Курск, 30 сентября 2022 года. – Курск : Курский государственный медицинский университет, 2022. – С. 17–20.

63. Луппа, Х. Основы гистохимии / Х. Луппа – М. : Мир, 1980. – 343 с.

64. Макарова, М. А. Основные гепатологические синдромы в практике врача-интерниста / М. А. Макарова, И. А. Баранова // Consilium Medicum. – 2017. – № 8. – С. 69–74.

65. Медик, В. А. Статистика в медицине и биологии : руководство в 2-х томах. – Т. 1: Теоретическая статистика / В. А. Медик, М. С. Токмачёв, Б. Б. Фишман. – М. : Медицина, 2000. – 412 с.

66. Медицинская статистика : учебное пособие для студентов факультета среднего профессионального образования / Е. Е. Лобанова, А. В. Кочубей, Э. С. Антипенко [и др.]. – М.: МГМСУ, 2015. – 128 с.

67. Методы визуализации тучных клеток (обзор литературы) / Н. Ю. Тимофеева, Н. В. Бубнова, И. С. Стоменская [и др.] // Acta medica Eurasica. – 2023. – № 1. – С. 160–170.

68. Меркулов, Г. А. Курс патологогистологической техники / Г. А. Меркулов. – 5-е изд., испр. и доп. – Ленинград : Медицина. Ленингр. отд-ние, 1969. – 423 с.

69. Микроглия и предполагаемые макрофаги субфорникального органа: структурно-функциональные особенности / В. В. Гусельникова, В. А. Разенкова, Д. А. Суфиева, Д. Э. Коржевский // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2022. – № 2. – С. 54–61.

70. Моноаминергическая регуляция иммунитета. Часть I / А. А. Терентьев, А. Э. Лычкова, А. Н. Казимирский, А. М. Пузиков // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – № 3. – С. 32–39.

71. Морфологические изменения интерстиция лёгких крыс после парентерального введения наночастиц диоксида кремния / С. Г. Журавский, Г. Ю. Юкина, Н. М. Блюм, В. В. Томсон // Трансляционная медицина. – 2016. – Т. 3, № 4. – С. 66–71.

72. Морфология печени при механической желтухе / М. Д. Кашаева, А. В. Прошин, А. Н. Афанасьев [и др.] // Вестник Новгородского государственного университета им. Ярослава Мудрого. – 2018. – № 6 (112). – С. 8–11.

73. Морфометрический анализ популяции тучных клеток / Д. П. Линднер, И. А. Поберин, М. Я. Розкин [и др.] // Архив патологии. – 1980. – № 6. – С. 60–64.

74. Морфофункциональная адаптация структур тимуса крыс на поступление кремния с питьевой водой / В. С. Гордова, И. М. Дьячкова, В. Е. Сергеева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158, № 12. – С. 786–790.

75. Неалкогольная жировая болезнь печени у взрослых: клиника, диагностика, лечение. Рекомендации для терапевтов, третья версия / Л. Б.

Лазебник, Е. В. Голованова, С. В. Туркина [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2021. – Т. 185, № 1. – С. 4–52.

76. Нейромедиаторное обеспечение лимфоидных и нелимфоидных органов в условиях экспериментальной нейромодуляции / Т. Л. Смирнова, С. П. Сапожников, В. Е. Сергеева, И. М. Дьячкова // Аллергология и иммунология. – 2009. – Т. 10, № 1 – С. 32–33.

77. Никитина, Л. П. Биохимия печени в норме и при патологии : учебное пособие для преподавателей и студентов медицинских вузов, врачей, интернов, клинических ординаторов / Л. П. Никитина, Н. В. Соловьева, П. Б. Цыдендамбаев. – Чита : Читинская государственная медицинская академия, 2004. – 52 с.

78. Нейроиммуномодулирующие свойства хорионического гонадотропина : учебное пособие / Л. Р. Ялалетдинова, В. С. Гордова, С. А. Ястребова, В. Е. Сергеева. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2016. – 148 с.

79. Некоторые аспекты влияния серотонина на морфофункциональное состояние печени и процессы её регенерации / В. Ю. Шур, М. А. Самотруева, М. В. Мажитова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 432.

80. О гигиеническом нормировании соединений кремния в питьевой воде (обзор литературы) / Ю. А. Рахманин, Н. А. Егорова, Р. И. Михайлова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2021. – Т. 100, № 10. – С. 1077–1083. – doi: https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1077-1083.

81. О государственном докладе «О состоянии здоровья населения Чувашской Республики в 2022 году» постановление Кабинета Министров Чувашской Республики от 12.07.2023 № 462 [Электрон. ресурс] – URL: http://publication.pravo.gov.ru/document/2100202307140002 (дата обращения: 13.02.2024).

82. Основы гепатологии / П. О. Богомолов, А. В. Борсуков, А. О. Буеверов [и др.]. – М. : ИД «АБВ-пресс», 2022. – 408 с.

83. Особенности реакции макрофагов печени на действие водорастворимого соединения кремния в эксперименте / В. С. Гордова, Е. А. Григорьева, В. Е. Сергеева, А. Т. Смородченко // Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19, № S. – С. 30.

84. Пирс, Э. Гистохимия: теоретическая и прикладная. – М. : Изд-во иностр. лит., 1962. – 962 с.

85. Поляризация макрофагов: механизмы, маркеры и факторы индукции / А. А. Федоров, Н. А. Ермак, Т. С. Геращенко [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2022. – Т. 21, № 4. – С. 124–136.

86. Реакция CD68-позитивных клеток печени и селезенки крыс на поступление кремния с питьевой водой / Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, А. Т. Смородченко // Acta Medica Eurasica. – 2021. – № 2. – С. 34–43.

87. Романова, Л. П. Регенерация печени у плодов крыс после механической травмы : автореф. дис. … канд. биол. наук: 03.00.25 / Романова Любовь Петровна. – Чебоксары, 2006. – 24 с.

88. Ромейс, Б. Микроскопическая техника. – М. : Изд-во иностр. лит., 1953. – 719 с.

89. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения : утвержден Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 26.09.2001 : введен 01.01.2002 [Электрон. ресурс] – URL: https://docs.cntd.ru/document/901798042 (дата обращения: 17.02.2024).

90. СанПиН 2.1.4.1116-02. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества : утвержден Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации

19.03.2002 : введен 01.07.2002 [Электрон. ресурс] – URL: https://docs.cntd.ru/document/901816045?section=text (дата обращения: 17.02.2024).

91. СанПиН 2.1.3684-21 Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий (с изменениями и дополнениями) : утвержден Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.01.2021 [Электрон. ресурс] – URL: https://docs.cntd.ru/document/573536177 (дата обращения: 17.02.2024).

92. СанПиН 1.2.3685-21 Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания : утвержден Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.01.2021 [Электрон. ресурс] – URL: https://docs.cntd.ru/document/573500115?marker=6560IO (дата обращения: 17.02.2024).

93. Сапожников, С. П. Влияние эколого-биохимических факторов среды обитания на функциональное состояние и здоровье населения Чувашии : автореф. дис. … д-ра мед. наук : 03.00.13, 14.00.07 / Сапожников Сергей Павлович. – М., 2001. – 32 с.

94. Сапожников, С. П. Роль соединений кремния в развитии аутоиммунных процессов / С. П. Сапожников, В. С. Гордова // Микроэлементы в медицине. – 2013. – № 3. – С. 3–13.

95. Сапожников, С. П. Роль биогеохимических факторов в развитии краевой патологии / С. П. Сапожников, А. В. Голенков // Микроэлементы в медицине. – 2001. – № 2 (3). – С. 70–72.

96. Сапожников, С. П. Эколого-биогеохимические факторы среды обитания и здоровья : монография / С. П. Сапожников. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2001. – 96 с.

97. Сепиашвили, Р. И. Серотонин и его иммунофизиологические эффекты / Р. И. Сепиашвили, И. П. Балмасова, Л. Н. Стаурина // Российский физиологический журнал имени И. М. Сеченова. – 2013. – Т. 99, № 1. – С. 17–32.

98. Сергеева, В. Е. Сезонные изменения аминосодержащих структур тимуса в первый час антигенного воздействия / В. Е. Сергеева // Бюллетень экспериментальной биололгии и медицины. – 1992. – № 3. – С. 311–314.

99. Сергеева, В. Е. Гистаминсодержащие структуры вторичных лимфоидных органов крыс при длительном поступлении кремния с питьевой водой / В. Е. Сергеева, В. С. Гордова, Л. А. Басова // Современные проблемы естественнонаучных исследований : сборник научных статей под ред. Ю. Ю. Пыльчиковой. – Чебоксары : Чуваш. гос. пед. ун-т, 2013. – С. 65–68.

100. Серотониновый статус печени крыс при поступлении кремния с питьевой водой / Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, Д. О. Иванов // Вопросы морфологии XXI века : Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции, Санкт-Петербург, 13–14 мая 2021 года. Выпуск 6. – СПб. : ООО «Издательство ДЕАН», 2021. – С. 88–90.

101. Сидорова, В. Ф. Регенерация печени у млекопитающих / В. Ф. Сидорова, З. А, Рябинина, Е. М. Лейкина. – М. : Медицина, 1966. – 205 с.

102. Скрипникова, И. А. Микроэлементы в профилактике остеопороза: фокус на кремний / И. А. Скрипникова, А. В. Гурьев // Остеопороз и остеопатии. – 2014. – № 2. – С. 36–40.

103. Соединения кремния и атерогенез (обзор) / С. П. Сапожников, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, В. А. Козлов // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23, № 1. – С. 4–13.

104. Содержание кремния в биологических субстратах человека и животных (обзор литературы) / Н. А. Егорова, Р. И. Михайлова, И. Н. Рыжова [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23, № 2. – С. 24–30.

105. Стручко, Г. Ю. Морфофункциональное исследование биоаминсодержащих структур тимуса в условиях антигенного воздействия и спленэктомии : автореф. дис. … канд. мед. наук : 14.00.23 / Стручко Глеб Юрьевич. – Чебоксары, 1999. – 21 с.

106. Судеева, В. С. Морфология и тинкториальные изменения мастоцитов тимуса у интактных животных во время экстиивации / В. С. Судеева // Сохранение здоровья семьи. – Чебоксары : Изд-во Чуваш. ун-та, 2009. – С. 219–221.

107. Сусликов, В. Л. Современные проблемы и перспективы медицинской микроэлементологии / В. Л. Сусликов // Микроэлементы в медицине. – 2000. – Т 1, № 1. – С. 9–15.

108. Сусликов, В. Л. К гигиенической оценке роли кремния в питьевой воде / В. Л. Сусликов // Гигиена и санитария. – 1978. – № 7. – С. 101–103.

109. Сусликов, В. Л. К обоснованию предельно допустимой концентрации кремниевой кислоты в питьвой воде / В. Л. Сусликов, В. Д. Семенов, Л. С. Ляшко // Гигиена и санитария. – 1979. – № 11. – С. 17–22.

110. Сусликов, В. Л. Эколого-биогеохимимческое зонирование территорий – необходимый этап изучения причинно-следственных связей атеросклероза и его последствий / В. Л. Сусликов, Н. В. Толмачева // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 12 (Ч. 1) – С. 127–130.

111. Сусликов, В. Л. Эколого-биогеохимическое районирование территорий – методологическая основа для оценки среды обитания и здоровья населения / В. Л. Сусликов. – Чебоксары : Изд-во ЧувГУ, 2001. – 40 с.

112. Сусликов, В. Л. Эколого-физиологическое и философское обоснование причинно-следственных связей процесса «здоровье ↔

атеросклероз» / В. Л. Сусликов, Н. В. Толмачева, Ж. В. Маслова // Фундаментальные исследования. – 2015. – № 1. – С. 609–612.

113. Суханова, Г. А. Апоптоз : учебное пособие / Г. А. Суханова, О. Е. Акбашева. – Томск : Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 2009. – 172 с.

114. Толмачев, В. О. Разработка и оценка качества спортивного напитка, обогащенного незаменимыми аминокислотами и кремнием / В. О. Толмачев, С. Л. Тихонов, Н. В. Тихонова // Профессорский журнал. Серия: Рекреация и туризм. – 2019. – № 2 (2). – С. 34–42.

115. Толмачева, Н. В. Методология и принципы гигиенического нормирования оптимальных концентраций и соотношений макро- и микроэлементов в питьевой воде и пищевом рационе / Н. В. Толмачева // Вестник Чувашского университета. – 2010. – № 3. – С. 154–161.

116. Толмачева, Н. В. Эколого-физиологическое обоснование оптимальных уровней макро- и микроэлементов в питьевой воде и пищевых рационах : автореф. дис. ... д-ра мед. наук : 03.03.01 / Толмачева Наталия Викентьевна. – М., 2011. – 35 с.

117. Тучные клетки и опухолевый рост / А. Ф. Лазарев, И. П. Бобров, Т. М. Черданцева [и др.] // Сибирский онкологический журнал. – 2011. – № 4. – С. 59–63.

118. Тучные клетки тимуса как посредники в системе нейроиммунных взаимодействий / В. В. Гусельникова, Е. Г. Сухорукова, Д. Э. Коржевский, А. В. Полевщиков // Медицинский академический журнал. – 2013. – Т. 13, № 3. – С. 53–63.

119. Физиологическая роль кремния / Л. А. Мансурова, О. В. Федчишин, В. В. Трофимов [и др.] // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2009. – Т. 90, № 7. – С. 16–18.

120. Функциональная активность серотонинергической системы у домашних животных в возрастном аспекте / О. Б. Сеин, К. А. Михайлов,

Э. Г. Саргсян [и др.] // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 5. – С. 97–102.

121. Характеристика иммунофенотипа резидентных макрофагов печени и профиля экспрессируемых генов / А. В. Лохонина, А. С. Покусаев, И. В. Арутюнян [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2018. – Т. 7, № 1. – С. 49–61.

122. Эозинофилы как возможные регуляторы уровня гистамина в печени крыс / С. С. Смирнова, Е. А. Григорьева, В. А. Голенкова [и др.] // Морфология в теории и практике : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семеновны Гордон, Чебоксары, 22 ноября 2017 года. Выпуск 3. – Чебоксары : Изд-во Чувашского университета, 2017. – С. 221–223.

123. A binge high sucrose diet provokes systemic and cerebral inflammation in rats without inducing obesity / O. L. Patkar, A. Z. Mohamed, A. Narayanan [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 1. – P. 11252.

124. A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury / D. Dal-Secco, J. Wang, Z. Zeng [et al.] // The Journal of experimental medicine. – 2015. – Vol. 212, № 4. – P. 447–456.

125. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells / C. Schulz, E. Gomez Perdiguero, L. Chorro [et al.] // Science. – 2012. – Vol. 336, № 6077. – P. 86–90.

126. A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues / Y. R. Yu, E. G. O'Koren, D. F. Hotten, M. J. Kan // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, № 3. – e0150606.

127. Abdel-Misih, S. R. Liver anatomy / S. R. Abdel-Misih, M. Bloomston // Surgical Clinics of North America. – 2010. – Vol. 90, № 4. – P. 643–653.

128. Acute toxicity of amorphous silica nanoparticles in intravenously exposed ICR mice / Y. Yu, Y. Li, W.Wang [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 4. – e61346.

129. Adverse effects and underlying mechanism of amorphous silica nanoparticles in liver / Q. Liang, M. Sun, Y. Ma [et al.] // Chemosphere. – 2023. – Vol. 311 (Pt 1). – P. 136955.

130. Albert-Bayo, M. Intestinal mucosal mast cells: key modulators of barrier function and homeostasis / M. Albert-Bayo, I. Paracuellos, A. M. Gonalez-Cfstro [et al.] // Cells. – 2019. – Vol. 8, № 2. – P. 135.

131. Amorphous nanosilicas induce consumptive coagulopathy after systemic exposure / H. Nabeshi, T. Yoshikawa, K. Matsuyama [et al.] // Nanotechnology. – 2012. – Vol. 23, № 4. – P. 045101.

132. Amorphous silica nanoparticles induced spleen and liver toxicity after acute intravenous exposure in male and female rats / R. Tassinari, A. Martinelli, M. Valeri, F. Maranghi // Toxicology and Industrial Health. – 2021. – Vol. 37, № 6. – P. 328–335.

133. Apoptosis of neutrophils and their elimination by Kupffer cells in rat liver / J. Shi, H. Fujieda, Y. Kokubo, K. Wake // Hepatology. – 1996. – Vol. 24, № 5. – P. 1256–1263.

134. AXIN2(+) pericentral hepatocytes have limited contributions to liver homeostasis and regeneration / T. Sun, M. Pikiolek, V. Orsini [et al.] // Cell stem cell. – 2020. – Vol. 26, № 1. – P. 97–107.e6.

135. Azouz, R. A. Toxic Impacts of Amorphous Silica Nanoparticles on Liver and Kidney of Male Adult Rats: an In Vivo Study / R. A. Azouz, R. M. S. Korany // Biological trace element research. – 2021. – Vol. 199, № 7. – P. 2653–2662.

136. Bedossa, P. Liver extracellular matrix in health and disease / P. Bedossa, V. Paradis // The Journal of pathology. – 2003. – Vol. 200, № 4. – P. 504-515.

137. Behavioural alterations induced by chronic exposure to 10 nm silicon dioxide nanoparticles / B. Jarrar, A. Al-Doaiss, A. Shati [et al.] // IET Nanobiotechnology. – 2021. – № 15, № 2. – P. 221–235.

138. Ben-Moshe, S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver / S. Ben-Moshe, S. Itzkovitz // Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology. – 2019. – Vol. 16, № 7. – P. 395–410.

139. Benly, P. Role of Histamine in Acute Inflammation / P. Benly // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2015. – Vol. 7, № 6. – P. 373–376.

140. Bhanja, S. Deep Neural Network for Multivariate Time-Series Forecasting / S. Bhanja, A. Das // Advances in Intelligent Systems and Computing. – 2020. – Vol. 1255. – P. 267–277.

141. Biological and therapeutic effects of orthosilicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy / L. M. Jurkić, I. Cepanec, S. K. Pavelić, K. Pavelić // Nutrition & Metabolism. – 2013. – Vol. 10, № 1. – P. 2.

142. Björnsson, E. The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury / E. Björnsson, E. Kalaitzakis, R. Olsson // Alimentary Pharmacology & Therapeutics. – 2007. – Vol. 25, № 12. – P. 1411–1421.

143. Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions / L. Beattie, A. Sawtell, J. Mann [et al.] // Journal of hepatology. – 2016. – Vol. 65, № 4. – P. 758–768.

144. Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells / C. L. Scott, F. Zheng, P. De Baetselier [et al.] // Nature communications. – 2016. – № 7. – P. 10321.

145. Brown, M. A. Mast cells are important modifiers of autoimmune disease: with so much evidence, why is there still controversy? / M. A. Brown, J. K. Hatfield // Frontiers in Immunology. – 2012. – Vol. 3. – P. 147.

146. C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages / G. Hoeffel, J. Chen, Y. Lavin [et al.] // Immunity. – 2015. – Vol. 42, № 4. – P. 665–78.

147. Ca2+ influx-mediated histamine synthesis and IL-6 release in mast cells activated by monomeric IgE / S. Tanaka, S. Mikura, E. Hashimoto [et al.] // European Journal of Immunology. – 2005. – Vol. 35, № 2. – P. 460–468.

148. Calomme, M. Supplementation of calves with stabilized orthosilicic acid: Effect on the Si, Ca, Mg, and P concentrations in serum and the collagen concentration in skin and cartilage / M. Calomme, D. Vanden Berghe // Biological Trace Element Research. – 1997. – Vol. 56, № 2. – P. 153–165.

149. Cell-in-Cell Structures in the Liver: A Tale of Four E's / S. P. Davies, L.V. Terry, A. L. Wilkinson, Z. Stamataki // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol. 11. – P. 650.

150. Chacalos, E. H. Variations in small and large vessel volumes caused by cations, adrenaline and histamine // The Journal of physiology. – 1967. – Vol. 188, № 2. – P. 141–158.

151. Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice / M. Kinoshita, T. Uchida, A. Sato [et al.] // Journal Hepatology. – 2010. – Vol. 53, № 5. – P. 903–910.

152. Choi, M. K. Dietary Silicon intake of Korean young adult males and its relation to their bone status / M. K. Choi, M. H. Kim // Biological Trace Element Research. – 2017. – Vol. 176, № 1. – P. 89–104.

153. Chronic Oral Exposure to Synthetic Amorphous Silica (NM-200) Results in Renal and Liver Lesions in Mice / D. Boudard, F. Aureli, B. Laurent [et al.] // Kidney International Reports. – 2019. – Vol. 4, № 10. – P. 1463–1471.

154. Cluster Analysis According to Immunohistochemistry is a Robust Tool for Non-Small Cell Lung Cancer and Reveals a Distinct, Immune Signature-defined Subgroup / W. Sterlacci, M. Fiegl, D. Juskevicius, A. Tzankov // Applied

immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM. – 2020. – Vol. 28, № 4. – C. 274–283.

155. Complementary adhesion molecules promote neutrophil-Kupffer cell interaction and the elimination of bacteria taken up by the liver / S. H. Gregory, L. P. Cousens, N. van Rooijen [et al.] // Journal of Immunology. – 2002. – Vol. 168, № 1. – P. 308–315.

156. Constructing biomimetic liver models through biomaterials and vasculature engineering / W. Lv, H. Zhou, A. Aazmi [et al.] // Regenerative biomaterials. – 2022. – Vol. 9. – rbac079.

157. Cross, S. A. A study of methods available for cyto–chemical localization of histamine by fluorescence induced with ophtaldehyde or acetaldehyde / S. A. Cross, S. W. Even, F. W. Rost // The Histochemical journal. – 1971. – Vol. 3, № 6. – P. 471–476.

158. Cunningham, R. P. Liver Zonation – Revisiting Old Questions With New Technologies / R. P. Cunningham, N. Porat-Shliom // Front Physiol. – 2021. – Vol. 12. – e732929.

159. Dai, C. Research progress about the relationship between nanoparticles silicon dioxide and lung cancer / C. Dai, Y. Huang, Y. Zhou // A Chinese journal of lung cancer. – 2014. – Vol. 17, № 10. – P. 760–764.

160. Determination of total silicon and $SiO_2$ particles using an ICP-MS based analytical platform for toxicokinetic studies of synthetic amorphous silica / F. Aureli, M. Ciprotti, M. D'Amato [et al.] // Nanomaterials (Basel). – 2020. – Vol. 10, № 5. – P. 888.

161. Dietary silicon intake and absorption / R. Jugdaohsingh, S. H. C. Anderson, K. L. Tucker [et al.] // American Society for Clinical Nutrition. – 2002. – Vol. 75, № 5. – P. 887–893.

162. Dietary silicon intake in Belgium: Sources, availability from foods, and human serum levels / H. Robberecht, R. Van Cauwenbergh, V. Van Vlaslaer [et al.] // Science of the Total Environment. – 2009. – Vol. 407, № 16. – P. 4777–4782.

163. Dijkman, H. B. P. M. Assessment of Silicone Particle Migration Among Women Undergoing Removal or Revision of Silicone Breast Implants in the Netherlands / H. B. P. M. Dijkman, I. Slaats, P. Bult // JAMA Network open. – 2021. – Vol. 4, № 9. – e2125381.

164. Distinct proliferative and transcriptional effects of the D-type cyclins in vivo / L. K. Mullany, P. White, E. A. Hanse [et al.] // Cell Cycle. –2008. – Vol. 7, № 14. – P. 2215–2224.

165. Domagk, G. Untersuchungen über die Bedeutung des retikuloendothelial Systems für die Entstehung d. Amyloids / G. Domagk // Virchows Archiv. – 1924. – Vol. 253. – P. 594–638.

166. Dorato, M. A. The no-observed-adverse-effect-level in drug safety evaluations: use, issues, and definition(s) / M. A. Dorato, J. A. Engelhardt // Regulatory toxicology and pharmacology : RTP. – 2005. – Vol. 42, № 3. – P. 265–274.

167. Effects of silica nanoparticles on endolysosome function in primary cultured neurons / Y. Ye, L. Hui, K. L. Lakpa [et al.] // The Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. – 2019. – Vol. 97, № 4. – P. 297–305.

168. Effect of silicon-rich water intake on the systemic and peritoneal inflammation of rats with chronic low levels of aluminum ingestion / Z. Radovanovic, B. Djindjic, T. Dzopalic [et al.] // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2018. – Vol. 46. – P. 96–102.

169. Eosinophils attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury in mice through ST2-dependent IL-13 production / Y. Wang, Y. Yang, M. Wang [et al.] // Science Translational Medicine. – 2021. – Vol. 13, № 579. – eabb6576.

170. Eosinophils protect against acetaminophen-induced liver injury through cyclooxygenase-mediated IL-4/IL-13 production / L. Xu, Y. Yang, J. Jiang [et al.] // Hepatology. – 2023. – Vol. 77, № 2. – P. 456–465.

171. Effects of histamine on the metabolism of isolated rat hepatocytes: roles of H1- and H2-histamine receptors / J. A. García-Sáinz, M. C. de la Garza,

J. L. Contreras-Rodríguez [et al.] // Molecular Pharmacology. – 1987. – Vol. 31, № 3. – P. 253–258.

172. Exercise training enhances in vivo clearance of endotoxin and attenuates inflammatory responses by potentiating Kupffer cell phagocytosis / S. Komine, K. Akiyama, E. Warabi [et al.] // Science Report. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 11977.

173. Exley, C. Silicon in life: a bioinorganic solution to bioorganic essentiality / C. Exley // Journal of Inorganic Biochemistry. – 1998. – Vol. 69, № 3. – P. 139–144.

174. Exploring the role of mast cells in the progression of liver disease / S. Huang, H. Wu, F. Luo [et al.] // Frontiers in physiology. – 2022. – Vol. 13. – e964887.

175. Francis, H. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? / H. Francis, C. J. Meininger // Digestive and Liver Disease. – 2010. – Vol. 42, № 8. – P. 529–536.

176. Fukata, M. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders / M. Fukata, A. S. Vamadevan, M. T. Abreu // Seminars in Immunology. – 2009. – Vol. 21, № 4. – P. 242–253.

177. Gebhardt, R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function / R. Gebhardt // Pharmacology & Therapeutics. – 1992. – Vol. 53. – P. 275–354.

178. Gentric, G. Polyploidization in liver tissue / G. Gentric, C. Desdouets // The American Journal of Pathology. – 2014. – Vol. 184, № 2. – P. 322–331.

179. Hazard identification of pyrogenic synthetic amorphous silica (NM-203) after sub-chronic oral exposure in rat: A multitarget approach / R. Tassinari, G. Di Felice, C. Butteroni [et al.] // Food and chemical toxicology. – 2020. – Vol. 137. – P. 111168.

180. Heparinoid complex-based heparin-binding cytokines and cell delivery carriers / M. Ishihara, S. Nakamura, Y. Sato, [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, № 24. – P. 4630.

181. Hepatic recruitment of eosinophils and their protective function during acute liver injury / L. Xu, Y. Yang, Y. Wen [et al.] // Journal of hepatology. – 2022. – Vol. 77, № 2. – P. 344–352.

182. 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, № 1. – P. 261–74.

183. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes / M. J. Wang, F. Chen, J. T. Y. Lau, Y. P. Hu // Cell death & disease. – 2017. – Vol. 8, № 5. – e2805.

184. Hernandez-Verdun, D. Nucleolus: from structure to dynamics / D. Hernandez-Verdun // Histochemistry and Cell Biology. – 2005. – Vol. 125, № 1–2. – P. 127–137.

185. Histamine, Metabolic Remodelling and Angiogenesis: A Systems Level Approach / A. A. Moya-García, A. Pino-Ángeles, F. Sánchez-Jiménez [et al.] // Biomolecules. – 2021. – Vol. 11, № 3. – P. 415.

186. Histamine is correlated with liver fibrosis in biliary atresia / K. Zhou, G. Xie, J. Wen [et al.] // Digestive and Liver Disease. – 2016. – Vol. 48, № 8. – P. 921–926.

187. Histamine-1 and -2 receptors in hepatic tissues of cirrhotic patients with portal hypertension / Z. Zhang, X. Leng, H. Feng [et al.] // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. – 1998. – Vol. 36, № 6. – P. 348–349.

188. Holt, M. P. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury / M. P. Holt, L. Cheng, C. Ju // Journal of leukocyte biology. – 2008. – Vol. 84, № 6. – P. 1410–1421.

189. Human mast cells are capable of serotonin synthesis and release / N. M. Kushnir-Sukhov, J. M. Brown, Y. Wu [et al.] // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2007. – Vol. 119, № 2. – P. 498–499.

190. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer / J. Font-Burgada, S. Shalapour, S. Ramaswamy [et al.] // Cell. – 2015. – Vol. 162, № 4. – P. 766–779.

191. Iba-1-/CD68+ microglia are a prominent feature of age-associated deep subcortical white matter lesions / R. Waller, L. Baxter, D. J. Fillingham [et al.] // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, № 1. – e0210888.

192. Identification of nanoscale ingredients in commercial food products and their induction of mitochondrially mediated cytotoxic effects on human mesenchymal stem cells / J. Athinarayanan, A. A. Alshatwi, V. S. Periasamy, A. A. Al-Warthan // Journal of Food Science. – 2015. – Vol. 80, № 2. – P. 459–464.

193. IL-33 fine tunes mast cell degranulation and chemokine production at the single-cell level / R. Joulia, F. E. L'Faqihi, S. Valitutti, E. Espinosa // The Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2017. – Vol. 140, № 2. – P. 497–509.e10.

194. Immune Response of Macrophage Population to Cochlear Implantation: Cochlea Immune Cells / K. Y. Noonan, I. A. Lopez, G. Ishiyama, A. Ishiyama // Otology & Neurotology. – 2020. – Vol. 41, № 9. – P. 1288–1295.

195. In vivo toxicity of orally administrated silicon dioxide nanoparticles in healthy adult mice / R. Hassankhani, M. Esmaeillou, A. A. Tehrani [et al.] // Environmental science and pollution research. – 2015. – Vol. 22, № 2. – P. 1127–1132.

196. Inflammasome-driven catecholamine catabolism in macrophages blunts lipolysis during ageing / C. D. Camell, J. Sander, O. Spadaro [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 550, № 7674. – P. 119–123.

197. Integrative Metabolomics, Proteomics and Transcriptomics Analysis Reveals Liver Toxicity of Mesoporous Silica Nanoparticles / J. Li, R. Sun, H. Xu, G. Wang // Frontiers in pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – e835359.

198. Intracellular histamine and liver regeneration: high affinity binding of histamine to chromatin, low affinity binding to matrix, and depletion of a nuclear storage pool following partial hepatectomy / L. J. Brandes, R. P. Bogdanovic, J. Tong

[et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1992. – Vol. 184, № 2. – P. 840–847.

199. Kapuscinski, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe / J. Kapuscinski // Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission. – 1995. – Vol. 70, № 5. – P. 220–233.

200. Kim, Y. Y. Relationship between dietary intake and Urinary Excretion of Silicon in Free-Living Korean Adult Men and Women / Y. Y. Kim, M. H. Kim, M. K. Choi // Biological Trace Element Research. – 2019. – Vol. 191, № 2. – P. 286–293.

201. Kubes, P. Immune Responses in the Liver / P. Kubes, C. Jenne // Annual review of immunology. – 2018. – Vol. 36. – P. 247–277.

202. Lee, V. M. Zonal location of compensatory hepatocyte proliferation following chemically induced hepatotoxicity in rats and humans / V. M. Lee, R. G. Cameron, M. C. Archer // Toxicologic Pathology. – 1998. – Vol. 26, № 5. – P. 621–627.

203. Lidsky, T. I. Is the Aluminum Hypothesis dead? / T. I. Lidsky // Journal of Occupational and Environmental Medicine. – 2014. – Vol. 56, № 5 Sup. – P. 73–79.

204. Lima, M. New applications of heparin and other glycosaminoglycans / M. Lima, T. Rudd, E. Yates // Molecules. – 2017. – Vol. 22, № 5. – P. 749.

205. Liver eosinophilic infiltrate is a significant finding in patients with chronic hepatitis C / G. Tarantino, D. Cabibi, C. Cammà, N. Alessi [et al.] // Journal of viral Hepatitis. – 2008. – Vol. 15, № 7. – P. 523–530.

206. Low dietary silicon supplementation may not affect bone and cartilage in mature, sedentary horses / A. Pritchard, B. D. Nielsen, C. Robison, J. M. Manfredi // Journal of animal science. – 2020. – Vol. 98, № 12. – skaa377.

207. Lysosomal impairment-mediated autophagy dysfunction responsible for the vascular endothelial apoptosis caused by silica nanoparticle via ROS/PARP1/AIF

signaling pathway / A. Abulikemu, X. Zhao, Y. Qi, Y. Liu // Environmental Pollution. – 2022. – Vol. 304. – P. 119202.

208. M2-like macrophages in the fibrotic liver protect mice against lethal insults through conferring apoptosis resistance to hepatocytes / L. Bai, X. Liu, Q. Zheng [et al.] // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 10518.

209. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei, C. Weidong // European Journal of Pharmacology. – 2020. – Vol. 877. – P. 173090.

210. Macrophage polarization and its role in liver disease / C. Wang, C. Ma, L. Gong [et al.] // Frontiers in Immunology. – 2021. – Vol. 12. – P. 803037.

211. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease / A. Shapouri-Moghaddam, S. Mohammadian, H. Vazini [et al.] // Journal of Cellular Physiology. – 2018. – Vol. 233, № 9. – P. 6425–6440.

212. Magnesium Supplementation Alleviates the Toxic Effects of Silica Nanoparticles on the Kidneys, Liver, and Adrenal Glands in Rats / M. M. Badawy, M. Z. Sayed-Ahmed, Y. Almoshari [et al.] // Toxics. – 2023. – Vol. 11, № 4. – P. 381.

213. Maintz, L. Histamine and histamine intolerance / L. Maintz, N. Novak // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2007. – Vol. 85, № 5. – P. 1185–1196.

214. Mapping the hepatic immune landscape identifies monocytic macrophages as key drivers of steatohepatitis and cholangiopathy progression / A. Guillot, M. Winkler, M. Silva Afonso [et al.] // Hepatology. – 2023. – Vol. 78, № 1. – P. 150–166.

215. Martin, K. R. Dietary Silicon: Is. Biofortification Essential? / K. R. Martin // Journal of nutrition and food science forecast. – 2018. – Vol. 1, № 2. – P. 1006.

216. Martin, K. R. Silicon: the health benefits of a metalloid / K. R. Martin // Metal Ions in life Science. – 2013. – Vol. 13. – P. 451–473.

217. Martin, K. R. The chemistry of silica and its potential health benefits / K. R. Martin // Journal of Nutrition, Health and Aging, – 2007. – Vol. 11, № 2. – P. 94–97.

218. Martinez-Hernandez, A. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver / A. Martinez-Hernandez, P. S. Amenta // Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histopathology. – 1993. – Vol. 423, № 1. – P. 1–11.

219. Mast Cell-Derived Histamine Regulates Liver Ketogenesis via Oleoylethanolamide Signaling / A. Misto, G. Provensi, V. Vozella [et al.] // Cell Metabolism. – 2019. – Vol. 29, № 1. – P. 91–102.e5.

220. Mast cells and inflammation / T. C. Theoharides, K. D. Alysandratos, A. Angelidou [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 2012. – Vol. 1822, № 1. – P. 21–33.

221. Mast cells in liver disease progression: An update on current studies and implications / L. Pham, L. Kennedy, L. Baiocchi [et al.] // Hepatology. – 2022. – Vol. 75, № 1. – P. 213–218.

222. Mast cells in the auditory periphery of Rodents / A. J. Szczepek, T. Dudnik, B. Karayay [et al.] // Brain sciences. – 2020. – Vol. 10, № 10. – P. 697.

223. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver / K. M. Tsoi, S. A. MacParland, X. Z. Ma [et al.] // Nature Materials. – 2016. – Vol. 15, № 11. – P. 1212–1221.

224. Mesoporous silica nanoparticles trigger liver and kidney Injury and fibrosis via altering TLR4/NF-κB, JAK2/STAT3 and Nrf2/HO-1 signaling in rats / A. M. Mahmoud, E. M. Desouky, W. G. Hozayen [et al.] // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, № 10. – P. 528.

225. Metabolomic characteristics of hepatotoxicity in rats induced by silica nanoparticles / M. Sun, J. Zhang, S. Liang [et al.] // Ecotoxicology and environmental safety. – 2021. – Vol. 208. – P. 111496.

226. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration: alternative epithelial pathways / G. K. Michalopoulos // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. – 2011. – Vol. 43, № 2. – P. 173–179.

227. Mikkelsen, E. Studies on the effect of histamine in isolated human pulmonary arteries and veins / E. Mikkelsen, A. M. Sakr, L. T. Jespersen // Acta Pharmacologica et Toxicologica (Copenh). – 1984. – Vol. 54, № 2. – P. 86–93.

228. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex / S. G. Torres-Platas, S. Comeau, A. Rachalski [et al.] // Journal of Neuroinflammation. – 2014. – Vol. 11. – P. 12.

229. Moss, J. Muscle relaxants and histamine release / J. Moss // Acta Anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum. – 1995. – Vol. 106. – P. 7–12.

230. Multimethod approach for the detection and characterisation of food-grade synthetic amorphous silica nanoparticles / F. Barahona, I. Ojea-Jimenez, O. Geiss [et al.] // Journal of Chromatography A. – 2016. – Vol. 1432. – P. 92–100.

231. Naito, M. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells / M. Naito, G. Hasegawa, K. Takahashi // Microscopy research and technique. – 1997. – Vol. 39, № 4. – P. 350–364.

232. Nakano, K. Histamine produced by macrophage and T lymphocyte: a new type of signal transducer / K. Nakano, S. Takamatsu // Nihon Yakurigaku Zasshi. – 2001. – Vol. 118, № 1. – P. 15–22.

233. Nanoparticle-induced inflammation and fibrosis in ex vivo murine precision-cut liver slices and effects of nanoparticle exposure conditions / R. Bartucci, A. Z. van der Meer, Y. L. Boersma [et al.] // Archives of Toxicology. – 2021. – Vol. 95, № 4. – P. 1267–1285.

234. Noël, R. Recherches Histo-Physiologiques sur la Cellule Hépatique des Mammifères / R. Noël // Archives d'anatomie microscopique. – 1923. – Vol. 19. – P. 1–158.

235. Oxidative stress, inflammation, and DNA damage in multiple organs of mice acutely exposed to amorphous silica nanoparticles / A. Nemmar, P. Yuvaraju,

S. Beegam [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2016. – Vol. 11. – P. 919–928.

236. Pathology of the liver sinusoids / E. M. Brunt, A. S. Gouw, S. G. Hubscher [et al.] // Histopathology. – 2014. – Vol. 64, № 7. – P. 907–920.

237. Peng, W. C. Hepatocyte organoids and cell transplantation: What the future holds / W. C. Peng, L. J. Kraaier, T. A. Kluiver // Experimental & Molecular Medicine. – 2021. – Vol. 53, № 10. – P. 1512–1528.

238. Phenotypic Changes in Macrophage Activation in a Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease using Microminipigs / D. Yoshii, T. Nakagawa, Y. Komohara [et al.] // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2021. – Vol. 28, № 8. – P. 844–851.

239. Platelets and mast cells promote pathogenic eosinophil recruitment during invasive fungal infection via the 5-HIAA-GPR35 ligand-receptor system / M. De Giovanni, E. V. Dang, K. Y. Chen [et al.] // Immunity. – 2023. – Vol. 56, № 7. – P. 1548–1560.e5.

240. Polarizing macrophages in vitro / X. Huang, Y. Li, M. Fu, H. B. Xin // Methods in Molecular Biology. – 2018. – Vol. 1784. – P. 119–126.

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

242. Presence and risks of nanosilicain food products / S. Dekkers, P. Krystek, R. J. Peters [et al.] // Nanotoxicology. – 2011. – Vol. 5, № 3. – P. 393–405.

243. Presence of nano-sized silica during in vitro digestion of foods containing silica as a food additive / R. Peters, E. Kramer, A. G. Oomen [et al.] // ACS Nano. – 2012. – Vol. 6, № 3. – P. 2441–2451.

244. Presence of nanosilica (E551) in commercial food products: TNF-mediated oxidative stress and altered cell cycle progression in human lung fibroblast cells / J. Athinarayanan, V. S. Periasamy, M. A. Alsaif [et al.] // Cell Biology and Toxicology. – 2014. – Vol. 30, № 2. – P. 89–100.

245. Prescha, A. Dietary silicon and its impact on plasma silicon levels in the Polish Population / A. Prescha, K Zabłocka-Słowińska, H. Grajeta // Nutrients. – 2019. – Vol. 11, № 5. – P. 980.

246. Questrada, I. ATP-independent luminal oscillations and release of Ca2+ and H+ from mast cell secretory granules: implications for signal transduction / I. Questrada, W. C. Chin, P. Verdugo // Biophysical Journal. – 2003. – Vol. 85, № 2. – P. 963–970.

247. Reconstitution of liver mass via cellular hypertrophy in the rat / P. Nagy, T. Teramoto, V. M. Factor [et al.] // Hepatology. – 2001. – Vol. 33, №. 2. – P. 339–345.

248. Regulation of serotonin-induced trafficking and migration of eosinophils / B. N. Kang, S. G. Ha, N. S. Bahaie [et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 54840.

249. Role of Hepatocyte Growth Regulators in Liver Regeneration / M. Kimura, H. Moteki, M. Ogihara // Cells. – 2023. – Vol. 12, № 2. – P. 208.

250. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice / C. Vida, I. M. de Toda, J. Cruces [et al.] // Redox Biology. – 2017. – Vol. 12. – P. 423–437.

251. Sadek, S. A. Ameliorative effect of Allolobophora caliginosa extract on hepatotoxicity induced by silicon dioxide nanoparticles / S. A. Sadek, A. M. Soliman, M. Marzouk // Toxicology and Industrial Health. – 2016. – Vol. 32, № 8. – P. 1358–1372.

252. Safety and toxicity issues of therapeutically used nanoparticles from the oral route / F. Lotfipour, S. Shahi, A. Farjami [et al.] // BioMed Research International. – 2021. – Vol. 2021. – P. 9322282.

253. Sergent, T. In Vitro investigation of intestinal transport mechanism of silicon, supplied as orthosilicic acid-vanillin complex / T. Sergent, K. Croizet, Yves-J. Schneider // Molecular nutrition and food research. – 2017. – Vol. 61, № 2. – P. 1600602.

254. Schwarz, K. Ironth pomotihg effects of silicon in rats / K. Schwarz, D. Miene // Nuture. – 1972. – Vol. 239. – P. 333–334

255. Sequential alteration of microglia and astrocytes in the rat thalamus following spinal nerve ligation / L. Blaszczyk, M. Maître, T. Lesté-Lasserre [et al.] // Journal of Neuroinflammation. – 2018. – Vol. 15, № 1. – P. 349.

256. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge / D. M. Norden, P. J. Trojanowski, E. Villanueva [et al.] // Glia. – 2016. – Vol. 64, № 2. – P. 300–316.

257. Serotonin increases the cAMP concentration and the phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat kidney, small intestine, and liver / M. T. Zabala, P. Lorenzo, L. Alvarez [et al.] // Journal of cellular physiology. – 1992. – Vol. 150, № 3. – P. 451–455.

258. Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis / A. Nocito, F. Dahm, W. Jochum [et al.] // Gastroenterology. – 2007. – Vol. 133, № 2. – P. 608–618.

259. Sheng, J. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells / J. Sheng, C. Ruedl, K. Karjalainen // Immunity. – 2015. – Vol. 43, № 2. – P. 382–93.

260. Silica nanoparticle acute toxicity on male rattus norvegicus domestica: ethological behavior, hematological disorders, biochemical analyses, hepato-renal function, and antioxidant-immune response / T. N. Almanaa, M. Aref, M. A. Kakakhel [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10. – e868111.

261. Silica nanoparticles induce liver fibrosis via TGF-$\beta_1$/Smad3 pathway in ICR mice / Y. Yu, J. Duan, Y. Li [et al.] // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – Vol. 12. – P. 6045–6057.

262. Silica sol obtained from rice husk ash / A. M. de Sousa, L. Visconte, C. Mansur, C. Furtado // Chemistry & Chemical Technology. – 2009. – Vol. 3, № 4. – P. 321–326.

263. Silicic acid and beer consumption reverses the metal imbalance and the prooxidant status induced by aluminum nitrate in mouse brain / M. J. González-Muñoz, A. Garcimartán, I. Meseguer [et al.] // Journal of Alzheimer's Disease. – 2017. – Vol. 56, № 3. – P. 917–927.

264. Silicon: A neglected micronutrient essential for bone health / M. Rondanelli, M. A. Faliva, G. Peroni [et al.] // Experimental Biology and Medicine (Maywood). – 2021. – Vol. 246, № 13. – P. 1500–1511.

265. Silicon dioxide nanoparticles induced neurobehavioral impairments by disrupting microbiota-gut-brain axis / J. Diao, Y. Xia, X. Jiang [et al.] // Journal of Nanobiotechnology. – 2021. – Vol. 19, № 1. – P. 174.

266. Silicon supplementation affects mineral metabolism but not bone density or strength in male broilers / A. Pritchard, C. Robison, T. Nguyen, B. D. Nielsen // PLoS One. – 2020. – Vol. 15, № 12. – e0243007.

267. Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver / K. B. Halpern, R. Shenhav, O. Matcovitch-Natan [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 542. – P. 352–356.

268. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice / T. Liu, L. Li, X. Teng [et al.] // Biomaterials. – 2011. – Vol. 32, № 6. – P. 1657–1668.

269. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations / S. A. MacParland, J. C. Liu, X. Z. Ma [et al.] // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9, № 1. – P. 4383.

270. Sleyster, E. C. Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells / E. C. Sleyster, D. L. Knook // Laboratory Investigation. – 1982. – Vol. 47, № 5. – P. 484–490.

271. Small silica nanoparticles transiently modulate the intestinal permeability by actin cytoskeleton disruption in both Caco-2 and Caco-2/HT29-MTX models / R. Cornu, C. Chrétien, Y. Pellequer [et al.] // Archives of Toxicology. – 2020. – Vol. 94, № 4. – P. 1191–1202.

272. Smitha, T. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis / T. Smitha, P. Sharada, H. Girish // Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP. – 2011. – Vol. 15, № 1. – P. 26–33.

273. Specific uptake of serotonin by murine macrophages / J. C. Jackson, R. F. Walker, W. H. Brooks [et al.] // Life Science journal. – 1988. – Vol. 42, № 17. – P. 1641–1650.

274. Stewart, S. R. High dietary calcium to phosphorus ratio and alkali-forming potential as factors promoting silica urolithiasis in sheep / S. R. Stewart, R. J. Emerick, R. H. Pritchard // Journal of animal science. – 1990. – Vol. 68, № 2. – P. 498–503.

275. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica / M. Van der Zande, R. J. Vandebriel, M. J. Groot [et al.] // Particle and Fibre Toxicology. – 2014. – Vol. 11. – P. 8.

276. Suzuki, M. Histamine synthesis by liver macrophages and its role in regeneration of the injured liver / M. Suzuki, K. Nakano // Inflammation research. – 1998. – Vol. 47, Sup. 1. – P. 44-45.

277. Synthesis and Characterization of Silica, Silver-Silica, and Zinc Oxide-Silica Nanoparticles for Evaluation of Blood Biochemistry, Oxidative Stress, and Hepatotoxicity in Albino Rats / A. Ali, S. Saeed, R. Hussain [et al.] // ACS Omega. – 2023. – Vol. 8, № 23. – P. 20900–20911.

278. Takahashi, K. Development, differentiation, and proliferation of macrophages in the rat yolk sac / K. Takahashi, M. Naito // Tissue Cell. – 1993. – Vol. 25, № 3. – P. 351–362.

279. Takahashi, K. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study / K. Takahashi, F. Yamamura, M. Naito // Journal of leukocyte biology. – 1989. – Vol. 45, № 2. – P. 87–96.

280. Terpstra, V. Scavenger receptors on liver Kupffer cells mediate the in vivo uptake of oxidatively damaged red blood cells in mice / V. Terpstra, T. J. van Berkel // Blood. – 2000. – Vol. 95, № 6. – P. 2157–2163.

281. The Bioavailability, Biodistribution, and Toxic Effects of Silica-Coated Upconversion Nanoparticles in vivo / M. Zhou, X. Ge, D. M. Ke [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2019. – Vol. 7. – P. 218.

282. The comparative absorption of silicon from different foods and food supplements / S. Sripanyakorn, R. Jugdaohsingh, W. Dissayabutr [et al.] // British Journal of Nutrition. – 2009. – Vol. 102, № 6. – P. 825–834.

283. The decrease in silicon concentration of the connective tissues with age in rats is a marker of connective tissue turnover / R. Jugdaohsingh, A. I. E. Watson, L. D. Pedro, J. J. Powell // Bone. – 2015. – Vol. 75. – P. 40–48.

284. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice / Y. Ebe, G. Hasegawa, H. Takatsuka [et al.] // Pathology International. – 1999. – Vol. 49, № 6. – 519–32.

285. Tiligada, E. Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century / E. Tiligada, M. Ennis // British journal of pharmacology. – 2020. – Vol. 177, № 3. – P. 469–489.

286. Time- and concentration-dependent effects of exogenous serotonin and inflammatory cytokines on mast cell function / S. M. Gruba, A. F. Meyer, B. M. Manning [et al.] // ACS chemical biology. – 2014. – Vol. 9, № 2. – P. 503–509.

287. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors / E. Gomez Perdiguero, K. Klapproth, C. Schulz [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 518, № 7540. – P. 547–551.

288. TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells / Z. Tu, A. Bozorgzadeh, R. H. Pierce [et al.] // Journal of Experimental Medicine. – 2008. – Vol. 205, № 1. – P. 233–44.

289. Toxicology of silica nanoparticles: an update / S. Murugadoss, D. Lison, L. Godderis [et al.] // Archives of Toxicology. – 2017. – Vol. 91, № 9. – P. 2967–3010.

290. Traina, G. Mast cells in gut and brain and their potential role as an emerging therapeutic target for neural diseases / G. Traina // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2019. – Vol. 13, № 345. – P. 1–13.

291. Trefts, E. The liver / E. Trefts, M. Gannon, D. H. Wasserman // Current Biology. – 2017. – Vol. 27, № 21. – P. 1147–1151.

292. Uptake of silica nanoparticles: neurotoxicity and Alzheimer-like pathology in human SK-N-SH and mouse neuro2a neuroblastoma cells / X. Yang, C. He, J. Li [et al.] // Toxicology Letters. – 2014. – Vol. 229, № 1. – P. 240–249.

293. Vagus Nerve Stimulation Reduces Neuroinflammation Through Microglia Polarization Regulation to Improve Functional Recovery After Spinal Cord Injury / H. Chen, Z. Feng, L. Min [et al.] // Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2022. – Vol. 16. – P. 813472.

294. Variations in hydroxyapatite crystallinity: Effects on interface reactions / C. A. Van Blitterswijk, Y. P. Bovell, J. S. Flach [et al.] // In: Hydroxyapatite Coated Hip and Knee Arthroplasty. – Expansion Scientifique Francaise, Paris, 1995. – P. 33–40.

295. Visualisation of microglia with the use of immunohistochemical double staining method for CD-68 and Iba-1 of cerebral tissue samples in cases of brain contusions / A. Stankov, V. Belakaposka-Srpanova, N. Bitoljanu [et al.] // Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki). – 2015. – Vol. 36, № 2. – P. 141–145.

296. Weiss, R. J. Targeting heparin and heparan sulfate protein interactions / R. J. Weiss, J. D. Esko, Y. Tor // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2017. – Vol. 15, № 27. – P. 5656–5668.

297. Why nanoparticles prefer liver macrophage cell uptake in vivo / W. Ngo, S. Ahmed, C. Blackadar [et al.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2022. – Vol. 185. – P. 114238.

298. Widespread activation of microglial cells in the hippocampus of chronic epileptic rats correlates only partially with neurodegeneration / I. E. Papageorgiou, A. F. Fetani, A. Lewen [et al.] // Brain Structure and Function. – 2015. – Vol. 220, № 4. – P. 2423–2439.

299. Yamada, J. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis / J. Yamada, S. Jinno // The Journal of Comparative Neurology. – 2013. – Vol. 521, № 5. – P. 1184–1201.

300. Yamate, J. Histopathological analysis of rat hepatotoxicity based on macrophage functions: in particular, an analysis for thioacetamide-induced hepatic lesions / J. Yamate, T. Izawa, M. Kuwamura // Food Safety (Tokyo). – 2016. – Vol. 4, № 3. – P. 61–73.

301. Yoo, N. K. Determination of two differently manufactured silicon dioxide nanoparticles by cloud point extraction approach in intestinal cells, intestinal barriers and tissues / N. K. Yoo, Y. R. Jeon, S. J. Choi // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 13. – P. 7035.

302. Zajicek, G. The streaming liver / G. Zajicek, R. Oren, M. Jr. Weinreb // Liver. – 1985. – Vol. 5, № 6. – P. 293–300.

# ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1 – Содержание некоторых микроэлементов в питьевой воде, отобранной в зонах оптимума (г. Чебоксары), кризиса (г. Цивильск) и бедствия (Красночетайский муниципальный округ)

| Показатель | Единица измерения | Результат | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | город Чебоксары | город Цивильск | Красночетайский муниципальный округ | | |
| | | | | село Красные Четаи | деревня Томлеи | деревня Черепаново |
| | | Централизованное водоснабжение | | | | Нецентрализованное водоснабжение |
| Жесткость | ºЖ | 3,1 | 5,5 | 0,45 | 1,5 | 4,1 |
| Массовая концентрация фторидов | мг/дм$^3$ | 0,182 | 0,250 | 0,83 | 2,39 | 0,533 |
| Массовая концентрация кальция | мг/дм$^3$ | 44 | 40 | 2,30 | 15,4 | 57 |
| Массовая концентрация магния | мг/дм$^3$ | 10,4 | 43 | 4,1 | 8,3 | 14,9 |
| Массовая концентрация растворенных форм кремния | мг/дм$^3$ | 1,698 | 5,22 | 3,148 | 3,447 | 12,161 |