

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

РОМАК ОЛЕГ ІГОРОВИЧ

УДК 616.36-002.17-08-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПАТОГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГЕНЕРАЦІЇ ТКАНИНИ ПЕЧІНКИ
ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ІНДУКОВАНОГО
ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ЦИРОЗУ ПЕЧІНКИ**

14.03.04 - Патологічна фізіологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.І. Ромак

Науковий керівник:
Аппельханс Олена Леонідівна,
доктор медичних наук, професор

Одеса – 2021

АНОТАЦІЯ

Ромак О. І. Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. – Одеський національний медичний університет МОЗ України, Одеса, 2021.

Запорізький державний медичний університет МОЗ України, Запоріжжя, 2021.

Дисертація присвячена дослідженню механізмів порушення морфофункціонального стану печінки за умов моделювання хронічного гепатиту та цирозу, а також ефективності корекції виявлених змін шляхом застосування збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП).

Відповідно до мети та завдань дослідження експеримент проведений на 205 статевозрілих щурах-самцях, які утримувались в стандартних умовах біологічної клініки (віварію) Одеського національного медичного університету.

З застосуванням патофізіологічного (експериментальне моделювання хронічного гепатиту та цирозу печінки; введення ЗТП); патогістологічного; культурального (отримання ЗТП шляхом виділення із цільної крові); гематологічного (гемограма); біохімічного; імуноферментного (вміст цитокінів); статистичного аналізу результатів виявляли динаміку змін морфофункціонального стану печінки за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми, при моделювання патології та після її корекції.

Хронічний гепатит (ХГ) індукували шляхом внутрішньошлункового введення олійного розчину чотирихлористого вуглецю (CCl_4) концентрацією 50 % у дозі 0,05 мл через день протягом 7-8 тижнів. Цироз печінки (ЦП) індукували шляхом внутрішньошлункового введення CCl_4 концентрацією 50 % та заміщенням питної води розчином етилового спирту концентрацією 10 % протягом 150 діб. ЗТП отримували шляхом її виділення з цільної крові при центрифугуванні з цитратом натрію на апараті SmartPrep (Harvester Corp.,

USA). Всі результати обробляли з використанням загальноприйнятих у медико-біологічних дослідженнях параметричних і непараметричних методів статистичного аналізу. Першим днем експерименту вважали наступний день після останнього введення CCl_4 або ЗТП.

У тварин контрольної групи будова печінки, міокарду, нирок мала звичайний вигляд, загальний та біохімічний аналізи крові – без особливостей, вміст в крові прозапальних цитокінів ІЛ-2 становив 16,7 пг/мл, ІЛ-6 – 75, 3 пг/мл.

З метою перевірки безпеки застосування ЗТП при різних способах введення були відпрацьовані два шляхи її доставлення: «відкритий», коли за умов присередньої лапаротомії виділяли частку печінки, та «закритий», в проекцію частки печінки, що виступала за лінію реберної дуги. Після 8 тижнів спостереження значущих змін морфології печінки, міокарду, нирок виявлено не було, незалежно від варіанту введення, тому, в подальшому ми застосовували введення ЗТП «закритим» шляхом, який є більш зручним, простим у виконанні та менш травматичним для тварин.

Через 2 тижні від початку експерименту у тварин з модельованим ХГ виявлялися морфологічні ознаки токсичного гепатиту. На 28-у добу виявлялася значна жирова дистрофія і вогнищеві некрози гепатоцитів з лімфомакрофагальними інфільтратами навколо них, порушення балочної структури печінкових часточок, набряк та повнокров'я стромі. Через 8 тижнів від початку експерименту виявлялися ознаки жирової дистрофії, внутрішньоклітинні холестази і біліостази гранули гемосидерину, дисконкомплексація печінкових балок, фіброз і розширення порталних трактів, а також септальний фіброз з утворенням дрібних монолобулярних вузликів, оточених сполучною тканиною.

На тлі прогресуючої картини запальної реакції вміст прозапальних цитокінів ІЛ-2 та ІЛ-6 мав синусоїдну криву: різко зростав на 14-у добу експерименту, на 28-у добу відбувалося їх суттєве зниження, та зростання 56-у добу виключно ІЛ-6. Такий стан в цілому відповідає уявленню щодо механізмів дії прозапальних цитокінів при запаленні, оскільки воно проявляється

сукупністю процесів, які регулюються цитокінами: підсиленням кровопостачання органу, що уражений, порушенням його морфології та функції – некрозами, кровостазам, з наступним утворенням надлишкової кількості колагену для заміщення дефекту.

Протягом всього періоду спостереження з 14-ї до 56-ї доби в крові щурів із ХГ виявлявся значний лейкоцитоз на тлі зниження чисельності лімфоцитів та поступового зниження вмісту еритроцитів. Відмічалось стале зростання активності ферментів цитолізу та вмісту загального білірубіну, тоді як вміст загального білку різко знижався і залишався таким до кінця експерименту.

У щурів з модельованим ЦП на 14-у добу виявляли ознаки значної жирової дистрофії гепатоцитів та некрозу окремих гепатоцитів. Через 4 тижні визначалися вогнища некрозу та тяжкої жирової дистрофії гепатоцитів, помірна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація часточок печінки. На 56-у добу печінка мала бурий колір та тьмяну поверхню, в часточках печінки спостерігалися ділянки централобулярного некрозу та тяжкої жирової дистрофії гепатоцитів, в багатьох гепатоцитах – внутрішньоклітинні холестази, значний білістаз в дрібних жовчних дуктулах, лімфо-иакрофагальна інфільтрація печінкових часточок, фіброз портальних трактів та розвиток сполучної тканини в часточках печінки з формуванням фіброзних септ та хибних часточок.

В крові тварин з ЦП виявлялися виразні ознаки хронічного важкого запального процесу: лейкоцитоз, лімфопенія, анемія, тромбоцитопенія, різке підвищення активності цитолітичних ферментів та вмісту загального білірубіну, пригнічення білок-синтезуючої функції печінки. Прогресування ознак уражень печінки у щурів з ЦП супроводжувалось коливанням вмісту обох досліджуваних цитокінів з піковими значеннями на 14-у та 56-у доби і зниженням майже до показників контрольної групи – на 28-у добу.

Експериментальне лікування щурів з модельованим ХГ введенням збагаченої тромбоцитами плазми призвело до поступової активації процесу регенерації із гальмуванням надмірної активації імунної відповіді. При цьому, на 14-у добу після введення ЗТП в перипортальних зонах печінки з'являються

дрібні протоки так званої репаративної «дуктулярної реакції» та значна кількість двоядерних гепатоцитів в печінкових часточках, що можна розглядати вагомим показником активації репаративної регенерації. Варто зазначити, що паралельно із відновлювальними процесами були присутні патологічні зміни паренхіми печінки, характеризується наявністю окремих гепатоцитів в стані жирової дистрофії. В крові виявлявся лейкоцитоз, лімфоцитопенія, помірна еритроцитопенія, підвищення активності ферментів цитолізу, вмісту загального білірубіну та зниження вмісту загального білку. Незважаючи на позитивні гістологічні зміни вміст прозапальних цитокінів був значно підвищеним у порівнянні з контролем, і майже не відрізнявся від показників тварин з ХГ. Така ситуація відповідає даним, що їх отримали інші дослідники за умов тривалого процесу запалення в органах ЖКТ, а також уявленню щодо біологічних властивостей ІЛ-2 та ІЛ-6.

У подальші терміни спостереження з 28-ї до 56-ї доби після застосування ЗТП на тлі ХГ, було виявлено позитивний вплив коригуючої терапії на перебіг запального процесу, що проявлялося достовірним зменшенням ознак запалення: гістологічно в печінці відмічалися поодинокі вогнища незначної лімфоцитарної інфільтрації часточкових перисинусоїдальних просторів, в крові відбувалася нормалізація вмісту прозапальних цитокінів та зниження рівня лейкоцитів, спостерігалось значне зниження активності ферментів цитолізу та загального білірубіну. Необхідно зазначити відновлювальний вплив ЗТП на білок-синтезуючу функцію печінки та анемічний синдром. В цілому можна говорити, що ознаки значної альтерації печінки, які спостерігалися при ХГ без корекції, після застосування ЗТП поступово заміщувалися на ознаки репаративної регенерації, коли активність прозапальних цитокінів певний час триває, але надходження у складі ЗТП ендотеліального фактору росту судин, інсуліноподібного фактору росту, фактору росту фібробластів, тромбоцитарного фактору росту сприяють гармонізації етапності процесу відтворення тканини після ураження.

При другій модельній патології цирозу печінки на 14-у добу після введення ЗТП гістологічно в печінці виявлялися ознаки фіброзу і розширення портальних трактів з їх значною лімфогістіоцитарною інфільтрацією, а також явища перипортального фіброзу. В крові порівняно з групою без корекції було відмічене майже на 60 % менший вміст лейкоцитів, та на 30,8 % вище кількість лімфоцитів ($p < 0,05$). Активність ферментів цитолізу та вміст загального білірубину були значно меншими, а вміст загального білку на 90 % перевищував значенні групи з ЦП без корекції ($p < 0,05$). Через 28 діб після введення ЗТП в печінці зберігалися явища портально-перипортального фіброзу та нерівномірне кровонаповнення судин. В крові продовжувалося зниження кількості показників запального процесу та активності цитолізу відносно групи без корекції. На 56-у добу в печінці виявлялася активна проліферація гепатоцитів, відновлювалася балочна структура органу, спостерігалася помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація портальних трактів. Прояви запалення та анемії поступово гальмувалися, при цьому на 40 % знижувалась активність АЛТ, на 34 % зростав вміст загального білку порівняно з попереднім терміном дослідження ($p < 0,05$). Після корекції ЦП з 28-ї доби вміст ІЛ-2 починав знижуватись порівняно з групою без корекції, майже сягаючи рівня контрольної групи на 56-у добу; вміст ІЛ-6 на 14-у добу знижувався на 11,5 % порівняно з групою без корекції ($p < 0,05$), а з 28-ї доби до кінця експерименту залишався стабільно нижчим за показник контрольної групи.

Той факт, що у тварин з хронічним запальними процесами в печінці, які зазнали корекції ЗТП, вже через 2 тижні експерименту спостерігається значне підвищення рівнів прозапальних цитокінів та суттєве зниження вже на 28-у добу, свідчить про динамічну активність імунної відповіді на пошкоджуючий вплив з її активацією для мінімізації ушкодження клітин та більш швидкого гальмування вторинної альтерації із елімінацією пошкоджуючих факторів за короткий термін. За даними багатьох дослідників ЗТП містить високу концентрацію тромбоцитів, які є джерелом значної кількості цитокінів: епітеліального фактору росту з тромбоцитів, фактору росту фібробластів,

інсуліноподібного фактору росту, судинного ендотеліального фактору росту та ін., що сприяє клітинному росту та диференціюванню, утворенню та росту судин, синтезу колагену, проліферації фібробластів, тобто процесам неоангіогенезу та регенерації тканини печінки після токсичного ураження. Ймовірно індукування тромбоцитами міграції та адгезії стовбурових та прогеніторних клітин у ділянки ангіогенезу, сприяє стимулюванню проліферації та диференціації клітин у зрілі ендотеліальні попередники.

Наразі відомо, що збільшення вмісту ІЛ-2 в крові та тканині органу, що уражений, є характерним для запальних процесів травного тракту, але довготривала стимуляція патогенами, розвиток хронічного ураження призводить до пригнічення синтезу ІЛ-2, що свідчить про виснаження імунної відповіді. ІЛ-6 стимулює та регулює імунну відповідь та запальні процеси і, в певних випадках може мати як про- так і протизапальний вплив. Саме такою особливістю ІЛ-6 можна пояснити пригнічення його синтезу на 28-у добу експерименту у тварин з ХГ та ЦП – виснаження первинної імунної відповіді на ураження, з наступним підсиленням синтезу у відповідь на хронічний патологічний вплив, коли його вміст в крові щурів з ЦП становив 138,5 % від показника контрольної групи.

Узагальнюючи вищенаведені факти проведеного дослідження можна зазначити, що застосування ЗТП, незалежно від етіо-патогенетичних механізмів ураження печінки, ініціює репаративну регенерацію тканини печінки з відтворенням її нормальної мікроструктури. Місцеве введення ЗТП в паренхіму печінки формує комплексні системні зміни у стані імунної системи за рахунок пролонгованого динамічного впливу на рівень прозапальних цитокінів. Нормалізація імунної відповіді гальмує цитоліз гепатоцитів, через що відбувається часткове відтворення цитоархітекτονіки печінки, підвищуються показники її функціональної здібності та стабілізуються гематологічні показники. Тобто, біотехнологія, яка базується на застосуванні ЗТП, для корекції експериментального ХГ та ЦП, демонструє високу ефективність при використанні у вигляді ін'єкцій безпосередньо в орган, що уражений.

Ключові слова: експеримент; хронічний гепатит; цироз печінки; збагачена тромбоцитами плазма; патогенетичні зміни; корекція.

ABSTRACT

Romak O.I. Pathogenetic mechanisms of liver tissue regeneration under conditions of correction of experimentally induced chronic hepatitis and liver cirrhosis. - As manuscript.

Candidate of Medical Sciences dissertation in specialty 14.03.04 – pathological physiology – Odessa national medical university of the Health Care Ministry of Ukraine, Odessa, 2021.

Zaporizhia State Medical University of the Health Care Ministry of Ukraine, Zaporizhia, 2021.

In dissertation the mechanisms of morpho-functional state of the liver in the conditions of modeling of chronic hepatitis (CH) and liver cirrhosis (LC), as well as the effectiveness of correction of the detected changes by using platelet-rich plasma (PRP) were studied.

In accordance with the purpose and objectives of the study, the experiment was performed on 205 adult male rats, which were kept in standard conditions of the biological clinic (vivarium) of Odessa National Medical University.

Using pathophysiological (experimental modeling of CH, LC; PRP introduction), pathohistological, cultural (isolation of PRP from whole blood), hematological (hemogramma), biochemical, immunoenzyme (proinflammatory cytokines) and statistical methods revealed the dynamics of morphological changes, functional state of the liver under the conditions of administration of PRP, in modeling the pathology and after its correction.

CH was induced by the oral administration of an oil solution of tetrachloride carbohydrate (CCl₄) at a concentration of 50 % in a dose of 0.05 ml per day for 7-8 weeks. LC was induced by oral administration of an oil solution of CCl₄ at a concentration of 50 % in a dose of 0.05 ml per day and water substitution by ethil alcohol at a concentration of 10 % for 150 days. PRP was obtained by isolating it

from whole blood by centrifugation with sodium citrate on a SmartPrep apparatus (Harvester Corp., USA). All results were processed using conventional and biomedical studies of parametric and nonparametric methods of statistical analysis. The 1st day of the experiment was considered the day after the last injection of CCl₄ or PRP.

In animals of the control group, the structure of the liver, myocardium, kidneys had a normal appearance, general and biochemical blood tests - without features, the content of proinflammatory cytokines IL-2 was 16.7 pg / ml, IL-6 - 75, 3 pg / ml.

To testify the safety of various routes of administration of PRP two ways of administration were tested: "open", when under the conditions of medium laparotomy a lobulus of the liver was isolated, and "closed", in the precession of the lobe of the liver, advancing beyond the line of the costal arch. During 8 weeks of observation no significant changes in the morphology of the liver, myocardium, kidneys were found. Comparison of the indicators of the morphological state of the liver, myocardium, kidneys, and the content of all the substances studied and formed blood elements in the groups of animals after the introduction of the PRP by the "open" route, did not reveal any significant differences from the results of the group with the introduction of the "closed" way. Therefore, in the future we used the introduction of PRP by "closed" way, which is more convenient, easier to implement and less traumatic to animals.

Two weeks after the beginning of the experiment animals with simulated CH showed morphological signs of toxic hepatitis (fatty degeneration of a significant number of hepatocytes, lymphocytic infiltration of the portal tract and perisinusoidal spaces, moderate fibrosis, portal-septal septa). On the 28th day of observation, significant fatty dystrophy and focal necrosis of hepatocytes with lympho-macrophage infiltrates around them, as well as violations of the ordered beam structure of the liver lobes were detected. On the 56th day, there were signs of fatty degeneration of hepatocytes, intracellular cholestasis and biliostasis, hepatic beam dyscomplexation, fibrosis and dilation of the portal tract, as well as septal fibrosis in the lobes with the formation of small monolobular nodules surrounded by connective tissue.

On the background of a progressive picture of the inflammatory reaction, the content of proinflammatory cytokines IL-2 and IL-6 had a sinusoidal curve: sharply increased on the 14th day of the experiment, on the 28th day there was a significant decrease, and growth on the 56th day exclusively IL-6. This condition is generally consistent with the mechanisms of action of proinflammatory cytokines in inflammation, as it is manifested by a set of processes regulated by cytokines: increased blood supply to the affected organ, violation of its morphology and function - necrosis, hemorrhage, followed by the formation of excess collagen to replace.

All the observation period from the 14th to the 56th day, significant leukocytosis was detected in the blood of rats with HC on the background of a reduced number of lymphocytes and a gradual decrease in the number of erythrocytes. There was a steady increase in the activity of cytolysis enzymes and the content of total bilirubin, while the content of total protein decreased sharply and remained so until the end of the experiment.

In rats with simulated LC on the 14th day showed signs of significant fatty degeneration of hepatocytes and necrosis of some hepatocytes. On the 28th day, foci of necrosis and severe fatty degeneration of hepatocytes, moderate lymphohistiocytic infiltration of liver lobes were determined. On the 56th day, the liver had a brown color and a dull surface, in the lobes of the liver there were areas of centrilobular necrosis and severe fatty degeneration of hepatocytes, in many hepatocytes - intracellular cholestasis, significant biliostasis in small bile ducts, lympho-macrophagic infiltration, and the development of connective tissue in the lobes of the liver with the formation of fibrous septa and false lobes.

The progression of signs of liver damage in rats with LC was accompanied by fluctuations in the content of both studied cytokines with peak values on the 14th and 56th day and a decrease almost to the control group - on the 28th day.

In the blood of animals with LC there were clear signs of chronic severe inflammatory process: leukocytosis, lymphopenia, anemia, thrombocytopenia, a

sharp increase in the activity of cytolytic enzymes and total bilirubin, inhibition of protein-synthesizing function of the liver.

Experimental treatment of rats with simulated CH administration of PRP led to a gradual activation of the regeneration process in the liver with inhibition of excessive activation of the immune response. On the 14th day after the introduction of PRP in the periportal areas of the liver appeared small ducts of the so-called reparative "ductular reaction" and a significant number of binuclear hepatocytes in the liver lobes, which can be considered a significant indicator of activation of reparative regeneration. It should be noted that parallel to the recovery process there were pathological changes in the liver parenchyma, characterized by the presence of individual hepatocytes in a state of fatty degeneration. Blood leukocytosis, lymphocytopenia, moderate erythrocytopenia, increased activity of cytolysis enzymes, total bilirubin and decreased total protein were detected in the blood. It should be noted that despite the positive histological changes, the content of proinflammatory cytokines was significantly increased compared to the control, and almost did not differ from those of animals with HCG. This situation corresponds to the data obtained by other researchers under the conditions of a long process of inflammation in the gastrointestinal tract, as well as the idea of biological properties.

In the subsequent follow-up from the 28th to the 56th day after the use of PRP in case of CH, a positive effect of corrective therapy on the inflammatory process was revealed, which was manifested by a significant reduction in signs of inflammation: histologically in the liver there were isolated foci of minor lymphocytic infiltration, in the blood there was a normalization of the content of pro-inflammatory cytokines and a decrease in the level of leukocytes, there was a significant decrease in the activity of cytolysis enzymes and total bilirubin. It should be noted the restorative effect of PRP on protein-synthesizing liver function and anemic syndrome. In general, one can say that the signs of significant liver alteration, which were observed in chronic hepatitis without correction, after the use of PRP gradually replaced by signs of reparative regeneration, when the activity of proinflammatory cytokines lasts for some time, but the receipt of PRP endothelial vascular growth factor, insulin-like

growth factor, fibroblast growth factor, platelet growth factor contribute to the harmonization of the stages of tissue reproduction after the lesion.

In the second model of pathology of liver cirrhosis on the 14th day after the introduction of PRP histologically in the liver showed signs of fibrosis and dilation of the portal tract with their significant lymphohistiocytic infiltration, as well as the phenomenon of periportal fibrosis. Compared with the uncorrected group, the blood leukocyte content was almost 60 % lower and the lymphocyte count was 30.8 % higher ($p<0.05$). The activity of cytolysis enzymes and the content of total bilirubin were significantly lower, and the content of total protein was 90 % higher than the value of the group with LC without correction ($p<0.05$). 28 days after the introduction of PRP in the liver persisted the phenomena of portal-periportal fibrosis and uneven vascular blood supply. The number of indicators of the inflammatory process and cytolysis activity relative to the group continued to decrease in the blood without correction. On the 56th day, active hepatocyte proliferation was detected in the liver, the beam structure of the organ was restored, and moderate lymphohistiocytic infiltration of the portal tracts was observed. Manifestations of inflammation and anemia were gradually inhibited, while the activity of ALT decreased by 40 %, the content of total protein increased by 34 % compared to the previous study period ($p<0.05$). After correction of LC from the 28th day, the content of IL-2 began to decrease compared with the group without correction, almost reaching the level of the control group on the 56th day; the content of IL-6 on the 14th day decreased by 11.5 % compared with the group without correction ($p<0.05$), and from the 28th day until the end of the experiment remained consistently lower than the control group.

The fact that in animals with chronic inflammatory processes in the liver, which underwent correction of PRP, after 2 weeks of the experiment there is a significant increase in proinflammatory cytokines and a significant decrease on the 28th day, indicates a dynamic immune response to the damaging effects of its activation to minimize cell damage and faster inhibition of secondary alteration with elimination of damaging factors in the short term. According to many researchers,

PRP contains a high concentration of platelets, which are a source of significant amounts of cytokines: epithelial platelet growth factor, fibroblast growth factor, insulin-like growth factor, vascular endothelial growth factor and others, it promotes cell growth and differentiation, vessel formation and growth, collagen synthesis, fibroblast proliferation, ie the processes of neoangiogenesis and regeneration of liver tissue after toxic lesions. Platelet-induced migration and adhesion of stem and progenitor cells to sites of angiogenesis is likely to stimulate cell proliferation and differentiation into mature endothelial progenitors.

Nowadays it is known that an increase in IL-2 in the blood and tissue of the affected organ is characteristic of inflammatory processes of the digestive tract, but long-term stimulation by pathogens, the development of chronic lesions leads to suppression of IL-2 synthesis, indicating depletion of immune response. IL-6 stimulates and regulates the immune response and inflammatory processes and, in some cases, may have both pro- and anti-inflammatory effects. This feature of IL-6 can explain the inhibition of its synthesis on the 28th day of the experiment in animals with CH and LC - depletion of the primary immune response to the lesion, followed by increased synthesis in response to chronic pathological effects, when its content in the blood of rats with LC was 138.5 % of the control group.

Summarizing the above facts of the study, it can be noted that the use of PRP, regardless of the etio-pathogenetic mechanisms of liver damage, initiates reparative regeneration of liver tissue with the reproduction of its normal microstructure. Local introduction of PRP into the liver parenchyma forms complex systemic changes in the state of the immune system due to prolonged dynamic effects on the level of pro-inflammatory cytokines. Normalization of the immune response inhibits the cytolysis of hepatocytes, due to which there is a partial reproduction of the cytoarchitectonics of the liver, increases its functional capacity and stabilizes hematological parameters. That is, biotechnology based on the use of PRP to correct experimental CH and LC shows high efficacy when used directly by injection directly into the affected organ.

Key words: *experiment; chronic hepatitis; liver cirrhosis; platelet-rich plasma; pathogenetic changes; correction.*

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kholodkova O.L., Romak O.I. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. *Deutscher Wissenschaftsherold*. 2016. N2. P.56-59 (Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував статтю до друку).
2. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Горчаг Д.М., Ромак О.І. Морфофункціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип.4, Т.2(140). С.156-159 (Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, брав участь у сформулюванні висновків, підготував статтю до друку).
3. Romak O.I., Sadovska Yu., Goriuk I. Liver morpho-functional changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017. N7(3). P. 690-699 (Здобувач приймав участь у наборі матеріалу та описанні отриманих результатів, підготував статтю до друку).
4. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Цироз печінки – коли змінити антифіброзну парадигму на ангіогенну? (Огляд літератури та власних досліджень). *Одеський медичний журнал*. 2017. №6. С.22-26 (Здобувач провів літературний пошук, підготував статтю до друку).
5. Аппельханс О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І., Полукарова Л.А. Збагачена тромбоцитами плазма, як шанс на одужання для хворого з цирозом печінки. *Інтегративна антропология*. 2019. №1. С.22-25 (Здобувач здійснив літературний пошук, брав участь в обговоренні результатів).
6. Influence of platelet-enriched plasma on the morpho-functional state of liver in rats with induced non-alcoholic steatohepatitis and dyslipidemia / O. Appelhans, I. Maznichenko, O. Kasatkin, Hussein Abdulla, M Biriuk., O. Romak. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. N10(6). P.455-464 (Здобувач брав участь у проведенні експерименту, підготував тези до друку).

7. Вплив чотирихлористого вуглецю на стан нирок при моделюванні експериментального гепатиту / Ю.О. Садовська, І.А. Горюк, Д.П. Терновий, К.О. Смірнова, О.І. Ромак. Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів) : наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Одеса, 22-24 квітн. 2015 р. Одеса, 2015. С.49. *(Здобувач брав участь у наборі матеріалу, підготував тези до друку).*

8. Морфологічна характеристика патологічних змін у печінці за умов корекції експериментального цирозу різними способами / Д.П. Терновий, Ю.О. Садовська, І.А. Горюк, Є.О. Смірнова, О.І. Ромак. Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів) : наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Одеса, 27-28 квітн. 2017 р. Одеса, 2017. С.24. *(Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, узагальнив результати, підготував тези до друку).*

9. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Теоретичне та експериментальне обґрунтування можливостей патогенетичної терапії фіброзу печінки. Прикладні аспекти морфології, присвячена пам'яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П. : наук.-практ. конф., м. Вінниця, 21-22 вересн. 2017 р. Вінниця, 2017. С.163. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку).*

10. Холодкова О.Л., Ромак О.І., Перепелюк М.М., Кожухаренко Т.І. Структурно-функціональні перетворення печінки за умов експериментального токсичного гепатиту та цирозу. Взаємодія лікаря загальної практики та лікаря-спеціаліста в лікуванні поліморбідного пацієнта : наук.-практ. конф., м. Одеса, 26 квітн. 2017 р. Одеса, 2017. С.94-96. *(Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку).*

11. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Ефекти збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальній терапії цирозу печінки. Актуальні досягнення медичних досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя : зб. тез наук. робіт уч. міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 5-6

жовтн. 2018 р. Київ, 2018. С.5-6. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку).*

12. Холодкова О.Л., Ромак О.І., Кожухаренко Т.І. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі : інформ. лист (№ 347-2018). Київ, 2018. 6 с. *(Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, приймав участь в опрацюванні результатів).*

13. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі: пат. 101004 Україна: МПК А61Р 1/16, А61К 35/407. № 201500473; заявл. 06.04.2015; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

14. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі: пат. 111669 Україна: МПК G09В 23/28. №201500877; заявл. 06.04.2015; опубл. 25.05.2015, Бюл. № 10. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

15. Спосіб діагностики стадії токсичного гепатиту в експерименті: пат. 123945 Україна: МПК G09В 23/28. №201710440; заявл. 30.10.2017; опубл. 12.03.2018, Бюл. № 5. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

ЗМІСТ

	ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	21
	ВСТУП	23
РОЗДІЛ 1	МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ЗА УМОВ ВПЛИВУ ЗОВНІШНІХ ЧИННИКІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	30
1.1	Патогенетичні шляхи формування фіброзу за умов ураження печінки різної етіології	30
1.2	Механізми регенерації печінки	35
1.3	Фізіологічні передумови використання тромбоцитів	45
РОЗДІЛ 2	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	50
2.1	Характеристика експериментальних тварин	50
2.2	Відпрацювання різних способів введення збагаченої тромбоцитами плазми	51
2.2.1	Спосіб введення збагаченої тромбоцитами плазми в процесі присередньоверхньої лапаротомії	52
2.2.2	Спосіб пункційного введення збагаченої тромбоцитами плазми	53
2.3	Методика отримання збагаченої тромбоцитами плазми	53
2.4	Патогістологічні методи дослідження тканин печінки, серця, нирок	54
2.5	Дослідження елементного та біохімічного складу крові щурів досліджуваних груп	55
2.6	Дослідження рівня цитокінів у плазмі крові щурів досліджуваних груп	58
2.7	Методи статистичної обробки інформації	58
РОЗДІЛ 3	З'ЯСУВАННЯ ВПЛИВУ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ НА СТАН ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ТА ПРОЗАПАЛЬНУ ЛАНКУ СИСТЕМИ	61

ЦИТОКІНІВ ЗДОРОВИХ ТВАРИН

3.1	Характеристика морфо-функціонального стану печінки, внутрішніх органів, загального та біохімічного складу крові, прозапальної ланки системи цитокінів контрольної групи тварин	61
3.1.1	Морфофункціональний стан печінки та прозапальної ланки системи цитокінів у контрольних щурів	61
3.1.2	Патоморфологічне дослідження внутрішніх органів, загального та біохімічного складу крові контрольних щурів	62
3.2	Експериментальна перевірка безпеки застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів	65
3.2.1	Морфо-функціональний стан внутрішніх органів, загального та біохімічного складу крові, стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим» шляхом	65
3.2.2	Морфо-функціональний стан внутрішніх органів, елементного та біохімічного складу крові, стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми «закритим» шляхом	72
РОЗДІЛ 4	ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ ТА ПРОЗАПАЛЬНОЇ ЛАНКИ СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ	81
4.1	Морфо-функціональний стан печінки щурів за умов моделювання хронічного гепатиту	81
4.1.1	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту на 14-у добу експерименту	81
4.1.2	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання	84

	хронічного гепатиту на 28-у добу експерименту	
4.1.3	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту на 56-у добу експерименту	86
4.2	Характеристика стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання хронічного гепатиту	88
4.3	Морфо-функціональний стан печінки щурів за умов моделювання цирозу печінки	89
4.3.1	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 14-у добу експерименту	90
4.3.2	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 28-у добу експерименту	93
4.3.3	Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 56-у добу експерименту	95
4.4	Характеристика стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання цирозу	96
РОЗДІЛ 5	КОРЕКЦІЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ	98
5.1	Ефективність корекції хронічного токсичного гепатиту	98
5.1.1	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 14-у добу експерименту	98
5.1.2	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 28-у добу експерименту	103
5.1.3	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 56-у добу	105

	експерименту	
5.2	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою	108
5.2.1	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 14-у добу експерименту	108
5.2.2	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 28-у добу експерименту	112
5.2.3	Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 56-у добу експерименту	114
РОЗДІЛ 6	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	117
	ВИСНОВКИ	133
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	136
	ДОДАТОК А АКТИ ВПРОВАДЖЕННЯ	168
	ДОДАТОК Б СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ	174
	ДОДАТОК В ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ	178

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ
ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- ЗТП – збагачена тромбоцитами плазма;
ФП – фіброз печінки;
ЦП – цироз печінки;
СЕП – синусоїдальні епітеліоцити печінки;
ЗКП – зірчасті клітини печінки;
ВГВ – вірусний гепатит С;
ВГС – вірусний гепатит С;
ІЛ (IL) – інтерлейкін;
ФНП (TNF) – фактор некрозу пухлини;
ТФР (TGF) – трансформуючий фактор росту;
ІФН (IFN) – інтерферон;
ЕМП – епітеліо-мезенхімальні перетворення;
ММП – матриксна металопротеїназа;
ТІММП – тканинний інгібітор матриксної металопротеїнази;
ІПФР (IGF) – інсуліноподібний фактор росту;
ФРГ (HGF) – фактор росту гепатоцитів;
ФРТ (PDGF) – фактор росту з тромбоцитів;
ФРФ (FGF) – фактор росту фібробластів;
СЕФР (VEGF) – судинний ендотеліальний фактор росту;
ЕФР (EGF) – ендотеліальний фактор росту;
АлАТ – аланінамінотрансфераза;
АсАТ – аспартатамінотрансфераза;
NO – оксид азоту;
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;
АОС – антиоксидантна система;
МДА – малоновий діальдегід;
СОД – супероксиддисмутаза;

ХГ – хронічний гепатит;

СК – стовбурові клітини;

СМФ (SMA) – стимульовані міофібробласти (smooth muscle actin);

ФАТ (PAF) – фактор активації тромбоцитів, platelet-activating factor;

ШКТ – шлунково-кишковий тракт;

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Печінка є центральним органом, що бере участь у контролі обміну речовин в організмі, обумовлюючи її значення в якості основного органу гомеостазу у ссавців. Пошук нових стратегій корекції уражень печінки обумовлений неухильним зростанням захворюваності на гепатити та цироз серед працездатного населення, що є важливою медико-соціальною проблемою [1-2]. Серед всіх паренхіматозних органів у ссавців тільки печінка має виразні регенеративні властивості. Диференційовані гепатоцити можуть повертатися на початок клітинного циклу у відповідь на пошкодження та ділитись допоки маса печінки не відтвориться [3]. Низька ефективність адаптаційних можливостей організму до сучасних хвороботворних чинників є основною причиною відносної ефективності комплексної терапії уражень печінки [4].

Відомо, що 350-400 млн людей у світі хворіють на вірусний гепатити В (ВГВ), це спричинює щорічно 1 млн смертей внаслідок цирозу, печінкової недостатності та гепатоцелюлярної карциноми, що розвиваються з часом [5]. Частота прогресування в цироз з високим ризиком гепатоцелюлярного раку складає 10-20 % [6].

В останні роки з'явилося багато публікацій, в яких описано можливі механізми відновлення та реваскуляризації тканин, в тому числі й печінкової при цирозі [7-10]. Багато уваги при цьому приділяється вивченню застосування стовбурових, прогеніторних клітин та їх активаторів – цитокинів [11-13].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні хронічного гепатиту відіграє активація процесів перекисного окиснення ліпідів, що призводить до безпосереднього токсичного впливу на мембрани гепатоцитів [14].

У пацієнтів з різноманітною патологією печінки спостерігається підвищення рівня ІЛ-10 сироватки та печінки [15], що може мати важливе значення не тільки для зниження активності запального процесу, але й для

організації надзвичайно активного процесу регенерації печінки, що його стимулювала запальна відповідь, без пухлинної трансформації.

Незважаючи на певні етіологічні та клінічні відмінності, в більшості хронічних фіброзних розладів є постійний подразник, який підтримує продукцію факторів росту, протеолітичних ферментів, факторів ангіогенезу та фіброгенних цитокінів, що разом стимулюють відкладення елементів сполучної тканини з наступною перебудовою й знищенням нормальної архітекτονіки органу [16].

На початку 2000-х суттєво зріс інтерес провідних фахівців світової регенеративної медицини до тромбоцитів, які не мають ядра та містять велику кількість біологічно активних субстанцій, що беруть участь у низці процесів обміну регуляції: білків, про- та протизапальних цитокінів, факторів росту [17], їх легко отримати у вигляді аутологічної суміші, що дозволяє використовувати їх без напруги системи імунного захисту. Доведена активна участь тромбоцитів у процесі регенерації печінки [18-19]. Так, тромбоцити продукують ІЛ-6, судинний ендотеліальний фактор росту, інсуліноподібний фактор росту та взаємодіють з клітинами Купфера, що стимулює проліферацію гепатоцитів [20 - 22]. Більш того, експериментально було доведено, що збагачена тромбоцитами плазма (ЗТП) підсилює рост судин та стимулює прогеніторні клітини ендотеліоцитів, результатом чого стає утворення судиноподібних структур [23].

З метою використання фізіологічних властивостей тромбоцитів при патологічних процесах були розроблені методи отримання збагаченої тромбоцитами плазми [24]. Дослідження зразків збагаченої тромбоцитами плазми виявило наявність у великій концентрації таких ангіогенних факторів, як судинний ендотеліальний фактор росту, тромбоцитарний фактор росту ВВ, ендотеліальний фактор росту та основний фактор росту фіброblastів [25], при чому їхній вміст в ЗТП майже у 8 разів вищий за цей показник у нативній крові [26].

Проте залишається нез'ясована ціла низка питань. Не визначено, які біологічні ефекти на паренхіму печінки та прозапальні цитокіни переважають у

здорових тварин після введення ЗТП? Чи залишаються позитивні прояви після введення ЗТП за умов індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки? Чи існують патогенетичні особливості стану системи цитокінів та спрямованості перебігу фіброзного процесу в печінці після введення ЗТП при різних експериментальних патологіях (хронічний гепатит та цироз печінки)?

Отримання відповідей на підняті питання дозволять розширити розуміння механізмів впливу ЗТП на репаративно-проліферативні процеси в печінковій тканині, дадуть можливість встановити ключові діагностичні маркери цитокінового профілю, гістологічних змін паренхіми печінки, гематологічних та біохімічних параметрів на різних стадіях експериментального хронічного запального процесу в печінці.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана згідно з планом науково-дослідницьких робіт Одеського національного медичного університету і є фрагментом НДР: «Біологічні ефекти збагаченої тромбоцитами плазми за фізіологічних умов та при експериментальному індуванні патологічного процесу» (№ держреєстрації 0111U010172), яка виконувалася на кафедрі анатомії людини в 2012-2016 рр., та «Розробити та обґрунтувати способи корекції фіброзних змін печінки при хронічному гепатиті та цирозі печінки» (№ держреєстрації 0116U008927), яка виконувалася на кафедрі анатомії людини в 2017-2019 рр. Дисертант був співвиконавцем даних робіт.

Мета дослідження. Дослідити особливості морфо-функціонального стану паренхіми печінки при експериментальному хронічному гепатиті та цирозі печінки, патогенетично обґрунтувати ефективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми при сформованій патології.

Завдання дослідження:

1. Встановити патогенетичні особливості морфо-функціонального стану печінки та прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання хронічного гепатиту.

2. Дослідити патогенетичні особливості морфо-функціонального стану печінки та прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання цирозу печінки.

3. Визначити характер змін морфо-функціонального стану печінки, серця, нирок та прозапальної ланки системи цитокінів експериментальних тварин за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми різними шляхами.

4. Патогенетично обґрунтувати можливості корекції експериментального хронічного гепатиту та цирозу печінки за допомогою збагаченої тромбоцитами плазми.

5. Експериментально довести ефективність застосування збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальному хронічному гепатиті та цирозі печінки.

Об'єкт дослідження – морфо-функціональний стан паренхіми печінки та рівень прозапальних цитокінів за умов хронічного гепатиту та цирозу

Предмет дослідження – показники, які характеризують характер фіброзу паренхіми печінки (стадія поширеності фіброзу), прозапальні цитокіни (ІЛ-2 та ІЛ-6), гематологічні (вміст формених елементів крові, гемоглобіну) та біохімічні (активність АлАТ, АсАТ, вміст загального білірубіну та загального білку) параметри за умов експериментально індукованого хронічного гепатиту і цирозу печінки та після корекції цих станів ЗТП.

Методи дослідження – патофізіологічний (експериментальне моделювання хронічного гепатиту та цирозу печінки; введення ЗТП); патогістологічний; культуральний (отримання ЗТП шляхом виділення із цільної крові); гематологічний (гемограма); біохімічний; імуноферментний (вміст цитокінів); статистичний аналіз результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Отримані нові дані щодо ефективності застосування збагаченої тромбоцитами плазми ефект якої реалізується за рахунок стимуляції адаптаційно-приспосувальних процесів для корекції морфо-функціональних змін печінки, які виникають при хронічному гепатиті та цирозі. Досліджено морфо-функціональний стан печінки, міокарду,

нирок та прозапальної ланки системи цитокінів здорових тварин при введенні збагаченої тромбоцитами плазми, та доведено відсутність її можливого негативного впливу.

З'ясовано, що вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-2 та ІЛ-6) протягом формування експериментальних патологій печінки суттєво відрізняється. Вперше визначено, що в динаміці перебігу експериментального хронічного гепатиту відбувається стале зростання вмісту ІЛ-2, одночасно, вміст ІЛ-6 формує синусоїдальну динаміку: високі значення на 14-у добу знижуються на 28-у, та знов зростають на 56-у. За умов цирозу печінки вміст прозапальних цитокінів показує односпрямовані коливання та характеризується піковими значеннями на 14-у та 56-у добу спостережень.

Вперше доведено, що введення ЗТП на тлі хронічного гепатиту вже на 14-у добу сприяє новоутворенню гемо- та жовчних капілярів в портальних трактах та появі значної кількості двоядерних гепатоцитів. З 28-ї до 56-ї доби позитивний вплив коригуючої терапії на перебіг запального процесу проявляється достовірним зменшенням ознак запалення, нормалізацією вмісту прозапальних цитокінів, відновленню білок-синтезуючої функції печінки та рівня лейкоцитів, суттєвим зниженням активності ферментів цитолізу та загального білірубіну, усуненням анемічного синдрому.

Експериментальне лікування щурів з модельованим ЦП вперше показало, що введення ЗТП сприяє поступовій активації в печінці регенеративних процесів і гальмуванню надмірної активації імунної відповіді. Вже на 14-у добу після введення ЗТП в перипортальних зонах печінки з'являються дрібні протоки так званої репаративної «дуктулярної реакції» та значна кількість двоядерних гепатоцитів в печінкових часточках; з 28-ї до 56-ї доби у печінці виявляються вогнища незначної лімфоцитарної інфільтрації портальних трактів та перисинусоїдальних просторів, в крові нормалізується вміст прозапальних цитокінів та кількість лейкоцитів; знижуються активності ферментів цитолізу та рівень загального білірубіну.

Практичне значення одержаних результатів. На підставі проведених патогістологічних, біохімічних та імунологічних досліджень розроблений і впроваджений в теоретичну та експериментальну медицину спосіб діагностики стадії токсичного гепатиту в експерименті, а також метод корекції модельованого цирозу печінки у щурів за допомогою збагаченої тромбоцитами плазми. Відпрацьовано «відкритий» (лапаротомічний) та «закритий» (пункційний) способи введення ЗТП у тканину печінки. Патогенетично обґрунтована ефективність і відпрацьована методика застосування збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальному ХГ та ЦП.

Нові матеріали дисертації впроваджені в навчальний процес на кафедрі патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, кафедри патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського, кафедри загальної та клінічної патофізіології ім. Д.О. Альперна Харківського національного медичного університету, кафедри патологічної фізіології Запорізького державного медичного університету, кафедри анатомії людини ім. М.Г. Туркевича ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», патолого-анатомічного відділення Університетської клініки Одеського національного медичного університету.

Особистий внесок дисертанта. Дисертація є самостійною науковою працею автора, внесок якого є основним у виборі мети і завдань, об'єму і методів дослідження, проведенні патентно-інформаційного пошуку за темою досліджень. Автором особисто здійснено планування роботи, виконано весь обсяг експериментальних досліджень, пов'язаних з відтворенням моделей хронічного гепатиту та цирозу печінки, проведено патогістологічні, гематологічні, біохімічні та імуноферментні дослідження. Здобувач зробив науковий аналіз, обговорення отриманих результатів, сформулював основні положення та висновки. Автор самостійно проводив статистичну обробку отриманих результатів досліджень. В опублікованих в співавторстві з науковим керівником і колегами роботах автору належать основні ідеї та розробки

стосовно проведення експерименту, гістологічних досліджень, оформлення та написання статей і тез.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на: науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 85-річчю з дня заснування Студентського наукового товариства ОНМедУ «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (для молодих вчених та студентів) (Одеса, 2015); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченої 100-річчю з дня народження І.Г.Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (для молодих вчених та студентів) (Одеса, 2017); науково-практичній конференції «Взаємодія лікаря загальної практики та лікаря-спеціаліста в лікуванні поліморбідного пацієнта» (Одеса, 2017); науково-практичній конференції «Прикладні аспекти морфології», присвячена пам'яті професорів-морфологів Терентьєва В.Г., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П. (Вінниця, 2017); міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні досягнення медичних досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя» (Київ, 2018).

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 15 наукових праць: 3 статті у наукових фахових виданнях України, 3 статті – у закордонних виданнях, 5 тез у матеріалах конференцій, отримано 2 патенти на корисну модель (№123945 та № 101004), 1 патент на винахід (№111669) та 1 інформаційний лист МОЗ України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 178 сторінках комп'ютерного тексту й складається з анотацій, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень (3 розділи), аналізу та обговорення результатів дослідження, висновків, списку використаних джерел та додатків. Дисертація ілюстрована 38 рисунками та 21 таблицями. Перелік використаних джерел містить 263 найменування (42 кирилицею та 221 латиницею).

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ
МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ПЕЧІНКИ ЛЮДЕЙ ТА ТВАРИН
ЗА УМОВ ВПЛИВУ ЗОВНІШНІХ ЧИННИКІВ

Печінка є життєнеобхідним органом, що забезпечує процеси метаболізму, зберігання та виділення продуктів травлення. Майже 80 % об'єму печінки посідають гепатоцити, а серед 20 %, що залишилися, знаходяться фагоцитарні клітини Купфера, синусоїдальні ендотеліоцити печінки (СЕП), зірчасті клітини печінки та лімфоцити [27].

Серед всіх паренхіматозних органів у ссавців тільки печінка має виразні регенеративні властивості. Диференційовані гепатоцити можуть повертатися на початок клітинного циклу у відповідь на пошкодження та ділитись допоки маса печінки не відтвориться [1, 28]. Такий високий регенеративний потенціал органу яскраво демонструє застосування найбільш розповсюдженої експериментальної моделі для вивчення регенеративних здібностей печінки – гепатектомія 2/3 органу. Після операції гепатоцити починають проліферацію першими серед всіх клітин органу, коли відбувається синтез ДНК та початок клітинного поділу. Максимальної інтенсивності цей процес набуває в період від 36 до 42 годин після операції. Повне відтворення маси печінки настає на 7-10-й день у хребцевих та на 3-4-й місяць у людей [15, 29].

1.1 Патогенетичні шляхи формування фіброзу за умов ураження печінки різної етіології

Хронічні захворювання печінки, зокрема гепатит та цироз, багато десятиріч залишається важливою медико-соціальною проблемою. Захворюваність на гепатити різної етіології невпинно зростає в країнах Старого Світу та Америки [30-33]. Наслідком хронічного запального процесу в печінці зазвичай стає фіброз, що змінює будову органу та припиняє його нормальне функціонування [1-2]. Також ХГ часто поєднується із запальними процесами у

жовчному міхурі, жовчновивідних шляхах та розвитком метаболічного синдрому [32]. Така ситуація зумовлює обмеження працездатності, збільшення витрат на амбулаторне лікування та утримання в лікарнях, а також підвищення кількості людей з інвалідністю. До найбільш розповсюджених чинників, що уражують тканину печінки, відносяться: віруси, алкоголь, ліки та обструкція жовчних проток. Внаслідок патологічного впливу виникає гостре або хронічне ураження печінки. Інколи гострий гепатит передує хронічному, часто розвиток хронічної патології протікає без симптомів протягом тривалого часу, в деяких випадках хронізація процесу призводить до виникнення цирозу [33].

У світі захворюваність на вірусний гепатит С (ВГС) становить більше 180 млн. [34]. ВГС є провідною причиною розвитку хронічного гепатиту, цирозу печінки та ін. у розвинених країнах. Серед 6 основних генотипів ВГС у Європи найпоширенішим є перший тип [35-36]. Пошкодження гепатоцитів, що прогресує, призводить до активного фіброзування тканини печінки, внаслідок чого розвивається цироз та печінкова недостатність [37-38]. При цьому, основою розвитку захворювання є хронічне запалення [37]. У 70-80 % пацієнтів, інфікованих ВГС спостерігається хронічний гепатит з наступною трансформацією у 35-40 % хворих в цироз печінки, частина хворих мають в результаті гепатоцелюлярну карциному [37, 39].

Крім печінки при ВГС потірають судини, суглоби, внутрішні органи з розвитком васкулітів, нефропатій, цукрового діабету, артрози та нейро-психічні розлади [37, 40-41].

Відомо, що 350-400 млн людей у світі хворіють на вірусний гепатити В (ВГВ), це спричинює щорічно 1 млн смертей внаслідок цирозу, печінкової недостатності та гепатоцелюлярної карциноми, що розвиваються з часом [42]. Частота прогресування в цироз з високим ризиком гепатоцелюлярного раку складає 10-20 % [30, 43].

У незначній кількості хворих на хронічні вірусні гепатити хвороба може протікати майже безсимптомно, у них спостерігається низька активність патологічного процесу та відсутність фіброзування [44].

Надмірне вживання алкоголю являється однією з провідних причин смертності серед людей молодого віку, оскільки доведене існування прямого зв'язку з розвитком алкогольної хвороби печінки [45]. Ризик виникнення цирозу печінки зростає, якщо людина вживає 30 г алкоголю на день і є найвищим при вживанні більше, ніж 120 г на день. Хронічне вживання алкоголю спричинює також різні види розладів стану печінки: від виникнення стеатозу, коли гепатоцити накопичують мікроезівули тригліцеридів, до фіброзу та цирозу. Також до чинників розвитку цирозу відносять вік старіше за 60 років, генотип вірусу та коінфекування іншими вірусами [31, 46-47].

При пошкодженні печінки лікарськими засобами та після хірургічних втручань захворюваність та смертність зростають [39, 48].

Одним з розповсюджених патологічних станів печінки являється неалкогольний стеатогепатит [49-52]. Його поширеність серед дорослого населення різних країн складає в середньому 23 % [33]. Прогресуванню хвороби сприяє ожиріння, наявність цукрового діабету 2 типу, старечій вік [32, 33]. У 27 % хворих на неалкогольний стеатогепатит протягом 9-10 років розвивається фіброз, у 19 % - цироз печінки [37]. У мешканців регіонів з високим забрудненням ксенобіотиками виявляються порушення структури печінки, які спричинюють хронічні гепатити [53-54].

Важливу роль у розвитку та прогресуванні хронічного гепатиту відіграє активація процесів перекисного окиснення ліпідів, що призводить до безпосереднього токсичного впливу на мембрани гепатоцитів [55]. В більшості випадків активація перекисного окиснення ліпідів супроводжується зниженням активності антиоксидантної системи [14]. Оксидативний стрес, який виникає, спричинює подальше прогресування хронічного ураження печінки [38, 49, 55, 56].

Наявність хронічної патології гепатобіліарної системи, ожиріння з потенційним розвитком метаболічного синдрому оказують негативний вплив на мікроструктуру печінки [37, 41, 57].

В останні роки дослідники виявили певний зв'язок між прогнозуванням протікання хронічних гепатитів вірусної та не вірусної етіології з несприятливими формами генетичних поліморфізмів [35-36, 46, 48, 58]. З'ясовано, що існують десятки генів, чия активність порушується під впливом гепатотоксичних сполук, що можливо стає одним з провідних чинників прогресування хвороб печінки [48]. Крім того, у чоловіків з цирозом печінки наявність Т-алеля ендотеліальної синтази оксиду азоту поєднується із зростанням індексу маси міокарду лівого шлуночка [47].

Цитокіни являються біологічно активними речовинами, що їх виробляють різноманітні неспеціалізовані типи клітин організму [5]. Цитокіни мають широкий спектр дії і, в залежності від умов, стимулюють або пригнічують проліферацію, диференціацію, апоптоз клітин, процеси запалення, регенерації та ін. [59-63]. Цитокіни продукуються активованими клітинами, як відповідь на подразнення. У процесах синтезу цитокінів можуть брати участь фібробласти, лімфоцити, моноцити, клітини ендотелію та ін. [64-66].

Сукупність цитокінів імунної системи формує «каскад реалізації цитокінів»: антигенна стимуляція призводить до секреції цитокінів «першого покоління» – ФНП- α , ІЛ-1 β та -6, які індукують біосинтез центрального регуляторного цитокіну ІЛ-2, а також ІЛ-3, ІЛ-4, ІЛ-5, γ -інтерферону (цитокіни «другого покоління») [67-68]. Цитокіни забезпечують передачу сигналів та взаємний обмін інформацією як в межах одного органу, так між різними органами [69-70].

Серед цитокінів є фактори росту, інтерлейкіни, інтерферони, хемокіни, фактори некрозу пухлин (TNF), трансформуючі фактори росту (TGF), колоніє-стимулювальні фактори та ін. [71-73]. Виділяють також прозапальні: ІЛ-1 β , ІЛ-2, ІД-6, ІЛ-8, γ -ІФН, ФНП- α та протизапальні цитокіни: ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13 [70, 73].

Основна функція цитокінів – активація клітин-мішеней [73]. Звичайно, в більшості тканин продукція цитокінів не виявляється, але їх вміст значно зростає за умов патологічного процесу [73-75].

Цитокіни розглядають як перспективні лікувальні засоби, що їх використовують для протипухлинної дії (ІЛ-2), стимуляції гемопоезу (Гр-КСФ), лікування atopічних станів (γ -ІФН) [76, 77]. Так, перебіг хронічного запалення в печінці характеризується активацією клітин Купфера, які починають виділення прозапальних цитокінів ФНП α та ІЛ-6, а також інсуліноподібний фактор росту 1 та ін. [78-79], і являється проліферативним за своєю суттю. Протягом часу відбуваються послідовні реакції альтерації та судинних змін, вторинної альтерації з наступною проліферацією. Той факт, що наприкінці запалення найбільш суттєву роль відіграють фіброласти та ендотеліоцити, є ключовим при некерованій регенерації печінки, коли результатом відтворення гепатоцитів, що загинули, та порушення архітекtonіки органу стає формування фіброзних тяжів [78].

Було доведено, що після часткової гепатектомії СЕП продукують ІЛ-6 та фактор росту гепатоцитів, тоді як активовані ЗКП, головним чином, виділяють ФРГ [78, 80].

Регенерація печінки відбувається багатьма механізмами із залученням цитокінів, гормонів та факторів росту [1, 5-9, 15, 18-22, 27, 28, 53, 80-85]. Добре відома роль прозапальних цитокінів TNF- α та ІЛ-6, що відповідають за початок та підтримку імунної відповіді, тобто, ініціюють регенерацію на початковій фазі [27, 28, 82-84]. Доведено, що часткова гепатектомія призводить до зниження здатності печінки до детоксикації ендотоксину, внаслідок чого його рівень зростає [29, 86-87], викликаючи стимуляцію клітин Купфера для синтезу TNF- α та ІЛ-6 [29], що ініціюють регенерацію органу [28, 79, 82-83, 87]. TNF- α спрямовує сигнальні молекули NF- κ B на стимуляцію гепатоцитів шляхом впливу на ІЛ-6 [88]. ІЛ-6 приєднується до свого рецептору на гепатоцитах, активує STAT3 і підтримує виживання та проліферацію гепатоцитів [87-89].

Таким чином, зрозуміло, що активна запальна відповідь та потужне виділення цитокінів триває, як мінімум, перші 24 години після операції для переведення гепатоцитів в активну фазу клітинного циклу.

Але, процеси регенерації печінки знаходяться не тільки під впливом прозапальних цитокінів. Відомо, що протизапальний цитокін ІЛ-10 селективно блокує експресію прозапальних генів в мієлоїдних клітинах, в тому числі в макрофагах та нейтрофілах, що були активовані дією ендотоксину [90]. ІЛ-10 починає функціонувати після зв'язування з рецепторами ІЛ-10R1 та ІЛ-10R2 внаслідок активації STAT3 в мієлоїдних клітинах. Виключення STAT3 призводить до підсилення запальної відповіді в печінці [87, 91]. Експеримент, проведений на ІЛ-10 $-/-$ мишах, продемонстрував, що ІЛ-10 відіграє важливу роль у пригніченні запальної відповіді в печінці під час регенерації [15]. Слід зазначити, що ІЛ-10 взаємодіє з іншими прозапальними цитокінами для точної регуляції та синхронізації проліферації гепатоцитів за умов регенерації. ІЛ-10 пригнічує запальну цитокінову відповідь, з наступною регуляцією активності STAT3 печінки. У пацієнтів з різноманітною патологією печінки спостерігається підвищення рівня ІЛ-10 сироватки та печінки [92-93], що може мати важливе значення не тільки для зниження активності запального процесу, але й для організації надзвичайно активного процесу регенерації печінки, що його стимулювала запальна відповідь, без пухлинної трансформації.

Слід зазначити, що важливу роль в стимуляції запального процесу відіграє фактор активації тромбоцитів (ФАТ, PAF – platelet-activating factor), який у вогнищі запалення підсилює хемотаксис нейтрофілів і макрофагів, підсилює дегрануляцію лейкоцитів з викидом вільних радикалів та пероксидів [94-95]. Таким чином, хронічне запалення підтримується в активному стані досить тривалий час. Але, запалення має певну стадійність перебігу, і згодом проліферація пересилує альтерацію. Тривалий вплив чотирихлористого вуглецю викликає біологічний ефект репарації, тобто заміщення тканини, що зруйнувалася, новими клітинами та волокнистими елементами.

1.2 Механізми регенерації печінки

У відповідь на хронічне запалення в печінці утворюються вузлики регенерації, де відбувається формування фіброзної тканини [3, 78, 81], згодом

руйнація нормальної тканини органу призводить до гемодинамічних розладів. Оскільки фіброз печінки являється необхідною стадією процесу регенерації, важливо контролювати та спрямовувати його, утримуючи в припустимих межах [96].

В механізмі розвитку ФП провідну роль відіграє альтерація гепатоцитів та фібробластів, з наступною активацією ЗКП, що вимушені перетворюватися на міофібробласти [3, 78, 96]. При цьому розчинні медіатори цих процесів продукуються активованими клітинами Купфера [97].

Однією з основних складових механізму ушкодження гепатоцитів при токсичному гепатиті являється перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ), коли відбувається вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідів мембран клітин. Внаслідок ланцюгового характеру протікання ПОЛ в тканинах накопичуються гідропероксиди і нові вільні радикали. Так, саме надмірне утворення вільних радикалів спостерігається при впливі чотирьохлористого вуглецю [98]. Вільнорадикальні процеси відносять до так званих «критичних систем» організму, тобто таких, що знаходяться під багатосходинковим контролем механізмів регуляції [99-101].

Відомо, що вільні радикали мають високу реакційну здібність, здатні пошкоджувати біологічні мембрани, гальмувати активність ферментів, призводити до створення перекисних сполук [102-103]. В свою чергу, перекиси накопичуються в організмі, активуючи окиснення ліпідних та фосфоліпідних структур – мембранні оболонки клітин та органел.

Певною мірою ПОЛ є фізіологічним процесом, а будь-яка біологічна система містить деяку кількість вільних радикалів [103], але такий стан чітко регулюється системами антиоксидантного захисту, які забезпечують рівновагу прооксидантно-антиоксидантних взаємовідносин [14, 49, 55].

Фіброз печінки – це патологічний стан, що характеризується виникненням надлишкової кількості колагену внаслідок формування нових фібрил, при чому клінічна симптоматика досить обмежена, а порушення функції гепатоцитів – мінімальне. Але, фіброз може стати причиною портальної

гіпертензії, супроводжуватись некрозами, виникненням «хибних» часточок. Причинами фіброзу можуть бути різноманітні чинники: природжені, запалення, метаболічні розлади, токсичні або лікарські речовини. Тим не менш, механізми розвитку патологічного процесу залишаються тотожними [1, 26, 104].

Найчастіше фіброз описують, як процес загоєння рани, що вийшов з-під контролю. Відтворення пошкоджених тканин являється фундаментальним біологічним процесом, що призводить до спрямованого заміщення мертвих або ушкоджених клітин за умов гострого чи хронічного впливу патологічних чинників. У процесі загоєння при пошкодженні відбувається активація зірчастих клітин печінки (ЗКП), коли вони отримують фенотип міофібробластів і починають експресувати та накопичувати великі об'єми компонентів позаклітинного матриксу в печінці [105-106]. Виділяють певну стадійність активації ЗКП: ініціації, прогресування та резолюції [107-108]. У випадку гострого запалення всі ці стадії проходять послідовно, ЗКП підлягають апоптозу або переходять у фазу спокою [97], а у випадку хронічної патологічної стимуляції ЗКП стають стало активованими: відбувається проліферація, активний фіброгенез, змінюється скоротливість, деградує матрикс, зникає ретиноїд, починається активний синтез білків позаклітинного матриксу з його накопиченням [96, 109].

Репарація, звичайно, включає 2 основні етапи: регенерацію, коли пошкоджені клітини заміщаються клітинами того ж самого типу, що призводить до повного відтворення тканини, та фазу фіброплазії або фіброзу, коли замість нормальної паренхіми виникає сполучна тканина. Спочатку необхідний, згодом процес загоєння стає неконтрольованим, внаслідок чого відбувається ремоделювання позаклітинного матриксу і формується рубцева тканина [54].

В дослідженнях описано послідовність подій при регенерації печінки, що складається, перш за все, з переходу гепатоцитів в активну стадію клітинного циклу, з наступною фазою проліферації паренхіматозних клітин та поступового завершення процесу регенерації [84, 107, 110].

За умов гострого запалення відбуваються термінові судинні реакції, що призводять до кровостазу та лейкоцитарної інфільтрації, в той час, коли хронічний запальний процес викликає поступове формування фіброзу, що стимулюється одночасним перебігом запальних, некробіотичних та проліферативних змін [136-137]. Зазвичай, стимулює хронічний фіброз патологічний чинник, що діє, і викликає синтез біологічно активних речовин у вигляді ферментів, факторів росту, цитокінів, які беруть участь у фібро- та ангиогенезі, з прийдешньою структурною перебудовою тканин та органу [107-108].

При пошкодженні відбувається викид медіаторів запалення епітеліальними та/або ендотеліальними клітинами, внаслідок чого активується антифібринолітичний-коагуляційний каскад [111-115], який стає тригером формування тромбу та позаклітинного матриксу. Агрегацію, тромбоутворення та гемостаз ініціюють тромбоцити [116]. В подальшому, дегрануляція тромбоцитів стимулює вазодилатацію та підвищення судинної проникності, в той час як стимульовані міофібробласти (α -SMA+фібробласти, що секретують колаген) (α -SMA: smooth muscle actin alpha) та епітеліальні та/або ендотеліальні клітини продукують матриксні металопротеїнази (ММП), що руйнує базальну мембрану, створюючи передумови для надходження клітин запалення до місця ушкодження [117-118]. Епітеліальні та ендотеліальні клітини також продукують фактори росту, цитокіни, хемокіни, які стимулюють проліферацію та рекрутмент лейкоцитів в ділянці позаклітинного матриксу, що утворюється. На початкових етапах загоєння найбільш поширеними є нейтрофіли. Після їх дегрануляції та загибелі починають надходити макрофаги. Активовані макрофаги та нейтрофіли продукують цитокіни та хемокіни, які підтримують процес загоєння рани. Ці чинники мають також мітогенний та хемотактичний вплив на ендотеліальні клітини, що оточують рану, а протягом міграції ендотеліоцитів в центр рани – утворюються нові кровоносні клітини. В подальшому, активовані Т-лімфоцити вивільняють профібротичні цитокіни IL-13 та TGF- β [114-115, 119], які, в свою чергу, активують макрофаги та

міофібробласти. Впродовж міграції фібринною сіткою в глибину пошкодження активовані фібробласти трансформуються в α -SMA-експресуючі міофібробласти. Міофібробласти походять з місцевих або кістковомозкових мезенхімальних клітин. Також епітеліальні клітини можуть підлягати епітеліально-мезенхімальному перетворенню (ЕМП), стаючи додатковим джерелом міофібробластів [109, 120]. Внаслідок активації міофібробласти скорочуються і спонукають краї рани рухатися до центру. В решті решт, епітеліальні та/або ендотеліальні клітини діляться та мігрують через базальний шар для регенерації пошкодженої тканини. Процес нормального загоєння завершується. Однак, у випадку повторення ушкодження виникає хронічне запалення, а репарація призведе до надмірного утворення компонентів позаклітинного матриксу (гіалуронової кислоти, фібронектину, протеогліканів, інтерстиційних колагенів), що стане вагомим внеском у формуванні постійного фіброзного рубця [115].

Основними патологічними ознаками багатьох хронічних захворювань печінки є фіброз та цироз [1, 3, 81, 110]. Є припущення, що фіброз являється зворотнім процесом [81]. Фіброз печінки може призвести до портальної гіпертензії та печінкової недостатності, його також асоціюють з підвищеним ризиком розвитку раку печінки [121]. Незважаючи на те, що ФП вважали захворюванням, яке прогресує та має незворотній характер, на експериментальних моделях та дослідженнях людини було доведено, що ФП людини, як мінімум, частково зворотній [7, 122-124]. Однак, залишається відкритим питання, чи можливе відтворення нормальної архітектури печінки за умов активного фіброзу, оскільки є суттєве експериментальне підґрунтя для ствердження, що зворотний процес неможливий при вельми розвинутому цирозі. Припускають, що фіброз виникає у випадках, коли баланс між матриксними металлопротеїназами та тканинними інгібіторами ММП (ТІММП) зрушується в бік ТІММП, тоді як зцілення можливе при зниженій експресії ТІММП [117]. Цей факт викликає особливої уваги, оскільки активний фіброз є відносно гіпоцелюлярним, можливо, що незавершена деградація

позаклітинного матриксу (тобто, незворотного фіброзу) розвивається за умов відсутності певного клітинного медіатора (джерела ММП) [118]. Це передбачає необхідність наступного запалення з метою успішного зворотнього розвитку фіброзу. Дослідження демонструють, що виснаження макрофагів в ділянці фіброзу може уповільнити деградацію ПКМ та втрату ЗКП [125]. Це дає підставу вважати, що макрофаги необхідні для ініціації деградації ПКМ, можливо, шляхом виділення специфічної ММП.

Баланс між проангіогенними та антиангіогенними чинниками регулює судинне ремоделювання при різних фіброзних захворюваннях – легеневий фіброз, системний склероз та ін. [65-68, 71].

Фіброзування, в якому беруть участь медіатори та ціла низка клітин різного типу, являється процесом гістологічних перетворень у відповідь на хронічне пошкодження [126-128]. Протягом фіброгенезу у печінці велика кількість патологічних чинників призводить до формування скупчень колагену: фактори запалення з клітин Купфера, судинного росту, активації стовбурових клітин печінки. Фіброз печінки є одним з провідних чинників смертності внаслідок суттєвих змін структури внутрішніх органів з порушенням їх основних функцій [111, 120, 129]. Розвиток фіброзу спостерігається при хронічних захворюваннях печінки: вірусних гепатитах, алкогольній хворобі печінки та ін., при цьому в органі виявляються депозити надлишкової кількості позаклітинного матриксу з великою кількістю колагенових фібрил, що порушує морфо-функціональний стан печінки [130].

За останні 20 років було доведено, ЗКП являються ключовими клітинами у формуванні ФП [112, 131-133], а мікрооточення відіграє головну роль в активації ЗКП [132, 134]. Клітини Купфера беруть важливу участь в модуляції запалення при розвитку ФП [112, 125]. Припускають, що у випадку ФП клітини Купфера продукують велику кількість прозапальних цитокінів: фактор некрозу пухлини α (ФНП- α), інтерлейкін 1β (ІЛ- 1β), макрофагальний запальний протеїн 1 (МЗП-1); вони стимулюють ЗКП і роблять свій внесок у пошкодженні

печінки; запалення вважають посередником між пошкодженням печінки та розвитком фіброзу [135-136].

Крайньою стадією фіброзу є цироз, при якому відбувається утворення перетинок та хибних часточок, а також присутнє запалення, що гальмується при фіброзі. Виявлено, що патогенетичні чинники, які призводять до цих форм патології печінки, різняться, оскільки в складні патологічні процеси залучені різні типи клітин [104].

Головними ознаками фіброзу є наявність підвищеної кількості міофібробластів, що знаходяться у стані диференціювання, скупчення колагенових депозитів, уповільнення деградації колагенових фібрил та підсилення їх скорочуваності [3, 26, 137].

Фіброз печінки характеризується хронічною активацією відповіді загоєння рани та підсиленням диференціації зірчастих клітин печінки у міофібробластоподібні клітини [26, 104]. Додатково до ЗКП у процес фіброзу включаються портальні фібробласти, циркулюючі або кістково-мозкові фіброцити та епітеліальні клітини, які підлягли епітелій-мезенхімальному перетворенню [104, 138]. Крім того, спостерігається сплеск експресії колагену, матріксних металопротеїназ та тканинних інгібіторів металопротеїназ [118, 139]. Критичним для нормального функціонування печінки стає закриття мікросудинних фенестрацій депозитами позаклітинного матриксу [138].

На моделі фіброзного ураження печінки чотирьохлористим вуглецем, припинення введення цього патологічного чинника призводить до спонтанної редукції фіброзу вже через рік [140]. Більшість дослідників вважає, що такий зворотній процес у печінці пов'язаний з апоптозом печінкових міофібробластів [137], або внаслідок переходу ЗКП у стан спокою [104].

Апоптоз – це запрограмована природою смерть клітини. Цей процес відбувається протягом всього життя з метою позбавлення від клітин, що більше не функціонують. Вважали, що апоптоз не викликає імунної відповіді і не впливає на оточуючі клітини [141].

Відомо, що апоптозні гепатоцити за умов ФП піддаються змінам, які варіюють від імуномодуляції до безпосередньої взаємодії апоптозних клітин з оточуючими клітинами [104, 142]. В безпосередній близькості від апоптозних гепатоцитів ЗКП перетворюються на фібробластоподібні клітини. Fas та CD40 – ліганди зовнішніх сигналів апоптозу – знаходяться в стані підвищеної активності за умов розвитку ФП [143, 144]. Однак, міофібробластоподібні клітини є резистентними до апоптозу, особливо після стійкої активації [145]. Стійкість до апоптозу допомагає підтримувати профіброзне оточення, присутність активованих ЗКП [104, 137]. Таким чином, можна вважати, що для підсилення зворотнього розвитку фіброзу необхідно індукувати апоптоз.

В печінці ідентифіковано декілька типів клітин апоптозу, при цьому найбільший внесок при ініціюванні фіброзу роблять гепатоцити [146]. Більшість дослідників вважає, що при прогресуванні ФП відбувається й ангиогенез [137, 140]. Цей процес викликаний підвищеною секрецією VEGF, що його продукують активовані ЗКП та інші міофібробластоподібні гепатоцити [135].

Тривалий час вважали, що апоптозні клітини відіграють несуттєву роль для кінцевого результату загоєння рани, а виявляються тільки як необхідні складові функціонування організму [113, 147]. На даний час вважають, що апоптоз є ключовим гравцем в ініціації, підтримці та розрешенні фіброзу органу – високі рівні апоптозу знаходять майже при всіх типах фіброзу [137, 148], що забезпечують так звані клітини апоптозу, які не лише стимулюють процеси проліферації фібробластів та міофібробластів, підтримують їх дозрівання та диференціювання [149], але й, разом з активованими клітинами сполучної тканини, підтримують процес фіброгенезу шляхом секреції відповідних сигнальних молекул [149-150]. Так, фактор росту пухлин альфа (Tumor necrosis factor (TNF)- α), низка інтерлейкінів (Interleukin (IL)), зокрема 6, 7, 10, 11, 12, інсуліноподібний фактор росту (Insulin-like growth factor (IGF)-1), трансформуючий фактор росту бета 1 (transforming growth factor (TGF)- β 1), що їх виділяють тканинні макрофаги, підтримують життєздатність клітин оточення

[151-152], тобто, активування процесу фіброгенезу відбувається за умов послаблення апоптозу і стимуляції розмноження та подальшого диференціювання основних фіброгенних клітин [151, 153].

В печінці та легнях введення апоптозних клітин відповідного органу індукує обмежену імунну відповідь при підсиленні фіброзу [154-155]. Ці дослідження свідчать про те, що паракринні сигнальні механізми від апоптозних клітин можуть впливати на фіброзну відповідь.

Нез'ясованим залишається питання, яким чином відбувається перетворення судин в синусоїдальну форму, а також механізми регулювання регресії судин при ФП. Великого значення для зворотнього розвитку ФП мають також активовані ЗКП. Виявлені ЗКП, що експресують колаген та α -SMA, які підлягають апоптозу, але не всі – деякі ЗКП перетворюються на неактивні й уповільнюють рівень апоптозу при регресії фіброзу [156]. Вважають, що механізм регулювання печінкою регресії судин та ремоделювання, може бути тотожним механізму видалення ЗКП, що є ключовим компонентом регенерації печінки [137].

Шляхом модулювання рівня апоптозу відбувається регуляція регресу судин за умов загоєння рани [157]. Баланс про- та проти-ангіогенних медіаторів контролює процес утворення судин чи їх регресію, тому є патогенетичним чинником при фіброзуванні печінки. Так, неповний регрес судин призводить до формування гіпертрофічного або келоїдного рубця [137]. Сумісний вплив хронічної активації процесу загоєння ран та дисбалансу про- та проти-ангіогенних чинників може призвести до підвищеного рівня апоптозу й фіброзу. Підвищений рівень апоптозу необхідний для ініціювання та підтримки утворення нормотрофічного рубця, тоді як неповний контроль ангіогенезу стимулює формування гіпертрофічного рубця [137, 158-159].

Згідно сучасних уявлень, апоптоз клітин паренхіми є важливим запальним стимулом, що активує ЗКП для фагоцитозу апоптозних тілець [160]. Тому, спроба блокувати апоптоз гепатоцитів терапевтичним шляхом являється потенційно антифібротичною стратегією.

Фактор росту гепатоцитів (ФРГ, Hepatocyte growth factor – HGF) – плуріпотентний, він має потужну можливість стимулювати тканинну репарацію та регенерацію органу після ушкодження, а також з'являється для покращення стану при фіброзі та цирозі печінки на тваринних моделях [161-163]. Пропонують три різні механізми пояснення антифібротичного ефекту HGF: (1) попередження апоптозу гепатоцитів і стимуляція їх мітозу за умов диметилнітрозамін-індукованого ФП, призводячи до виживання щурів при летальній хворобі; (2) підсилення активності колагенази, що стимулює компоненти позаклітинного матриксу; (3) пригнічення експресії mRNA для проколагену та TGF- β 1 (останній є основним фактором ФП і потенційним інгібітором росту гепатоцитів). Було продемонстровано, що ФРГ виступає у якості антагоніста експресії TGF- β 1 [164]. Залишається нез'ясованим специфічний механізм дії ФРГ, який відповідає за підсилення функціональної здібності печінки, але вважають, що він являється потужним протизапальним цитокіном і пригнічує запалення у нирках шляхом дисrupції сигналів ядерного фактору (NF)- κ B. Є дані, що рівень ФРГ значно знижується за умов диметилнітрозамін-індукованого ФП [165].

Незважаючи на розповсюдженість захворювання на ФП у світі, ефективної антифіброгенної терапії не існує. Традиційна китайська медицина застосовує рослинні екстракти та настоянки для лікування хронічних гепатитів та цирозу печінки з метою усунення клінічних симптомів, покращення функції печінки та підвищення якості життя [145, 166]. Відвар Huangqi (HQD) відносять до класичного рецепту лікування пошкодження печінки. Він готується з двох лікарських рослин: Radix Astragali та Rhizoma Glycyrrhizae у масовому співвідношенні 6 до 1. Використання HQD при лікуванні щурів з диметилнітрозамін-індукованим цирозом мало значний терапевтичний ефект [167]. Але, в іншому дослідженні такого результату досягнуто не було [168].

У майбутньому дослідники зможуть припинити хронічну активацію загоєння рани та підсилити тканинну регенерацію замість тканинної репарації.

Щоб сягнути поставленої мети необхідно контролювати регресію судин, а також рівень апоптозних ендотеліальних клітин та тканин, що їх оточують.

1.3 Фізіологічні передумови використання тромбоцитів

В кровоносних судинах тромбоцити знаходяться в постійній взаємодії з лейкоцитами та ендотеліоцитами, тому їх поведінка являється важливим показником запалення [116]. При ураженні судини субендотеліальна поверхня стає первинною мішенню для тромбоцитів – проагрегаційні стимули призводять до прикріплення до неї тромбоцитів. Протягом цього процесу тромбоцити змінюють форму, реалізують вміст гранул, приєднуються один до одного, утворюючи агрегати [19]. Однак, функції тромбоцитів не обмежуються лише участю в тромбоутворенні та регулюванні гемостазу, вони також відіграють важливу роль й у патофізіології патологічних процесів: існує зв'язок між станом тромбоцитів та прогресуванням серцево-судинних захворювань, гіперактивність тромбоцитів сприяє виникненню бічних судинних ефектів за умов цукрового діабету та ін. [169-170].

Тромбоцити є без'ядерними клітинами крові, що містять гранули біологічно активних речовин, а саме: тромбоцитарний фактор росту (ФРТ, platelet derived growth factor – PDGF), ФРГ, судинний ендотеліальний фактор росту (СЕФР, vascular endothelial growth factor – VEGF), ІФР, ендотеліальний фактор росту (ЕФР), ТФР β та ін. [171-173]. Також тромбоцити здатні накопичувати серотонін, що надходить з сироватки крові, який розташовується частково поза секреторними гранулами, частково – прикріпленим до протеїнів [174].

За своєю структурою та функцією ФРТ відноситься до родини СЕФР [175]. ФРТ та ТФР β являються потужними фіброгенними факторами [176-177]. Було доведено, що ФРТ підсилює міграцію та проліферацію судинних гладеньком'язових клітин [178]. Пізніше з'ясували, що ФРТ має мітогенний вплив на всі мезенхімальні клітини, в тому числі й на фібробласти, міофібробласти та стовбурові клітини печінки за умов фіброзу [179].

ФРТ відіграє важливу роль при ембріогенезі, а також значною мірою активується за умов патологічного процесу [180-181]. Виявлена надмірна експресія гену ФРТ β в печінці при цирозі [182].

При ФП доведено існування різних ізоформ ФРТ (AA, BB, CC, DD), які мають мітогенний та хемоаттрактивний вплив на мезенхімальні клітини. ФРТ BB разом з ТФР стимулюють фібробласти до індукції експресії α -актину гладеньком'язових клітин [183-184].

Найбільш виразну роль тромбоцити відіграють за умов тромбоутворення та при гемостазі [116, 185], проте доведені їх значні можливості, що не стосуються гемостазу [186-187].

Доведено також, що тромбоцити беруть активну участь в проліферації гепатоцитів [23, 188] та відіграють важливу роль у процесі регенерації печінки після гепатектомії [21, 23]. Так, тромбоцити продукують ІЛ-6, судинний ендотеліальний фактор росту, інсуліноподібний фактор росту та взаємодіють з клітинами Купфера, що стимулює проліферацію гепатоцитів [19, 23]. Безпосередній контакт тромбоцитів з СЕП призводить до виділення тромбоцитами sphingosine 1-phosphate, з наступною стимуляцією секреції сінусоїдальними епітеліоцитами печінки ІЛ-6, який викликає синтез ДНК в гепатоцитах шляхом STAT3 [21-22].

Привертає увагу той факт, що ТФР- α – один з найпоширеніших компонентів тромбоцитарних гранул, являється необхідним для завершення регенерації печінки [132, 189].

Донедавна було нез'ясованим питання щодо ролі тромбоцитів у відтворенні ураженої тканини печінки [190]. Згодом було доведено, що при зниженому вмісті тромбоцитів у крові спостерігається незавершене відтворення органу після часткової гепатектомії [19, 21], а для проліферативного ефекту необхідний безпосередній контакт тромбоцитів з гепатоцитами [23, 191]. Висновок авторів про те, що тромбоцити забезпечують регенерацію печінки шляхом стимулювання експресії ФРГ та ІФР-1 навіть за умов дезактивації клітин Купфера [191], дає підставу вважати тромбоцити потенційною сумішшю

клітин для застосування з метою відтворення морфо-функціонального стану печінки при її ураженні.

Доведена важлива роль серотоніну з тромбоцитів у регенерації печінки [19-20, 174]. Тромбоцити здатні захоплювати серотонін з кишечника та легень і накопичувати його [192]. За умов дефіциту тромбоцитів та серотоніну різко знижувалась здатність печінки до репарації після експериментальної ішемії-реперфузії [193-194]. Нокаутні миші з блокуванням продукції серотоніну демонстрували відсутність проліферації гепатоцитів після ішемії, хоча й мали здатність до нормального ремоделювання тканин [195].

Слід пам'ятати, що загоєння забезпечується впливом місцевих – резидентних клітин та клітин, які циркулюють і надходять до місця ураження, звідки йдуть відповідні сигнали [196-197]. При надходженні тромбоцитів відбувається їхня дегрануляція з вивільненням специфічних для тромбоцитів протеїнів, факторів росту, молекул адгезії, ангіогенних факторів, протеогліканів, цитокінів [170]. Основним ефектом багатьох цитокінів є мітогенна активність, внаслідок чого індукується проліферація та активація фібробластів, нейтрофілів, моноцитів, гладеньких міоцитів та мезенхімальних стовбурових клітин [198-200]. Зниження інтенсивності альтерації стимулює початок ангіогенезу, який складається з активації, проліферації та міграції ендотеліальних клітин для будови судин [201-203]. В той же час ІЛ-10 здатний пригнічувати синтез біологічно активних речовин, що стимулюють і підтримують запалення [106].

Альфа-гранули тромбоцитів містять всі компоненти, що необхідні для ангіогенезу [26, 204-205]. Було показано, що застосування гелю з ЗТП на відкритій абдомінальній рані у щурів призводить до більш високої перфузії крові у порівнянні з тваринами, де гель був отриманий з бідної тромбоцитами плазми [206]. Крім того, кровопостачання підсилювалось при внутрішньом'язовому введенні ЗТП. Також, було доведено, що ЗТП підсилює приживлення клітинного трансплантату внаслідок швидкої епітелізації та судинного росту [207-208].

З метою використання фізіологічних властивостей тромбоцитів при патологічних процесах були розроблені методи отримання збагаченої тромбоцитами плазми [24-25]. Було доведено, що найбільш потужний регенеративний, ангіогенний, протизапальний ефект спостерігається при застосуванні ЗТП, в якій концентрація тромбоцитів перевищувала в 4-6 разів фізіологічний рівень і становила 10^6 та більше тромбоцитів в мл плазми [18, 24]. Дослідження зразків збагаченої тромбоцитами плазми виявило наявність у великій концентрації таких ангіогенних факторів, як СЕФР, ФРТ-ВВ, ЕФР та основний ФРФ [18, 204], при чому їхній вміст в ЗТП майже у 8 разів вищий за цей показник у нативній крові [208].

Було виявлено, що концентрат тромбоцитів у завісі плазми формує систему фібринного матриксу для ангіогенезу [209]. Також було виявлено, що ЗТП може підсилювати рост судин та стимулювати прогеніторні клітини ендотеліоцитів формувати судиноподібні структури [209-210].

Використання ЗТП у клінічній практиці почалося у 70-х – 80-х роках минулого сторіччя, коли її почали додавати для кращого приживлення пересаджуваних черепних кісток [211]. ЗТП не тільки містила аутологічні фактори росту та секреторні протеїни, які прискорювали процес загоєння [212], але й підсилювала рекрутмент, проліферацію та диференціацію клітин, залучених у процес регенерації [170]. Виявилось, що аутологічна ЗТП ефективна при загоєнні трофічних норниць при цукровому діабеті, при відтворенні цілісності м'яких та твердих тканин [213-216]. Активовані тромбоцити дегранулюють і вносять в оточуючу тканину фактори росту, здатні до ініціації та підтримки заживлення [171-172]. Активне виділення цих протеїнів починається протягом 10 хвилин після утворення згустку крові, при чому 95 % пресинтезованих факторів росту виділяється за 1 годину, хоча тромбоцити продовжують синтез та секрецію додаткових протеїнів ще 5-10 днів для підтримки власної життєдіяльності [204].

Фібринний матрикс, що утворюється, також має стимулюючу дію на загоєння рани: його формування відбувається за рахунок полімеризації

фібриногену плазми внаслідок зовнішньої активації кальцієм або тромбіном, чи внутрішньої активації ендogenousним тканинним тромбопластином [173]. Цей тимчасовий матрикс створює обмежений простір для тромбоцитів, завдяки чому реалізація вмісту гранул стає повільною поки формується фізіологічна сітка для стовбурових клітин і фібробластів, які мігрують до місця ураження, та приносять інші медіатори [217].

Зазвичай процес загоєння рани протікає в чотири послідовні фази: гемостаз, запалення, проліферація та ремоделювання [196]. Всі ці процеси знаходяться під контролем клітинно-клітинних взаємодій та розчинних факторів росту, тому застосування ЗТП при регенерації є доречним з огляду на фізіологічні властивості вмісту тромбоцитів [197, 218]. Тромбін являється індуктором активації тромбоцитів, що призводить до виділення факторів росту [206]. Відомо, що ЗТП при додаванні кальцію та тромбіну демонструє більш виразні ефекти для приживлення трансплантату та вищу концентрацію факторів росту [219]. В експериментальних дослідженнях активація тромбоцитів відбувається при моделюванні пошкодження, коли запускається процес регенерації.

Наведені факти дозволяють зробити припущення про те, що збагачена тромбоцитами плазма може надавати ефект стимуляції регенерації за умов індукovanого процесу хронічного токсичного ураження печінки.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота виконана на базі науково-дослідницької лабораторії кафедри патологічної анатомії з секційним курсом Одеського національного медичного університету (свідоцтво про атестацію № 047/14 від 16.12.2014 р.) та клініко-діагностичної лабораторії ФОП «Ушаков Олег Степанович».

2.1 Характеристика експериментальних тварин

Експеримент проведений на статевозрілих самцях щурів Wistar масою 220-280 г. Тварини знаходилися в стандартних умовах біологічної клініки (віварій). Дослідження є загальноприйнятими, дозволеними до застосування. Підготовка тварин до експерименту, всі інвазивні втручання, знеболювання та виведення з дослідження здійснювалися з дотриманням відповідних інструкцій (Наказ № 755 від 112.08.77р. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»; Законом України «Про захист тварин від жорсткого поводження» № 27, ст.230 від 2006 р. із змінами, внесеними згідно із Законом № 1759-VI (1759-17) від 15.12.2009, ВВР, 2010, № 9, ст.76, а також загальними етичними принципами експериментів на тваринах (I Національний конгрес з біоетики, 20.09.2001 р., м.Київ) та Етичним кодексом вченого України (НАНУ, 2009 р.) [220].

На експериментальних тваринах був змодельований фіброз печінки шляхом перорального введення олійного розчину чотирихлористого вуглецю (CCl_4) в концентрації 50 % у дозі 0,05 мл через день протягом 7 - 8 тижнів [221].

Цироз печінки (ЦП) індукували шляхом внутрішньошлункового введення CCl_4 концентрацією 50 % та заміщенням питної води розчином етилового спирту концентрацією 10 % протягом 150 діб [221].

Експериментальні тварини загальною численністю 205 тварин були розподілені на 6 груп: I група – інтактні тварини – контроль (n=10); II група –

щури з індукованим хронічним гепатитом (n=30); III група – щури з індукованим цирозом печінки (n=30); IV група – щури, яким вводили збагачену тромбоцитами плазму, серед яких тварини з «відкритим» шляхом введення збагаченої тромбоцитами плазми (n=30) і тварини з «закритим» шляхом введення збагаченої тромбоцитами плазми (n=30); V група – щури з індукованим хронічним гепатитом та наступним введенням збагаченої тромбоцитами плазми (n=30); VI група – щури з індукованим цирозом печінки та наступним введенням збагаченої тромбоцитами плазми (n=30).

Окремо була сформована група з 15 щурів, в яких з бедреної вени відбирали 1 мл крові для отримання збагаченої тромбоцитами плазми, що виділяли з цільної крові на апараті SmartPrep (фірма-виробник Harvester Corp, USA), свідоцтво про держреєстрацію № 10179/2011 згідно з Наказом Держлікінспекції МОЗ України від 08 лютого 2011 р. № 69.

Після закінчення досліджень була проведена евтаназія тварин під легким ефірним наркозом, при цьому щурів поміщали у невеликий закритий посуд – ексикатор – з подальшою декапітацією та забором крові, а також вилученням органів для проведення морфологічних досліджень.

Для виявлення морфофункціонального стану печінки в кожній групі експериментальних тварин було проведене патоморфологічне дослідження печінки, серця, нирок, визначений рівень прозапальних цитокінів, елементний та біохімічний (печінкові проби) склад крові.

Спостереження проводилися протягом двох місяців з виведенням з експерименту через 2, 4 та 8 тижнів після останнього введення чотири хлористого вуглецю або збагаченої тромбоцитами плазми.

2.2 Відпрацювання різних способів введення збагаченої тромбоцитами плазми

Для точного доставляння ЗТП до ураженої тканини нами були застосовані два способи. Перший, «відкритий», спосіб полягав в тому, що під наркозом

проводилася присередня лапаротомія з виділенням нижньої частки печінки і наступним введенням в неї ЗТП.

2.2.1 Спосіб введення збагаченої тромбоцитами плазми в процесі присередньовверхньої лапаротомії

За добу до операції харчування одноразове зранку. Голод в день операції. Після втручання виключити вживання рідини не менше, як на 5 годин. Місце розтину звільняли від шерсті голінням.

Премедикацію здійснювали шляхом внутрішньом'язового введення 0,1 мл атропіну, 0,1 мл димедролу. Через 15 хвилин внутрішньом'язове введення розчину кетаміну гідрохлориду в дозі 0,1 мл/0,1 кг. Через 15 хвилин тварину фіксували у положенні на спині. Тіло тварини накривали стерильним матеріалом; операційне поле обробляли антисептиком «Стеріліум».

Виконується розтин шкіри та підшкірної клітковини вздовж серединної лінії живота, відступивши від мечеподібного відростку на 0,5 см та вниз на 2 см. Рану висушують тупфером. Судини, що кровоточать, коагулюють коагуляційним ножом. Після зупинення кровотечі операційна рана ізолюється від шкіри та підшкірної клітковини шляхом накладення стерильних серветок по краям розтину і фіксацією їх зажимами. Гострими гачками асистент розводить края шкіряної рани. Чистим скальпелем виконується розтин апоневрозу 1 см, потім тупокінечними вигнутими ножницями закінчується розтин до 1,5 см.

Нижній край правої частки печінки фіксується дзеркалами, потім в паренхіму печінки вводиться 0,1 мл ЗТП. Після цього рана ушивається. Спочатку на апоневроз накладаються вузлові шви кетгутом № 1. Шов обробляється тупфером з антисептиком. Края шкіри та підшкірної клітковини також обробляються тупфером з антисептиком, потім на поверхневу фасцію, шкіру та підшкірну клітковину накладаються кетгутові шви голкою, що ріже, кетгут № 8. Шов тричі обробляється розчином антисептика. На операційну рану накладається асептична пов'язка.

Використання другого, «закритого», способу полягало у фіксації тварини під легким ефірним наркозом з введенням ЗТП шприцем в проекцію нижньої частки печінки, що виступала за лінію реберної дуги.

2.2.2 Спосіб пункційного введення збагаченої тромбоцитами плазми

Права клубова ділянка вивільняється від шерсті голінням. Тварина під легким ефірним наркозом фіксується за передні та задні кінцівки. Поверхня шкіри тричі обробляється розчином антисептику. Печінка візуалізується у вигляді темної плями, а за рахунок патології, що розвивається, печінка виступає за край реберної дуги. Декількома вколами шприцем вводиться 0,1 мл ЗТП у проекцію нижньої частки печінки.

2.3 Методика отримання збагаченої тромбоцитами плазми

Збагачена тромбоцитами плазма – автологічна завісь концентрату тромбоцитів в невеликому об'ємі плазми [24]. Залежно від техніки та способу отримання ЗТП може містити різний об'єм плазми, деяку кількість еритроцитів та лейкоцитів і різну кількість тромбоцитів. Загальноприйнятною є основна вимога для визначення «збагачена тромбоцитами плазма» – мінімум 5-разове підвищення концентрації тромбоцитів порівняно з їх кількістю в цільній крові [25].

Отримання збагаченої тромбоцитами плазми здійснювали шляхом її виділення з цільної крові на апараті SmartPrep (фірма-виробник Harvester Corp, USA), свідоцтво про держреєстрацію № 10179/2011 згідно з Наказом Держлікинспекції МОЗ України від 08 лютого 2011 р. № 69. Принцип методу полягає в тому, що в апараті відбувається центрифугування цільної крові з цитратом натрію в двох режимах, які відрізняються швидкістю обертів. При цьому відбувається розшарування рідини, шприцем вибирається шар, що містить тромбоцити у невеликому об'ємі плазми – збагачена тромбоцитами плазма. Підрахунок кількості тромбоцитів здійснювали з використанням

камери Горяєва до та після центрифугування з попереднім додаванням розчину оксалату амонію концентрацією 1 % для лізису еритроцитів [222].

2.4 Патогістологічні методи дослідження тканин печінки, серця, нирок

Після евтаназії органи зважували, потім фіксували в розчині нейтрального формаліну в концентрації 10 %. Наступної доби вирізали шматки органів, проводили скрізь спирти зростаючої концентрації, й занурювали у парафіно-воскову суміш.

Мікротомні зрізи завтовшки 3-5 мкм, забарвлювали гематоксиліном-еозином, за Ван Гізон [223], та досліджували за допомогою звичайної та поляризаційної мікроскопії з використанням світлового мікроскопу «Leica-DMLS».

Забарвлення гематоксиліном-еозином: після видалення парафіну та проведення через спирти зрізи забарвлюють в гематоксиліні, промивають у дистильованій воді, занурюють у розчин аміаку, знов промивають і переносять у водно-спиртовий розчин еозину. Забарвлений зріз промивають в дистильованій воді, проводять дегідратацію та просвітлення, заключають в канадський бальзам. В результаті ядра клітин отримують синій або синьо-фіолетовий колір, а цитоплазма клітин та колагенові волокна сполучної тканини забарвлюються в різні відтінки червоного, помаранчевого або рожевого кольорів [223].

Для виявлення волокон сполучної тканини був використаний метод забарвлення за Ван-Гізон. Методика проводиться наступним чином: після видалення парафіну і проведення через спирти зрізи забарвлюють в залізному гематоксиліні Вейгерта, промивають, забарвлюють пікрофуксином. Забарвлений зріз промивають в дистильованій воді, проводять дегідратацію та просвітлення, потім заключають в полістирол. В результаті ядра клітин отримують чорний колір, колаген – червоний, інші тканинні елементи – жовтий [223].

В печінці оцінювали стан гепатоцитів, жовчних проток, гемокапілярів портальних трактів; в серці оцінювали стан волокон міокарду; в нирках оцінювали клубочки та каналцевий апарат [222].

2.5 Дослідження елементного та біохімічного складу крові щурів досліджуваних груп

Взяття крові для аналізу здійснювали через хвостову вену тварин.

Визначення вмісту гемоглобіну проводили за допомогою фотоелектроколориметра уніфікованим гемоглобіно-ціанідним методом [222] за допомогою наборів реактивів «Лаксема», Чехія. Вміст гемоглобіну вимірювали в г/л.

Кількість еритроцитів, тромбоцитів, лейкоцитів, лімфоцитів вираховували за допомогою камери Горяєва [222].

Для підрахунку еритроцитів кров розводили у 200 разів, додавали розчин Гайєма та толуїдиновий синій, не забарвлені еритроцити вираховували за формулою (2.1):

$$X = a \times 4000 \times 200 / 80 \quad (2.1),$$

де X – кількість еритроцитів, а – кількість підрахованих еритроцитів.

Для підрахунку лейкоцитів кров розводили у 20 разів, додавали розчин оцтової кислоти концентрацією 3-5 % з краплями розчину метиленового синього для забарвлення ядер лейкоцитів.

Підрахунок здійснювали за формулою (2.2):

$$X = a \times 4000 \times 20 / 1600 \quad (2.2),$$

де X – кількість лейкоцитів, а – кількість клітин у 1600 малих квадратах; у підсумку $X = a \times 50$.

Підрахунок тромбоцитів в мазках крові здійснювали за методикою А.Фоніо наступним чином. В пробірку вносили розчин сульфату магнію концентрацією 14 %, додавали кров, змішували і готували тонкі мазки. Фіксували та забарвлювали за Романовським-Гімза [223] протягом 2-3 годин. Висушені мазки мікроскопували з імерсійним об'єктивом, підраховували

тромбоцити в тонких ділянках препарату (еритроцити мали розташовуватися окремо один від одного). Тромбоцити забарвлювалися в рожево-фіолетовий колір, мали кулеподібну форму, розмір 2-4 мкм, в центрі виявлялася зернистість – грануломір, периферична частина мала більш світле забарвлення, незерниста частина – гіаломір.

Підрахунок виконували наступним шляхом: в кожному полі зору мікроскопу підраховували кількість еритроцитів та тромбоцитів, рухаючи його доти, доки не були підраховані 1000 еритроцитів. Паралельно рахували еритроцити в камері Горяєва.

Підрахунок здійснювали за формулою (2.3):

$$X = \frac{a \times b}{1000} \quad (2.3),$$

Де X – кількість тромбоцитів в 1 мкл крові, а – кількість тромбоцитів, що підраховано в мазку крові на 1000 еритроцитів; b – кількість еритроцитів в 1 мкл крові; 1000 – кількість еритроцитів, підрахованих в мазку крові.

Вміст гемоглобіну виявляли з застосуванням гемоглобінціанідного методу [222]. В пробірку до 5 мл трансформуючого розчину додавали 20 мкл крові (розведення у 251 раз). Вміст пробірки ретельно перемішували і залишали на 10 хвилин. Вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 543 нм (зелений світлофільтр) в кюветі з товщиною шару 1 см против трансформуючого розчину. Вимірювали за тих самих умов стандартний розчин. Для побудови калібрувального графіка з стандартного розчину готували розведення (табл.2.1).

Таблиця 2.1 - Таблиця побудови калібрувального графіка для вимірювання вмісту гемоглобіну

№ п/п	Стандартний розчин, мл	Трансформуючий розчин, мл	Концентрація гемоглобіну, г/л
1.	-	6	-
2.	2	4	50
3.	4	2	100
4.	6	-	150

Вміст гемоглобіну обчислювали за формулою (2.4):

$$Hb \text{ (г / л)} = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot C \cdot K \cdot 0,001 \cdot 10 \quad (2.4),$$

де

$E_{оп}$ – екстинція дослідної проби;

$E_{ст}$ – екстинція стандартного розчину;

C – концентрація гемоглобіну в стандартному розчині мг %;

K – коефіцієнт розведення крові;

0,001 – коефіцієнт для перерахунку мг/100 мл в г/100 мл;

10 – коефіцієнт для перерахунку г % в г/л.

Визначення активності АЛАТ та АсАТ проводили фотометричним методом за допомогою стандартизованого набору реактивів (Human GMbH). В пробірку вносили сироватку, розчин буферу, а після інкубації – розчин субстрату. Активність ферментів визначали на апараті «Humalyser-2000» при довжині хвилі 340 нм. Активність ферментів виражали в Од/л [222].

Вміст загального білка визначали біуретовим методом з застосуванням реактивів фірми Human GMbH. В пробірку вносили стандартний розчин білка, досліджувану сироватку і реагент. Екстинцію вимірювали на апараті «Humalyser-2000» при довжині хвилі 546 нм. Вміст загального білка виражали у г/л [222].

Вміст загального білірубіну виявляли колориметричним методом «Лабсистемс» з додаванням додецил-сульфату натрію для поліпшення розчинності загального білірубіну. Вміст загального білірубіну виражали в мкмоль/л [222].

2.6 Дослідження рівня цитокінів у плазмі крові щурів досліджуваних груп

Визначення рівнів цитокінів здійснювалося шляхом імуноферментного аналізу на аналізаторі імуноферментних реакцій «УНИПЛАН» АИФР-1 з застосуванням наборів для кількісного виявлення інтерлейкіну-2 та інтерлейкіну-6 ELISA «Bender Medsystems» [222]. В лунки стрипів вносили розчин для промивання, видаляли рідину і вносили розчини для розведення та калібрування, сироватку крові. Після інкубації видаляли вміст стрипів, промивали лунки і добавляли кон'югат. Після повторного інкубування, видалення стрипів і промивання лунок, вносили розчин субстрату, інкубували, вносили реагент для гальмування і вимірювали абсорбцію при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію ІЛ-2 та ІЛ-6 виражали у пг/л.

2.7 Методи статистичної обробки інформації

Всі результати обробляли з використанням загальноприйнятих у медико-біологічних дослідженнях параметричних і непараметричних методів статистичного аналізу [224, 225].

При обробці даних, отриманих в експериментальних дослідженнях, використані загальновідомі статистичні параметри: середнє арифметичне, дисперсія, стандартне квадратичне відхилення, очікувана похибка, й достовірний інтервал.

Середнє арифметичне (M) визначали за формулою (2.5):

$$M = \frac{a_1 + a_2 + a_3 + a_4 + \dots + a_n}{n}, \text{ де} \quad (2.5),$$

a – абсолютні величини ряду спостережень, що підлягає аналізу;

n – кількість спостережень в даному ряду.

Середнє квадратичне відхилення (δ) визначали за формулою (2.6):

$$\delta = \pm \sqrt{\frac{Ed^2}{n-1}}, \text{ де} \quad (2.6),$$

Ed^2 – сума квадратів відхилення кожного числа від середньоарифметичного ряду; n – кількість спостережень в даному ряду.

Величину середньої очікуваної похибки для абсолютних величин визначали за формулами (2.7 та 2.8):

$$m = \pm \frac{\delta}{\sqrt{n}}, \text{ якщо кількість спостережень перевищувала 30;} \quad (2.7),$$

$$m = \pm \frac{\delta}{\sqrt{n-1}}, \text{ якщо кількість спостережень була менше 30,} \quad (2.8),$$

де δ – середньоквадратичне відхилення,

n – кількість спостережень в даному ряду.

Для визначення середньої очікуваної похибки відносних величин в усіх статистичних аналізах використали наступну формулу (2.9):

$$m = \pm \sqrt{\frac{P-(100-P)}{n}}, \quad (2.9),$$

де P – показник відносної величини, %,

n – кількість спостережень.

За нерівномірністю розподілу ознак, що практично завжди відзначали при кількісному аналізі морфологічних, імунологічних та біохімічних порушень, вірогідність визначали з використанням непараметричного тесту Манна-Уїтні.

Статистичну обробку здійснювали за допомогою персонального

комп'ютера з використанням програми статистичного аналізу «Primer Biostatistics».

Мінімальну статистичну вірогідність визначали при $p < 0,05$, що означало ступінь імовірності безпомилкового прогнозу досліджуваних показників $\pm 95\%$ [225].

РОЗДІЛ 3

З'ЯСУВАННЯ ВПЛИВУ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ НА СТАН ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ТА ПРОЗАПАЛЬНУ ЛАНКУ СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ ЗДОРОВИХ ТВАРИН

3.1 Характеристика морфо-функціонального стану печінки, внутрішніх органів, елементного та біохімічного складу крові, прозапальної ланки системи цитокінів контрольної групи тварин

Для достовірної оцінки досліджень, що виконуються, необхідно охарактеризувати тварин, отриманих з біологічної клініки (віварію) – інтактну групу. Третій розділ включає в себе результати патоморфологічного дослідження печінки, серця та нирок щурів, дослідження загального аналізу крові, біохімічних показників крові («печінкові проби»), стан прозапальної ланки системи цитокінів, а також буде з'ясований вплив ЗТП на зазначені показники за умов введення її здоровим тваринам. При цьому, для вирішення подальшого проведення експерименту, будуть описані та співставлені результати дослідження тварин, яким ЗТП вводили різними методами: «відкритим» та «закритим».

3.1.1 Морфофункціональний стан печінки та прозапальної ланки системи цитокінів у контрольних щурів

В печінці контрольних тварин спостерігається звичайна балочна будова тканини (рис. 3.1). Поміж балками розташовуються фізіологічного вигляду синусоїди, вільні від еритроцитів на більшості ділянок. Септальні жовчні протоки вистлані високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами округлої форми. Стінки міжчасточкових протоків вистлані кубічними епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Інфільтратів не виявлено. Гепатоцити перипортальної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, з подовженими ядрами. Така картина спостерігається у всіх досліджуваних полях зору. Будова печінкових балок

неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра крупні, овальні, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна. Спостерігаються клітини у стадії аміотичного поділу.

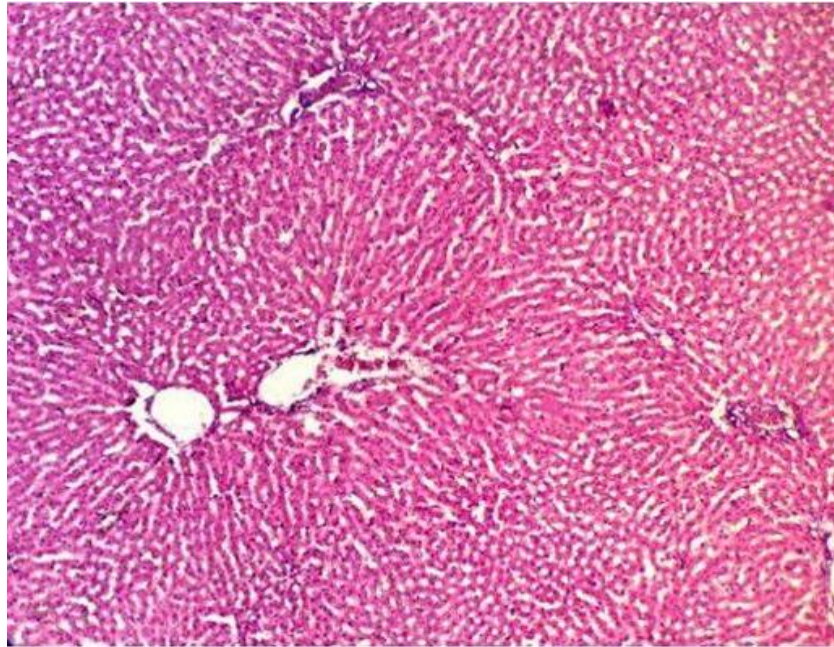


Рисунок 3.1 - Печінка щура контрольної групи.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

Вимірювання вмісту прозапальних цитокінів показало, що їх концентрація в середньому становила (пг/мл): ІЛ-2 – $16,7 \pm 0,04$; ІЛ-6 – $75,3 \pm 5,4$.

3.1.2 Патоморфологічне дослідження внутрішніх органів, загального та біохімічного складу крові контрольних щурів

Нирки тварин контрольної групи мають бобоподібну форму, темно-червоний колір, поверхня гладенька, консистенція твердо-еластична. На розтині можна розрізнити коркову та мозкову речовини.

При патоморфологічному дослідженні у нирках спостерігалися клубочки переважно округлої форми. Клубочки мономорфні, компактні, капілярні петлі рівномірної товщини (рис. 3.2). Клітинний склад клубочків представлений мезангіальними клітинами, подоцитами, вісцеральними епітеліоцитами,

еритроцитами. Кровонаповнення капілярів помірне. Дистальні каналці представлені клітинами сплющеного епітелію з гомогенною цитоплазмою, округлим нормохромним ядром.

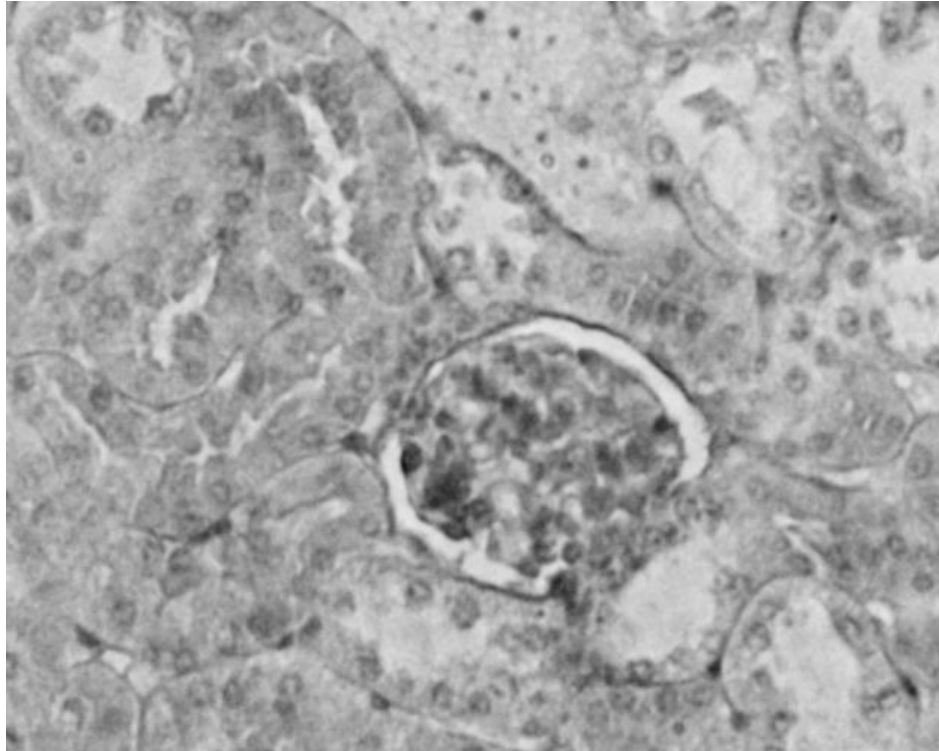


Рисунок 3.2 - Нирка щура контрольної групи.

Забарвлення: гематоксилін-еозин; зб. х 400.

Серце інтактних тварин звичайної конусоподібної форми та розмірів. Вкрите навколосерцевою сумкою. На зовнішній поверхні візуалізуються коронарні артерії.

На зрізах – будова м'язових волокон міокарду збережена, ядра кардіоміоцитів займають центральне положення. Добре виражені прошарки пухкої сполучної тканини, де розташовані кровоносні судини, в окремих ділянках спостерігаються повнокровні артерії невеликого калібру з помірно вираженим склерозом, на окремих препаратах – помірна лейкоцитарна інфільтрація (рис.3.3).

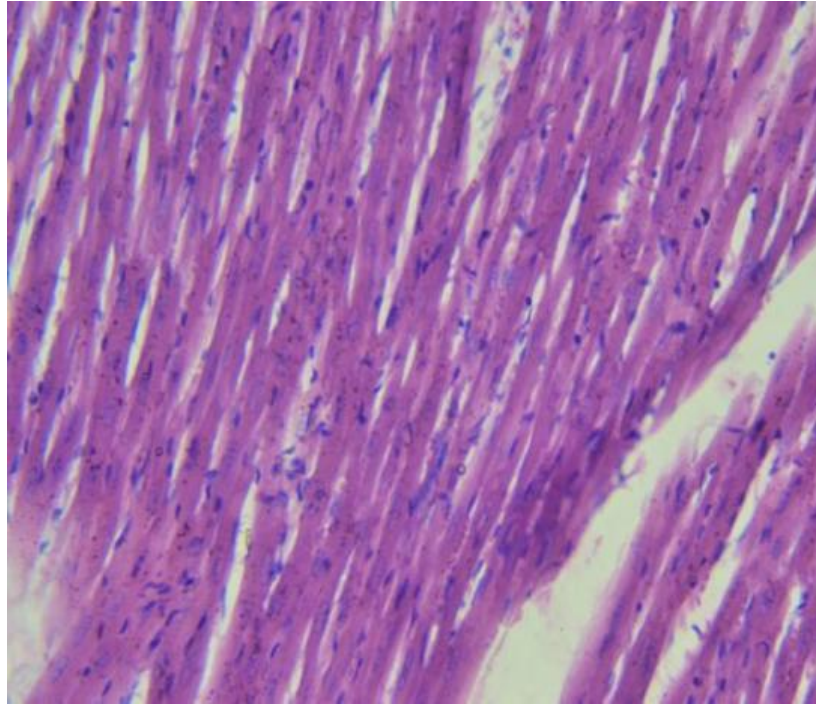


Рисунок 3.3 - Зріз міокарду тварини контрольної групи.
Забарвл. гематоксилін-еозин, зб. х 100.

Вимірювання складу формених елементів крові показало, що він в цілому відповідає загальноприйнятим даним для здорових тварин (табл.3.1).

Таблиця 3.1 - Аналіз вмісту формених елементів крові контрольної групи тварин

Показник	Лейкоцити $\times 10^9 / \text{л}$	Лімфоцити $\times 10^9 / \text{л}$	Еритроцити $\times 10^{12} / \text{л}$	Гемоглобін г/л	Тромбоцити $\times 10^9 / \text{л}$
Значення	$8,0 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,4$	$6,6 \pm 0,5$	$117 \pm 10,2$	$201,6 \pm 18,3$

Досліджувані біохімічні показники крові (печінкові проби) також не відрізнялися від прийнятої норми для здорових лабораторних тварин (табл.3.2), що характеризує їх як в цілому здорових.

Таблиця 3.2 - Аналіз біохімічних показників крові контрольної групи тварин

Показник	АЛТ Од/л	АСТ Од/л	Загальний білірубін мкмоль/л	Загальний білок г/л
Значення	62±6,4	204±8,6	1,4±0,1	98±3,8

3.2 Експериментальна перевірка безпеки застосування збагаченої тромбоцитами плазми у щурів

Одним з важливих критеріїв визначення ефективності дії лікарського засобу являється локація місця його введення. Для точного доставляння ЗТП до ураженої тканини нами були застосовані два способи. Перший полягав в тому, що під наркозом проводилася присередня лапаротомія з виділенням нижньої частки печінки і наступним введенням в неї ЗТП.

Використання другого способу полягало у фіксації тварини під легким ефірним наркозом з введенням ЗТП шприцем в проекцію нижньої частки печінки, що виступала за лінію реберної дуги. Детально використані способи введення збагаченої тромбоцитами плазми описані в розділі 2 (Матеріали і методи).

3.2.1 Морфо-функціональний стан внутрішніх органів, загального та біохімічного складу крові, стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим» шляхом

На 14-у добу експерименту в печінці спостерігається балочна будова тканини з помірною лейкоцитарною інфільтрацією (рис. 3.4). Поміж балками розташовуються синусоїди, судини повнокровні. Септальні жовчні протоки вислані високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами округлої форми. Стінки міждолькових проток вислані кубічними епітеліоцитами, ядра

яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони дольки поліморфні, з витягнутими ядрами. Спостерігаються зони клітин у стадії амітотичного поділу.

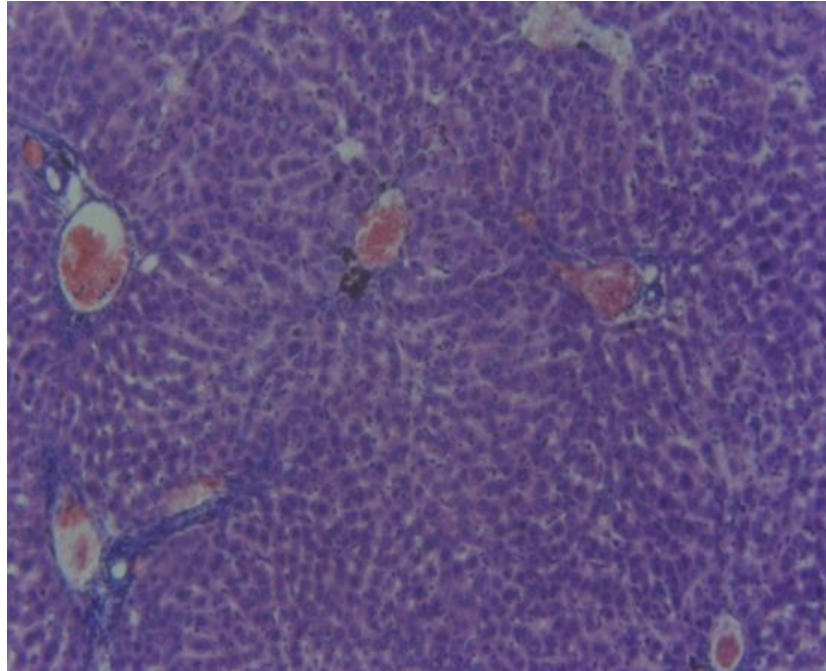


Рисунок 3.4 - Печінка щура на 14-у добу після введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим» шляхом.

Забарвлення: гематоксилін-еозином. x 100.

Будова печінкових балок дещо неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра мають гантелеподібну форму, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна.

На 28-у добу експерименту в печінці спостерігається нормалізація стану кровоносних судин та зникнення ознак лімфогістіоцитарної інфільтрації (рис.3.5). Септальні жовчні протоки вислані високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами округлої форми. Стінки міждолькових проток вислані кубічними епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони дольки поліморфні, з витягнутими ядрами. Спостерігаються зони клітин у стадії амітотичного

поділу. Будова печінкових балок неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра мають гантелеподібну форму, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна.

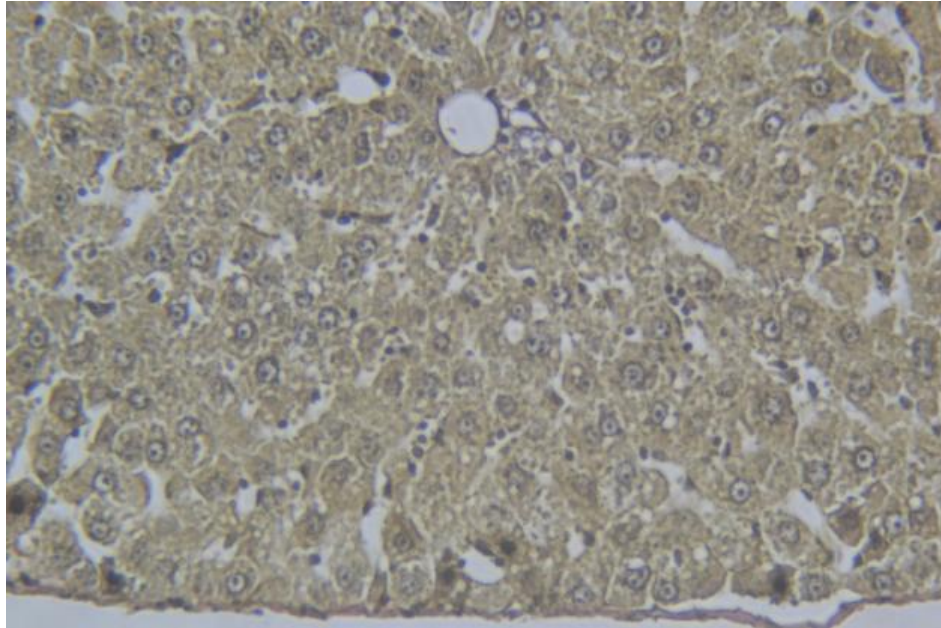


Рисунок 3.5 - Печінка щура на 28-у добу після введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим» шляхом.

Забарвлення: за Ван Гізон, збільшення x 200.

На 56-у добу експерименту в печінці спостерігається балочна будова тканини (рис. 3.6). Поміж балками розташовуються синусоїди, судини повнокровні. Септальні жовчні протоки вислані високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами округлої форми. Стінки міждолькових проток вислані кубічними епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони дольки поліморфні, з витягнутими ядрами. Спостерігаються зони клітин у стадії аміотичного поділу. Будова печінкових балок дещо неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра мають гантелеподібну форму, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна.

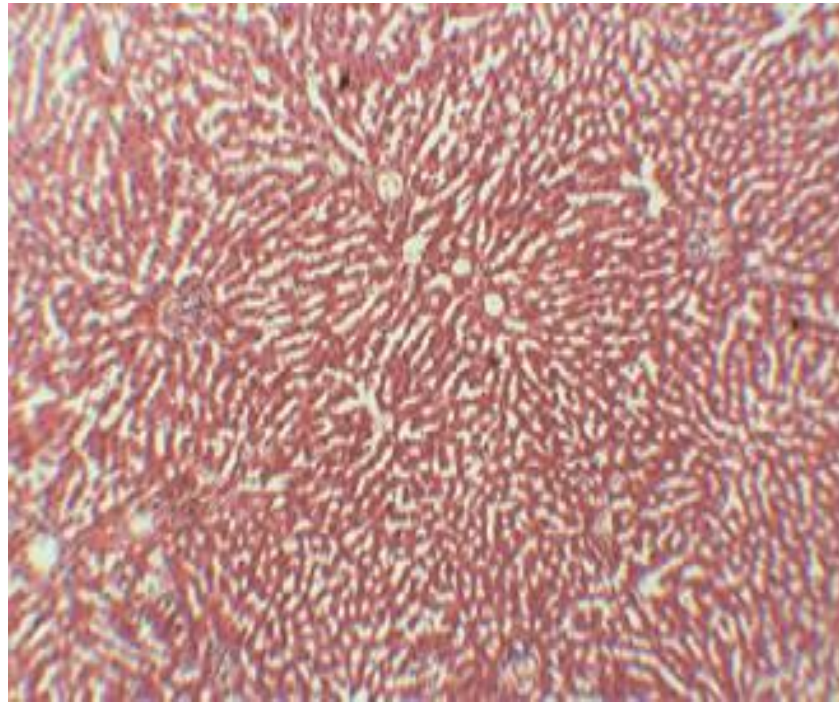


Рисунок 3.6 - Печінка щура на 56-у добу після введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим» шляхом.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

Кількісний підрахунок формених елементів крові показав, що протягом терміну спостереження були відсутні суттєві відмінності від відповідних показників контрольної групи тварин (табл.3.3). Так, на 14-у добу дещо підвищувався вміст лейкоцитів, але ця різниця не була достовірною. Також, не було достовірно значущих відмінностей вмісту лейкоцитів на 28-у та 56-у доби. Майже не змінювався вміст лімфоцитів та еритроцитів, хоча вміст гемоглобіну на 28-у та 56-у доби достовірно зростав у порівнянні з показниками контрольної групи та експериментальною групою на 14-у добу експерименту. Крім того, спостерігалася тенденція до помірного підвищення вмісту тромбоцитів наприкінці терміну спостереження, але ця різниця не була статистично достовірною.

Таблиця 3.3 - Аналіз вмісту формених елементів крові щурів після введення ЗТП «відкритим» шляхом ($M \pm m$, $n=30$)

Показник	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
Лейкоцити $\times 10^9$ / л	8,0 \pm 0,4	9,2 \pm 1,4	7,8 \pm 1,0	7,7 \pm 0,7
Лімфоцити $\times 10^9$ / л	4,7 \pm 0,1	4,2 \pm 0,6	4,6 \pm 0,1	4,6 \pm 0,1
Еритроцити $\times 10^{12}$ / л	6,6 \pm 0,4	5,2 \pm 0,5	5,8 \pm 0,6	6,5 \pm 0,6
Гемоглобін г/л	117,2 \pm 6,9	115,4 \pm 8,6	133,7 \pm 9,8*	132,5 \pm 7,7*
Тромбоцити $\times 10^9$ / л	201,3 \pm 7,6	194 \pm 6,1	207 \pm 7,5	212 \pm 7,2

Примітка. * - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях.

Дослідження біохімічних показників крові виявив відсутність значущих змін активності ферментів цитолізу та вмісту загального білка. Лише вміст загального білірубін дещо знижався на 28-у добу, залишаючись на тому самому рівні до 56-ої доби (3.4).

Таблиця 3.4 - Аналіз біохімічного складу крові щурів після введення ЗТП «відкритим» шляхом ($M \pm m$, $n=30$)

Показник/термін	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
АЛТ (Од/л)	62,0 \pm 6,4	65,1 \pm 3,6	66,3 \pm 4,8	65,8 \pm 4,6
АСТ (Од/л)	204,6 \pm 18,6	207,2 \pm 15,4	215,1 \pm 15,8	213,7 \pm 12,9
Загальний білірубін (мкмоль/л)	1,4 \pm 0,1	1,8 \pm 0,2	1,5 \pm 0,1»	1,5 \pm 0,1»
Загальний білок (г/л)	98 \pm 7,8	93 \pm 7,7	90 \pm 8,1	86,3 \pm 6,6

Примітка. « - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в попередньому терміні спостережень.

Вимірювання вмісту цитокінів у динаміці показало, що їх концентрація достовірно підвищується на II тижні спостереження: на 53,3 % для ІЛ-2 та на 43,6 % для ІЛ-6, але в наступні терміни достовірно не відрізняється від показників контрольної групи (табл.3.5).

Таблиця 3.5 - Вміст цитокінів у крові щурів після введення ЗТП «відкритим» шляхом (пг/мл) ($M \pm m$, $n=30$)

Термін спостереження/ Показник	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
ІЛ-2	16,7±1,5	25,6±1,7*	15,9±1,2	17,2±1,4
ІЛ-6	75,3±5,4	98,1±7,6*	78,4±6,3	77,2±6,1

Примітка. * - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях.

На 14-у добу експерименту нирки щурів бобоподібної форми, темно-червоного кольору, поверхня гладенька, консистенція тверда. На розтині можна розрізнити коркову та мозкову речовини. При патоморфологічному дослідженні у нирках спостерігалися клубочки переважно округлої форми. Клубочки мономорфні, компактні, капілярні петлі рівномірної товщини.

Клітинний склад клубочків представлений мезангіальними клітинами, подоцитами, вісцеральними епітеліоцитами, еритроцитами. Кровонаповнення капілярів помірне. Дистальні каналці представлені клітинами сплющеного епітелію з гомогенною цитоплазмою, округлим нормохромним ядром.

На 28-у добу експерименту нирки щурів мають темно-червоний колір, зовнішня поверхня – гладенька, блискуча, на дотик – тверда.

На розтині – чітко розрізняється коркова та мозкова речовини. Клубочки мали кулеподібну форму, мономорфні. їх будова – без особливостей, капілярні петлі рівномірної товщини.

Клітинний склад клубочків містив мезангіальні клітини, подоцити, вісцеральні епітеліоцити, еритроцити. В дистальних каналцях виявлявся сплющений епітелій з гомогенною цитоплазмою, округлим нормохромним ядром.

На 56-у добу експерименту нирки щурів без суттєвих відмінностей від тварин контрольної групи (рис. 3.7). Зберігається поділ на коркову та мозкову

речовини, клубочки мають кулеподібну форму, проксимальні та дистальні каналці, кровоносні капіляри – без патологічних змін,

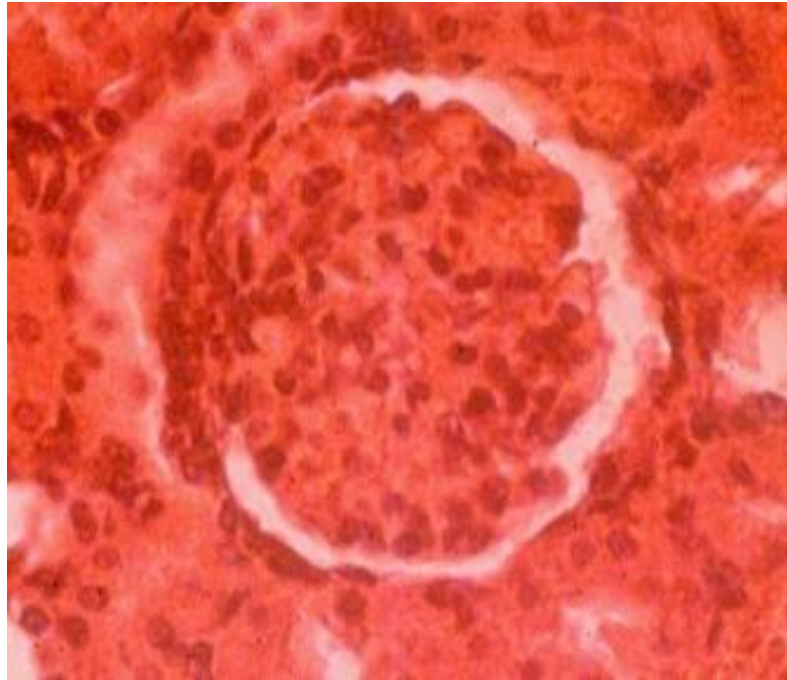


Рисунок 3.7 - Нирка щура після введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим шляхом».

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 400.

На 14-у добу після введення ЗТП «відкритим шляхом» серце щурів звичайної конусоподібної форми та розмірів, епікард – без особливостей.

На зрізах – будова м'язових волокон міокарду збережена, в окремих ділянках спостерігаються повнокровні артерії невеликого калібру з повільно вираженим склерозом, на окремих препаратах – помірна лейкоцитарна інфільтрація.

На 28-у добу експерименту серце щурів зберігало конусоподібну форму, його розміри не відрізнялися від контрольної групи тварин, епікард – без особливостей. Також будова м'язових волокон міокарду виявлялася звичайною, зберігалось повнокров'я дрібних артерій та помірно виражений склероз.

Серце та епікард щурів на 56-у добу експерименту – без особливостей, форма та розміри збережені. Будова м'язових волокон міокарду залишалася подібною до такої у тварин інтактної групи з незначною фрагментацією, помірне повнокров'я дрібних артерій, незначний склероз (рис.3.8).

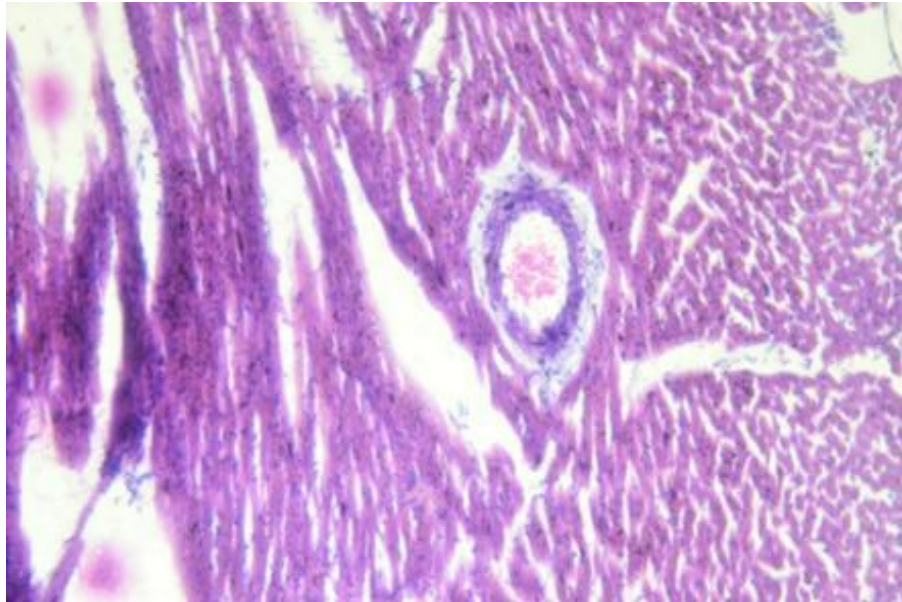


Рисунок 3.8 - Міокард щура після введення збагаченої тромбоцитами плазми «відкритим шляхом».

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

3.2.2 Морфо-функціональний стан внутрішніх органів, елементного та біохімічного складу крові, стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов введення збагаченої тромбоцитами плазми «закритим» шляхом

На 14-у добу після введення ЗТП печінка має червоно-коричневий колір, щільно-еластичну консистенцію. На розтині – балочна будова органу (рис.3.9).

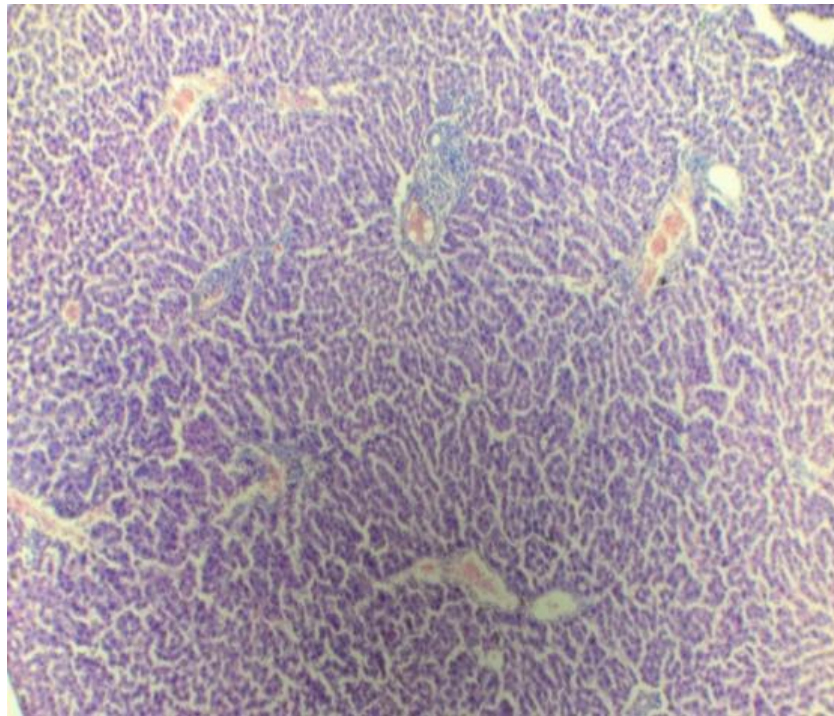


Рисунок 3.9 - Печінка щура після введення збагаченої тромбоцитами плазми «закритим» шляхом.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x100.

Поміж балками розташовуються звичайного вигляду синусоїди. Септальні жовчні протоки вистелені високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами кулеподібної форми. Стінки міжчасточкових проток вистелені кубічними епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони дольки поліморфні, з витягнутими ядрами. Наявні клітини у стадії аміотичного поділу.

Будова печінкових балок неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра мають гантелеподібну форму, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна.

На 28-у добу після введення ЗТП печінка зберігає колір та консистенцію. На розтині – балочна будова органу. Синусоїди звичайного вигляду. Септальні жовчні протоки вистелені високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами кулеподібної форми. Стінки міждолькових проток вистелені кубічними

епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони дольки поліморфні, з витягнутими ядрами. Наявні клітини у стадії аміотичного поділу. Будова печінкових балок неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. Гепатоцити центральної зони часточки різнокаліберні, поліморфні, витягнуті. Ядра мають гантелеподібну форму, хроматин дрібноглибчастий. Цитоплазма еозинофільна, гомогенна.

На 56-у добу після введення ЗТП зовнішня та внутрішня будова печінки – без особливостей, суттєві відмінності від стану органу у тварин контрольної групи відсутні.

На розтині виявляється балочна будова органу. Синусоїди мають звичайний вигляд. Септальні жовчні протоки вистелені високим циліндричним епітелієм з нормохромними ядрами кулеподібної форми. Стінки міжчасточкових проток вистелені кубічними епітеліоцитами, ядра яких дрібні, овальної форми, нормохромні, розташовані центрально. Гепатоцити перипортальної зони часточки поліморфні, з витягнутими ядрами. Наявні клітини у стадії аміотичного поділу. Будова печінкових балок неоднорідна. Гепатоцити утворюють поля, що містять поліморфні клітини. В центральній зоні часточки гепатоцити різнокаліберні, поліморфні, витягнуті, їхні ядра мають гантелеподібну форму, дрібноглибчастий хроматин. Цитоплазма гепатоцитів еозинофільна, гомогенна.

Дослідження вмісту формених елементів крові щурів після введення ЗТП «закритим шляхом» показало, що на 14-у добу експерименту відбувається помірне зниження вмісту еритроцитів (на 10 %, $p < 0,05$) з тенденцією до подальшого зниження на 28-у добу – на 14 % порівняно з контрольною групою, а на 56-у добу експерименту вміст еритроцитів повертався до рівня контрольної групи (табл.3.6). Крім того, поступово зростає вміст тромбоцитів, перебільшуючи контрольний показник на 56-у добу на 13,4 % (табл.3.6).

Таблиця 3.6 - Динаміка змін складу формених елементів крові щурів після введення ЗТП «закритим шляхом» ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/ № тварини	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
Лейкоцити, $\times 10^9 / \text{л}$	$8,0 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,6$	$8,2 \pm 0,3$	$8,1 \pm 0,2$
Лімфоцити, $\times 10^9 / \text{л}$	$4,7 \pm 0,1$	$5,1 \pm 1,0$	$5,0 \pm 0,7$	$4,8 \pm 0,7$
Еритроцити, $\times 10^{12} / \text{л}$	$6,6 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,4^*$	$5,7 \pm 0,5^{*»}$	$6,5 \pm 0,4$
Гемоглобін г/л	$117 \pm 6,9$	$118 \pm 4,8$	$129 \pm 4,3$	$123 \pm 3,8$
Тромбоцити, $\times 10^9 / \text{л}$	$201,3 \pm 7,6$	$205 \pm 8,7$	$209,2 \pm 6,5$	$228 \pm 5,1^*$

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

Аналіз вмісту біохімічних показників крові в динаміці показав, що відбувається помірно короткотривале зниження вмісту загального білірубіну на 14-у добу експерименту порівняно з контролем, на 28-у добу його рівень сягає контрольного показника й знов дещо підвищується, на 25 % перевищуючи показник 14-ої доби і майже не відрізняючись від показника контролю.

На 56-у добу в крові вміст загального білірубіну зберігається на рівні попереднього терміну та контрольної групи тварин (табл.3.7). Активність ферментів цитолізу суттєвих коливань на всіх термінах спостереження не зазнавала, хоча активність АСТ дещо зростала порівняно з контролем, але ця різниця не була достовірною. Вміст загального білку залишався в межах показника контрольної групи весь період спостереження (табл.3.7).

Таблиця 3.7 - Аналіз біохімічного складу крові щурів після введення ЗТП «закритим» шляхом ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/термін	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
АЛТ (Од/л)	62±1,4	58,0±1,6	62,7±1,9	63,5±1,5
АСТ (Од/л)	204±5,6	213±4,2	215±4,1	211±4,8
Загальний білірубін (мкмоль/л)	1,4±0,01	1,2±0,03*	1,4±0,05	1,5±0,03»
Загальний білок (г/л)	98±2,8	90±3,1	91,7±2,4	90,5±3,0

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

Вимірювання вмісту цитокінів у динаміці показало, що через два тижні від початку експерименту відбувається помірне підвищення вмісту ІЛ-2 (на 16,8 %) з наступним поступовим зниженням до рівня контрольного показника: на 28-у добу – на 10 % порівняно з попереднім терміном, і майже не відрізняється від показника контролю; на 56-у добу зниження продовжується, і цей показник становить вже 82, 6 % від показника 14-ої доби, не відрізняючись від показника контролю (табл.3.8).

Таблиця 3.8 - Вміст цитокінів у крові щурів після введення ЗТП «закритим» шляхом (пг/мл) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Термін спостереження/ Показник	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
ІЛ-2	16,7±0,04	19,5±0,8*	17,8±1,1	16,1±1,3
ІЛ-6	75,3±0,76	82,1±2,3*	74,6±2,5»	78,4±1,8»

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

Вміст ІЛ-6 на другому тижні також дещо підвищується (на 9 %), а в наступні терміни поступово сягає рівня контрольних значень: на 28-у добу його значення майже не відрізняється від контрольного, на 56-у добу – дещо підвищується порівняно з контролем, але ця різниця не є статистично достовірною (табл.3.8).

На 14-у добу експерименту нирки тварин після введення ЗТП «закритим» шляхом мають звичайний вигляд, будова не відрізняється від такої у тварин контрольної групи: мають бобовидну форму, темно-червоний колір, гладеньку поверхню.

На розтині чітко розрізняється коркова та мозкова речовини. Клубочки мають переважно кулеподібну форму; мономорфні, компактні, капілярні петлі рівномірної товщини.

Клітинний склад клубочків представлений мезангіальними клітинами, подоцитами, вісцеральними епітеліоцитами, еритроцитами. Кровонаповнення капілярів помірне, в окремих ділянках виявляється помірний венозний стаз (рис.3.10). Дистальні каналці представлені клітинами сплющеного епітелію з гомогенною цитоплазмою, округлим нормохромним ядром. Перитубулярна і клубочкова артеріальна сітка – без особливостей. У ділянках судинних полюсів візуалізуються устя приносних та виносних артеріол.

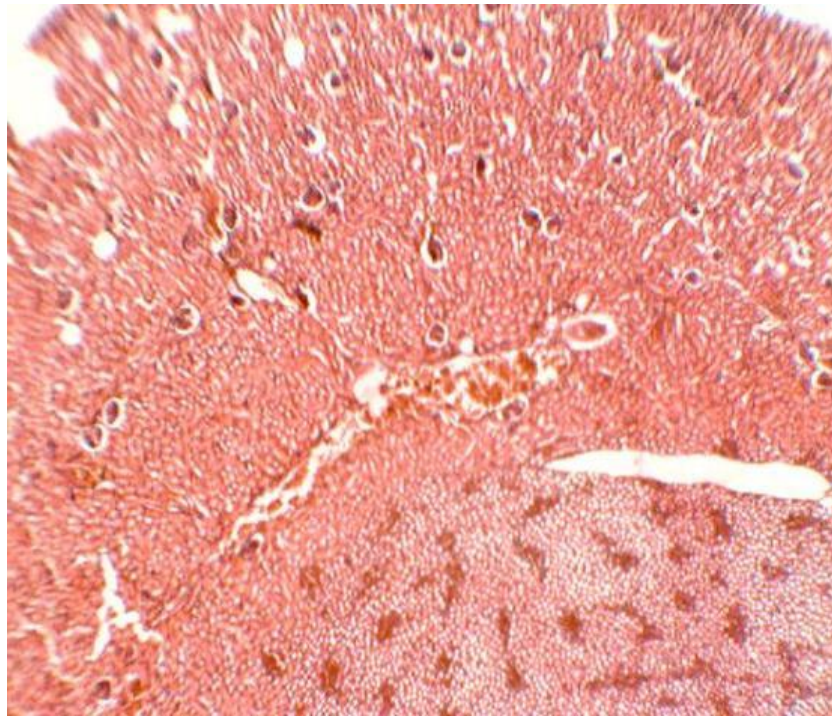


Рисунок 3.10 - Нирка щура після введення збагаченої тромбоцитами плазми «закритим» шляхом.

Забарвлення: Гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

На 28-у добу після введення ЗТП «закритим» шляхом нирки тварин мають звичайний вигляд, будова не змінюється у порівнянні з попереднім терміном і не відрізняється від такої у тварин контрольної групи: бобовидна форма, темно-червоний колір, гладенька поверхня. На розтині розрізняється коркова та мозкова речовини. Клубочки переважно кулястої форми; монорфні, компактні, капілярні петлі рівномірної товщини. Клітинний склад клубочків представлений мезангіальними клітинами, подоцитами, вісцеральними епітеліоцитами, еритроцитами. Кровонаповнення капілярів помірне. Дистальні каналці представлені клітинами сплющеного епітелію з гомогенною цитоплазмою, округлим нормохромним ядром.

На 56-у добу експерименту нирки мають звичайний вигляд, будова не відрізняється від такої у тварин на попередніх термінах спостереження і контрольної групи. На розтині чітко розрізняється коркова та мозкова речовини. Клубочки мають переважно кулясту форму; монорфні, компактні, капілярні петлі рівномірної товщини. Клітинний склад клубочків

представлений мезангіальними клітинами, подоцитами, вісцеральними епітеліоцитами, еритроцитами. Кровонаповнення капілярів помірне. Дистальні каналці представлені клітинами сплющеного епітелію з гомогенною цитоплазмою, кулеподібним нормохромним ядром.

На 14-у добу експерименту тканина серця не має суттєвих відмінностей від контрольної групи тварин. Будова м'язових волокон збережена, в окремих ділянках спостерігаються повнокровні артерії невеликого калібру з помірно вираженим склерозом, на окремих препаратах – незначна периваскулярна лейкоцитарна інфільтрація (рис.3.11).

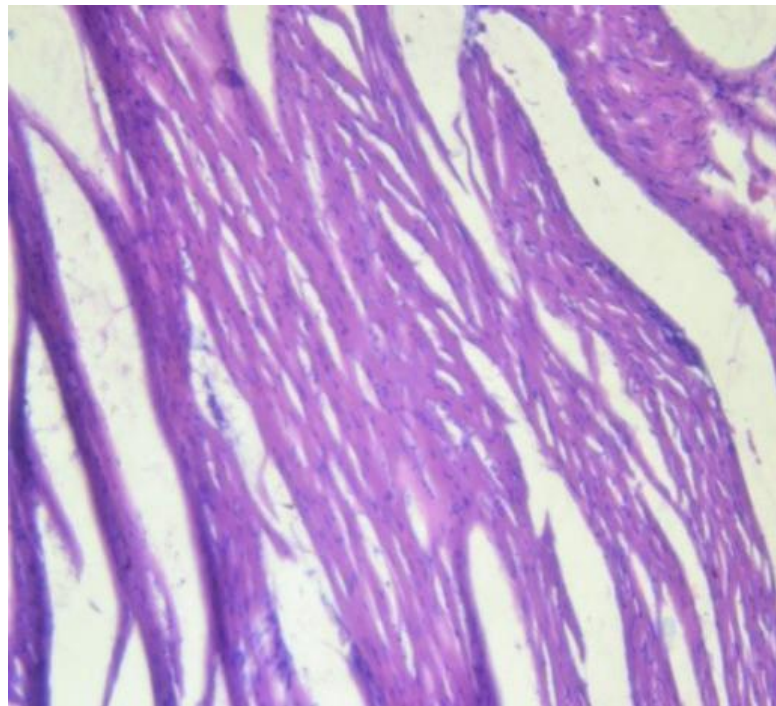


Рисунок 3.11 - Міокард щура після введення збагаченої тромбоцитами плазми «закритим» шляхом.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x100.

На 28-у добу експерименту тканина серця зберігає свою будову та впорядкованість і не має суттєвих відмінностей від тварин попереднього терміну спостереження та контрольної групи тварин. На 56-у добу після введення ЗТП тканина серця не має суттєвих відмінностей від попередніх термінів дослідження та контрольної групи тварин. Будова м'язових волокон

збережена, в окремих ділянках спостерігаються повнокровні артерії невеликого калібру з помірно вираженим склерозом.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про безпеку застосування збагаченої тромбоцитами плазми у тварин: дворазове її введення в тканину печінки двома шляхами демонструють відсутність патологічного впливу на морфо-функціональний стан внутрішніх органів, не викликає зрушень у біохімічному складі крові, вмісті та співвідношенні формених елементів крові, не відбувається також суттєвих коливань вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-2 та ІЛ-6 протягом 56 діб спостережень. Тому, можна вважати, що внутрішньопечінкове введення ЗТП є найбільш доступним, простим та дешевим способом застосування ЗТП в подальших дослідках.

Матеріали даного розділу висвітлені в наступній публікації: [226]

РОЗДІЛ 4

ОСОБЛИВОСТІ МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ ТА ПРОЗАПАЛЬНОЇ ЛАНКИ СИСТЕМИ ЦИТОКІНІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ

В даному розділі описано результати проведення експерименту з моделювання хронічного гепатиту шляхом тривалого внутрішньошлункового введення чотирьохлористого вуглецю. В динаміці спостережень були отримані дані морфологічних досліджень, загального та біохімічних аналізів крові, вимірювання вмісту прозапальних цитокінів.

4.1 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту

Цей розділ містить інформацію щодо результатів моделювання токсичного ураження печінки шляхом внутрішньошлункового введення чотирьохлористого вуглецю.

4.1.1 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту на 14-у добу експерименту

Через 2 тижні від останнього введення чотирьохлористого вуглецю розміри печінки достовірно зменшуються у порівнянні з контролем.

Гістологічне дослідження показало, що по всій площі печінки виявляються невеликі зони некрозу, ділянки гепатоцитів з ознаками вакуольної дистрофії, монолобулярні вузлики. Жовчні протоки набряклі, навколо центральних вен – розростання пухкої сполучної тканини (рис.4.1, 4.2). Портальні тракти розширені. Навколо центральної вени виявляються сполучнотканинні тяжі від центру в напрямку периферії часточок. Гепатоцити були зменшені, змінені за рахунок дрібнокрапельної жирової дистрофії. В кровоносних судинах спостерігається нерівномірне наповнення, подекуди – стази, повнокров'я.

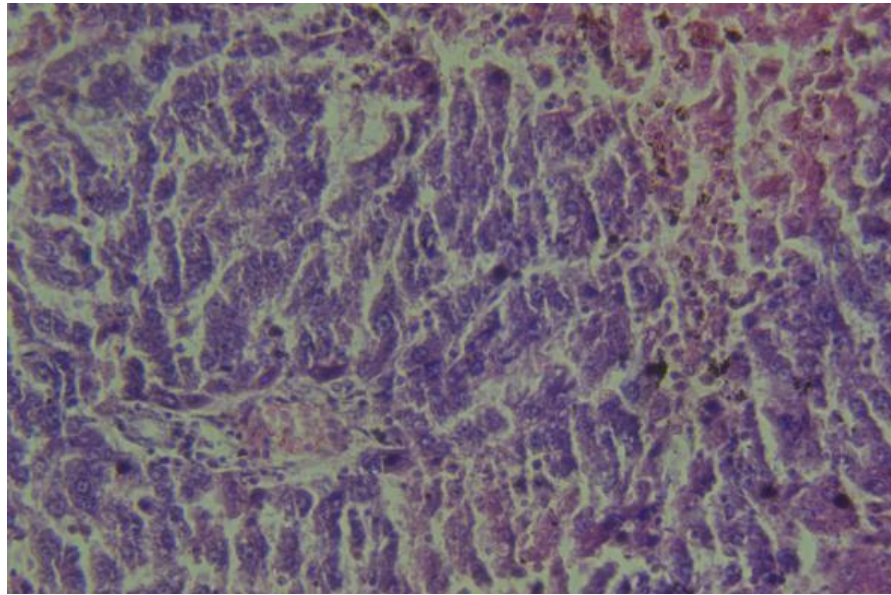


Рисунок 4.1. - Печінка щура II групи з модельованим ХГ на II тиждень експерименту: порушення будови органу, нерівномірне кровонаповнення судин, вогнищевий гіаліноз. Забарвлення: гематоксилін-еозином, зб. x 100.

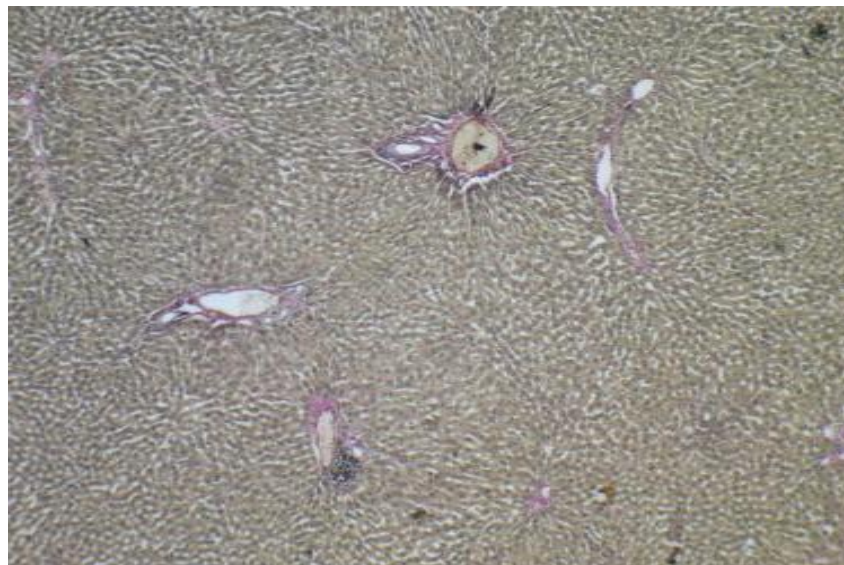


Рисунок 4.2 - Печінка щура II групи з модельованим ХГ на II тиждень експерименту: нерівномірне кровонаповнення судин, склерозування судинних стінок, вогнищевий гіаліноз, повнокров'я синусоїдів з перипортальною запальною інфільтрацією. Забарвлення: за Ван Гізон, збільшення x 100.

Дослідження складу формених елементів крові експериментальних тварин після тривалого введення чотирихлористого вуглецю показало значне

зростання вмісту лейкоцитів – більше, ніж втричі порівняно з контролем, коли цей показник становив $28,2 \times 10^9/\text{л}$. Вміст лімфоцитів навпаки, знижався майже вдвічі до $2,3 \times 10^9/\text{л}$ у порівнянні з контролем, а еритроцитів – знижався на 20 % порівняно з контролем, і становив $5,3 \times 10^{12}/\text{л}$, тоді як достовірних змін вмісту гемоглобіну виявлено не було, хоча й виявлялася певна тенденція до зниження. Кількість тромбоцитів не відрізнялася від показника контрольної групи тварин (табл.4.1).

Таблиця 4.1 - Динаміка змін складу формених елементів крові щурів II групи з модельованим ХГ ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/№ тварини	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
Лейкоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$8,0 \pm 0,4$	$28,2 \pm 1,6^*$	$32,0 \pm 1,2^{*}\gg$	$17,0 \pm 0,8^{*}\gg$
Лімфоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$4,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2^*$	$2,7 \pm 0,08^{*}\gg$	$3,2 \pm 0,4^{*}\gg$
Еритроцити $\times 10^{12} / \text{л}$	$6,6 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,7^*$	$5,2 \pm 0,7^*$	$5,8 \pm 0,4^{*}\gg$
Гемоглобін г/л	$117 \pm 6,9$	$108 \pm 8,1$	$102 \pm 6,2$	$96,4 \pm 3,7^*$
Тромбоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$201,3 \pm 7,6$	$206 \pm 3,9$	$196,2 \pm 4,9$	$188 \pm 3,1^{*}\gg$

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; \gg - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

При дослідженні біохімічних показників крові тварин II групи було з'ясовано, що на 14-у добу експерименту спостерігається суттєве підвищення активності ферментів цитолізу порівняно з показниками контрольної групи: АлАТ – на 72,6 %, АсАТ – у 2,5 рази. Також, у 3,6 рази зростав вміст загального білірубину у порівнянні з контролем, тоді як концентрація загального білку знижалася майже втричі відносно показника контрольної групи (табл.4.2), що свідчить про суттєве пригнічення білок-синтезуючої функції печінки.

Таблиця 4.2 - Аналіз біохімічних показників крові щурів II групи після моделювання ХГ ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/термін	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
АлАТ (Од/л)	54,8±0,3	107±2,7*	117,6±4,7*	85,7±3,1*»
АсАТ (Од/л)	64,2±0,2	524±5,6*	487±3,7*»	210±4,4*»
Загальний білірубін (мкмоль/л)	1,4±0,01	5,1±0,3*	5,2±0,3*	2,7±0,2*»
Загальний білок (г/л)	98±2,8	29,6±3,3*	38,3±1,6*»	66,8±2,1*»

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

4.1.2 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту на 28-у добу експерименту

На 28-у добу від початку експерименту розміри печінки були достовірно зменшені у порівнянні з контрольною групою, колір органу червоно-коричневий, капсула тьмяна.

Спостерігається суттєве порушення балочної структури органу. Виявляється набряк та повнокров'я стромы, виразні некробіотичні зміни у вигляді вогнищевих некрозів гепатоцитів, поява локусів з «тінями» клітин. Судини виглядають повнокровними, з наявністю стазів та ознак сепарації плазми в них. Спостерігається виразно неоднорідна будова гепатоцитів, наявний поліморфізм ядер. Навколо деяких зон некрозу відмічаються значні ділянки клітинних інфільтратів, що містять лімфоїдні клітини, гістіоцити та клітини макрофагального типу (рис.4.3).

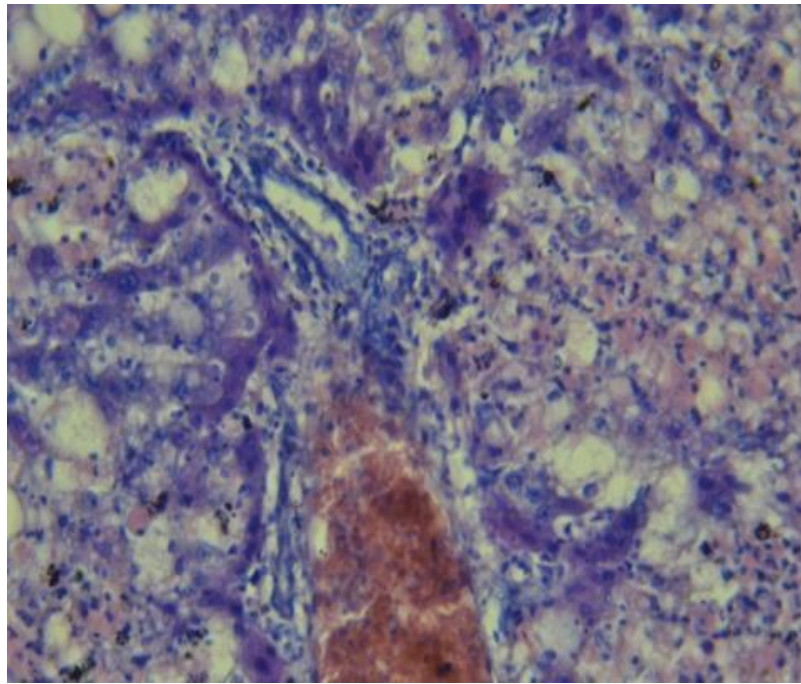


Рисунок 4.3 - Печінка щура II групи з модельованим ХГ на 28-у добу експерименту: виразна лімфогістіоцитарна інфільтрація, зменшення гепатоцитів з наявністю «тіней» клітин, повнокров'я судин.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 200.

Вміст лейкоцитів та лімфоцитів на 28-у добу експерименту зростає порівняно з попереднім терміном: на 14,3 % та 17,4 % відповідно (різниця є достовірною). У порівнянні з контролем кількість лейкоцитів стає в 4 рази вищою, а лімфоцитів – на 60 % нижчою ($p < 0,05$). Кількість еритроцитів достовірно не відрізняється від показника попереднього терміну, становлячи $5,2 \times 10^{12}/л$, і залишається значно нижчою (на 23 %) за показник контролю ($p < 0,05$). Вміст гемоглобіну достовірно не відрізняється ані від контролю, ані від показників попереднього терміну (табл.4.1). Подібна тенденція характерна й для тромбоцитів: помірне зниження порівняно з попереднім терміном та контролем, але ця різниця не має статистичної достовірності.

На 28-у добу експерименту виявляється, що активність АЛАТ продовжує зростати, і вже майже на 90 % перевищує значення контрольної групи, активність АсАТ помірно знижується порівняно з попереднім терміном, але залишається у 2,4 рази вищою за показник контрольної групи тварин (табл.4.2).

Вміст загального білірубіну практично не відрізняється від показників попереднього терміну, залишаючись в 3,7 рази вищим за контрольний показник (табл.4.2). Вміст загального білку зростає майже на 30 % порівняно з попереднім терміном, але становить лише 40 % від показника контролю, що свідчить про тривалість запального процесу і стале порушення функціональної здатності печінки.

4.1.3 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання хронічного гепатиту на 56-у добу експерименту

Через 8 тижнів від останнього введення чотирьохлористого вуглецю розміри печінки різко зменшені, колір блідий, поверхня тьмяна. Капсула печінки щільна.

При патоморфологічному дослідженні виявляються гранули гемосидерину, ознаки гідропічної дистрофії. В поодиноких ділянках спостерігається центролобулярний некроз, атрофія трабекул. Виявляється значне розширення порталних трактів. Поміж широких сполучнотканинних ділянок розташовані монолобулярні вузлики, що містять переважно, еластичні волокна (рис.4.4, 4.5). В цілому гістологічна картина тканини печінки представляється майже такою, що й у попередньому терміні спостереження, що свідчить про хронізацію патологічного процесу в органі. В деяких ділянках тканини печінки спостерігається процес репаративної регенерації за рахунок сполучної тканини, що утворюється. Гепатоцити, які залишилися, не мають ознак підготовки до вступу у клітинний поділ. Такий стан тканини органу загалом відповідає аналізу складу формених елементів крові, коли вміст лейкоцитів перевищує показник контролю в 2,1 рази, хоча й знижується майже вдвічі порівняно з попереднім терміном; вміст лімфоцитів дещо зростає порівняно з попереднім терміном – на 18,5 %, але є значно нижчим за показник контролю – на 32 %; відносно попереднього терміну спостереження мало зростає вміст еритроцитів – на 11,2 % ($p < 0,05$), а вміст гемоглобіну достовірно від нього не відрізняється, і є нижчим на 17,6 % контрольного показника

($p < 0,05$); вміст тромбоцитів є достовірно нижчим за показники попереднього терміну та контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.4.1).

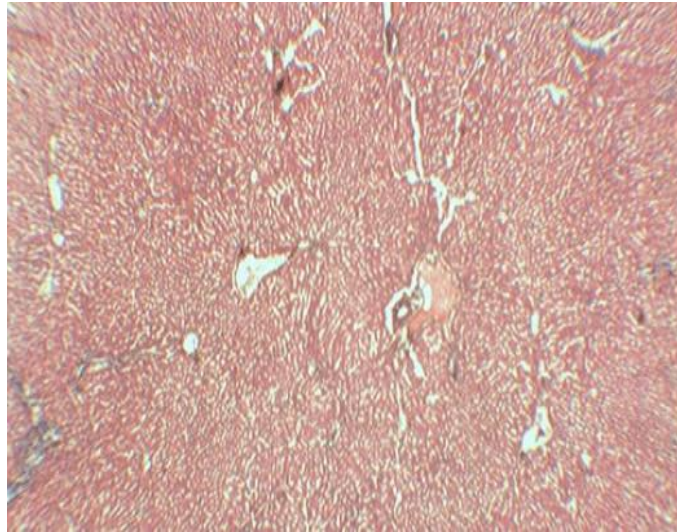


Рисунок 4.4 - Печінка тварин на 56-у добу моделювання ХГ – вогнищева лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, склероз та розширення портальних трактів, дисконкомплексація печінкових балок. Забарвлення гематоксилин-еозин, зб. x 100.

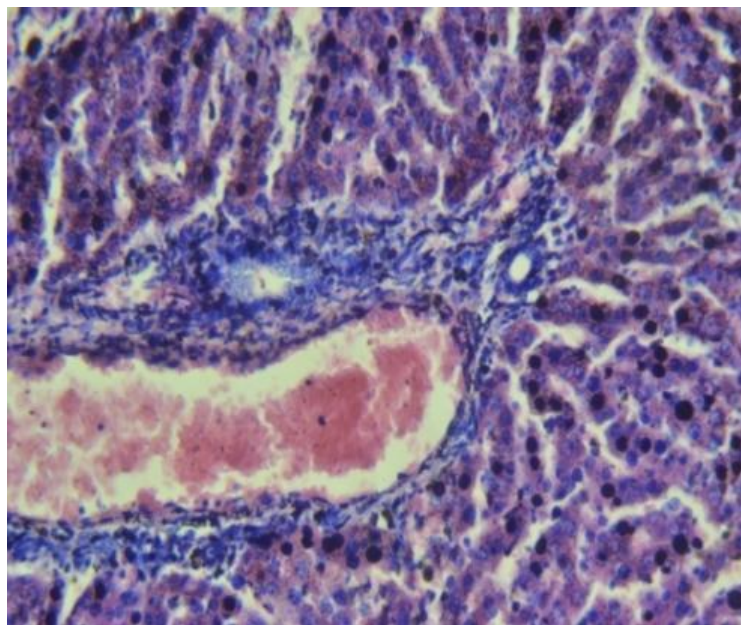


Рисунок 4.5 - Печінка тварин на 56-у добу моделювання ХГ – помірна лімфогістіоцитарна інфільтрація, розширення портальних трактів, дегенерація гепатоцитів. Забарвлення гематоксилин-еозин, збільшення x 200.

Активність АЛАТ знижується на 27, 3 % порівняно з попереднім терміном, що на 20 % нижче показника 14-ої доби, і залишається на 43,6 %

вищою показника контрольної групи тварин. Активність АсАТ знижується на 56,8 % порівняно з показником 28-ої доби, становить лише 40 % від показника 14-ої доби, та все ще в 3,3 рази перевищує показник контрольної групи. Вміст загального білірубіну майже вдвічі знижується у порівнянні з показником 28-ої доби, і перевищує показник контролю на 93 %. Вміст загального білка зростає на 74,4 % порівняно з 28-ою добою, і у 2, 3 рази – порівняно з показником 14-ої доби, але становить лише 68,2 % від показника контролю (табл. 4.2), тобто через 4 тижні експерименту все ще спостерігаються ознаки порушення білок-синтезуючої функції печінки, а з огляду на те, що гепатоцити мають виробляти білки для розбудови клітинних мембран, гормонів, біологічно активних речовин, та ін., гістологічна картина хронічного гепатиту являється цілком передбаченою.

4.2 Характеристика стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання хронічного гепатиту

Імунологічне дослідження крові експериментальних тварин II групи на 14-у добу експерименту показало, що вміст досліджуваних прозапальних цитокінів значно підвищується у порівнянні з контрольною групою тварин: рівні ІЛ-2 та ІЛ-6 зростають на 84 % та 67 % відповідно (табл. 4.3).

Таблиця 4.3 - Вміст цитокінів у крові щурів II групи з модельованим ХГ (пг/мл) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Термін спостереження/ Показник	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
ІЛ-2	16,7±0,04	30,7±1,6*	24,0±0,07*«	25,4±0,06*
ІЛ-6	75,3±0,76	125,8±0,81*	64,8±0,74*«	102,4±1,2*«

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

На 28-у добу експерименту рівень ІЛ-2 дещо зростав у порівнянні з попереднім терміном, але ця різниця не була достовірною; був на 17,2 % нижчим за показник 14-ої доби та залишався понад 50 % вищим за контрольну групу ($p < 0,05$) (табл.4.3). Рівень ІЛ-6 зростав на 58 % порівняно з попереднім терміном, виявився майже на 20 % нижчим за показник 14-ої доби, перевищуючи показник контрольної групи на 52 % ($p < 0,05$) (табл.4.3).

Вимірювання вмісту прозапальних цитокінів на 56-у добу експерименту показало, що в даному терміні спостерігається суттєве зниження вмісту досліджуваних цитокінів порівняно з попереднім терміном спостереження: ІЛ-2 – на 22 %, ІЛ-6 – майже на 86 %, але у порівнянні з показниками контрольної групи тварин рівень ІЛ-2 все ще залишався на 44 % вищим, а рівень ІЛ-6 став на 14 % нижчим ($p < 0,05$) (табл.4.3).

Таким чином, результати патоморфологічного дослідження печінки тварин після введення чотирихлористого вуглецю, вимірювання вмісту формених елементів та біохімічних показників крові, демонструють, що обрану модель патології можна вважати адекватною поставленій меті: досліджувані показники демонструють розвиток активного фіброзу печінки, що відповідає клінічному діагнозу «хронічний гепатит» [227].

4.3 Морфо-функціональний стан печінки щурів за умов моделювання цирозу печінки

Цей підрозділ містить інформацію щодо результатів моделювання цирозу печінки шляхом внутрішньошлункового введення чотирихлористого вуглецю концентрацією 50 % та заміщенням питної води розчином етилового спирту концентрацією 10 % протягом 150 діб.

4.3.1 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 14-у добу експерименту

У тварин з модельованим ЦП на 14-у добу макроскопічно печінка бліда, місцями насиченого бурого кольору, спостерігаються дрібновузлові утворення; розміри печінки дещо зростають порівняно з контрольною групою, виявляється значне розростання сполучнотканинних тяжів та утворення хибних часточок (рис.4.6). Скрізь наявні осередки скупчень гепатоцитів без ядер з вакуолями у цитоплазмі, а також осередки балонної дистрофії (рис.4.7). Виявляється розширення портальних трактів, фіброзування судинних стінок із вогнищевими явищами їх гіалінозу та значною периваскулярною лімфогістіоцитарною та макрофагальною інфільтрацією.

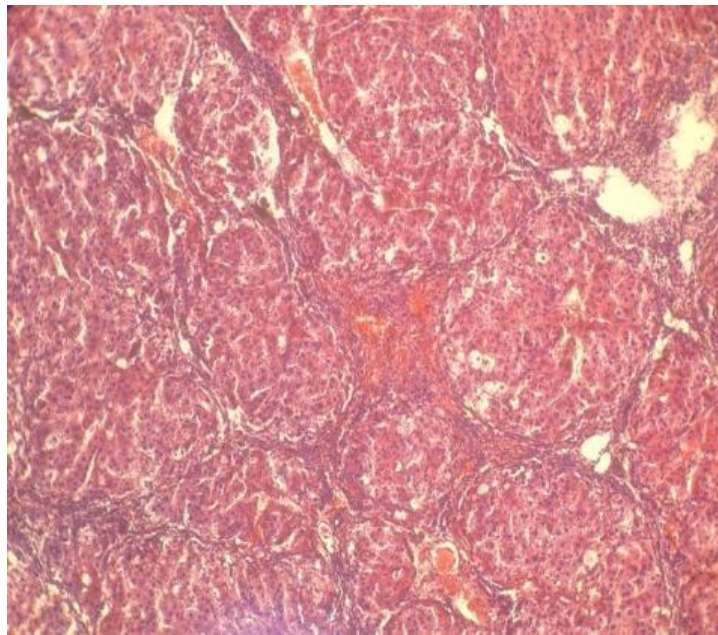


Рисунок 4.6 - Печінка щура на 14-й день після закінчення моделювання цирозу печінки: розростання сполучнотканинних тяжів та утворення хибних часточок. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

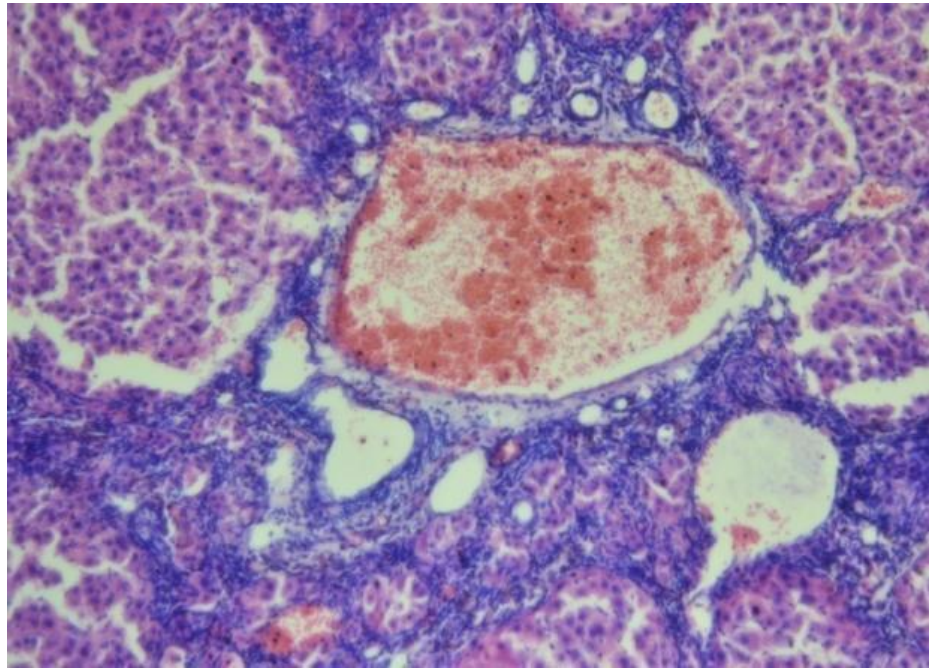


Рисунок 4.7 - Печінка щура на 14-й день після закінчення моделювання цирозу печінки: мікро-, макронодулярний цироз, що формується, ознаки дрібнокапельної жирової дистрофії гепатоцитів, повнокров'я синусоїдів та вогнищевий гіаліноз стінки судин, нерівномірно виражена запальна інфільтрація. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 200.

В крові спостерігається значне зростання вмісту лейкоцитів – в 4,3 рази, зниження вмісту лімфоцитів та еритроцитів майже вдвічі, вмісту гемоглобіну – на 83, 3 % у порівнянні з контролем (табл.4.3.1).

Таблиця 4.4 - Динаміка змін складу формених елементів крові щурів III групи з модельованим ЦП ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/№ тварини	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
1	2	3	4	5
Лейкоцити $\times 10^9 / л$	$8,0 \pm 0,4$	$34,5 \pm 0,9^*$	$36,7 \pm 1,5^*$	$28,3 \pm 1,6^{*»}$
Лімфоцити $\times 10^9 / л$	$4,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,3^*$	$2,2 \pm 0,1^{*»}$	$3,4 \pm 1,1^{*»}$
Еритроцити $\times 10^{12} / л$	$6,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3^*$	$3,2 \pm 0,4^*$	$2,8 \pm 0,1^{*»}$
Гемоглобін г/л	$117 \pm 6,9$	$97,5 \pm 2,2^*$	$58,4 \pm 4,4$	$42,6 \pm 3,1^{*»}$

Продовження таблиці 4.4

1	2	3	4	5
Тромбоцити $\times 10^9$ / л	201,3 \pm 7,6	69,2 \pm 4,1	48,8 \pm 2,7*»	44,3 \pm 4,2*

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

Дослідження біохімічних показників крові щурів III групи показало, що на 14-у добу моделювання ЦП відбувається суттєве підвищення активності цитолітичних ферментів. Так активність АЛАТ зростає в 4,5 рази, АсАТ – в 3,4 рази порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$) (табл.4.5). Внаслідок інтенсивної руйнації гепатоцитів відбувається різке підвищення вмісту загального білірубину – майже в 5 разів, в той час, коли спостерігається значне пригнічення білок-синтезуючої функції печінки, результатом чого стає зниження вмісту загального білку в 5,2 рази порівняно з тваринами контрольної групи ($p < 0,05$, що є достовірною різницею).

Таблиця 4.5 - Аналіз біохімічного складу крові щурів III групи після моделювання ЦП ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/термін	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
АЛАТ (Од/л)	54,8 \pm 0,3	246,6 \pm 8,1*	286,4 \pm 7,5*	223,6 \pm 12,3*
АсАТ (Од/л)	64,2 \pm 0,2	220,1 \pm 11,2*	395,4 \pm 12,8*	382,3 \pm 14,2*»
Загальний білірубін (мкмоль/л)	1,4 \pm 0,01	6,8 \pm 1,2*	10,7 \pm 1,6*»	8,4 \pm 0,8*»
Загальний білок (г/л)	98 \pm 2,8	18,9 \pm 2,2*	16,5 \pm 1,8*	25,7 \pm 1,3*»

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

4.3.2 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 28-у добу експерименту

Через 4 тижні експерименту розміри печінки знижались порівняно з контрольною групою та попереднім терміном спостереження, переважна площа печінки темно-бурого кольору.

Мікроскопічно у тваринт III групи подекуди виявляється порушення структури печінкових часточок за рахунок формування сполучнотканинних тяжів (рис. 4.8). У гепатоцитах наявні дистрофічні зміни: клітини набряклі, подекуди спостерігаються дрібні спустошені вакуолі з дислокованим ядром до периферії, осередки помутніння цитоплазми (рис. 4.9). Судини повнокровні, подекуди нерівномірно наповнені, склерозовані. Відмічаються явища діapedезних крововиливів, помірна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація.

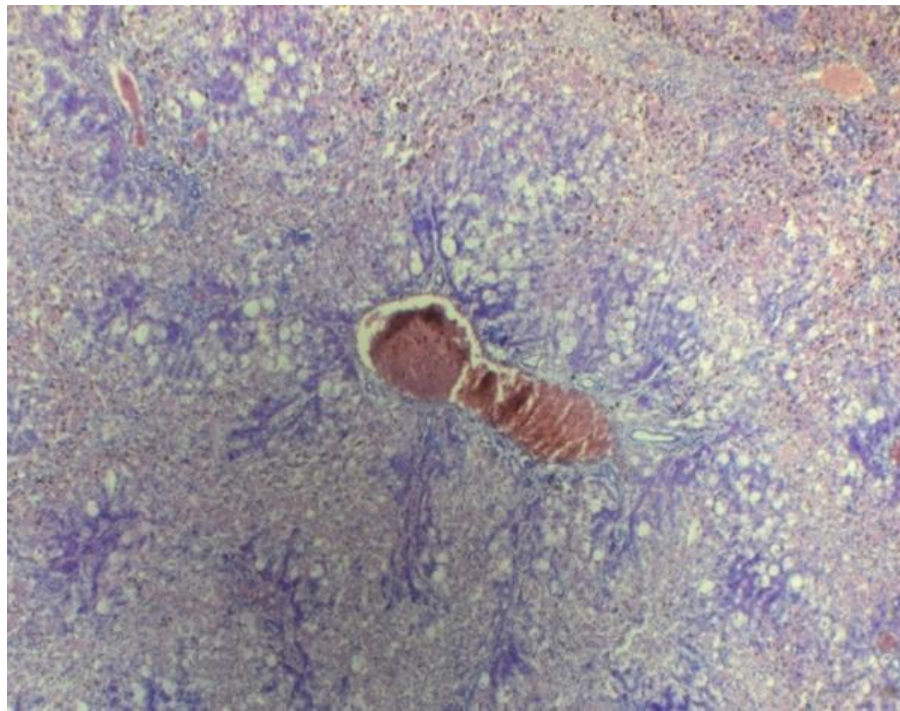


Рисунок 4.8 - Печінка щура на 28-й день після закінчення моделювання цирозу печінки: вогнища некрозу, значна лімфо-гістіоцитарна інфільтрація, повнокров'я судин з явищами склерозу, холестази, крупнокрапельна жирова дистрофія гепатоцитів, вогнища випадання гемосидерину. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

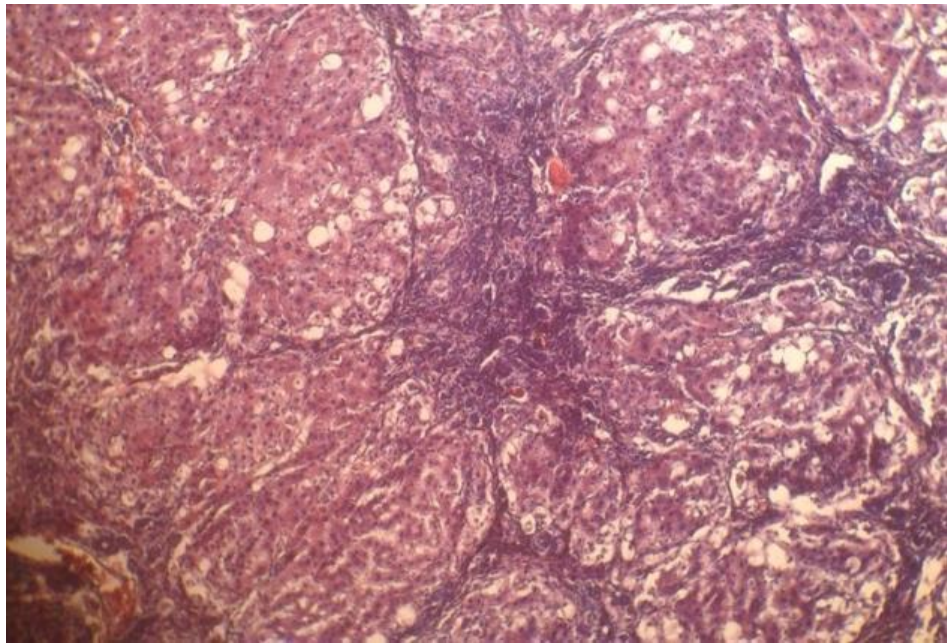


Рисунок 4.9 - Печінка щура на 28-й день після закінчення моделювання цирозу печінки: сформований мікро-макронодулярний цироз, повнокров'я судин з явищами склерозу, холестази, крупнокапельна жирова та білкова дистрофія гепатоцитів, значна лімфогістіоцитарна інфільтрація, набряк та склероз стінок судин зі звуженням їх просвіту. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

В крові експериментальних тварин зберігаються явища лейкоцитозу, лімфоцитопенії, вміст еритроцитів складає лише половину від групи контролю, тотожня тенденція характерна і для гемоглобіну, вміст якого також значно знижується порівняно з попереднім терміном спостереження, і становить лише 60 % від його показника (всі значення достовірні) (табл.4.4). Також продовжується зниження вмісту тромбоцитів: майже на 30 % порівняно з попереднім терміном, і складає лише чверть від показника контролю ($p < 0,05$).

Активність АлАт та АсАТ продовжує зростати, і становить 116, 1 % та 180 % відповідно, у порівнянні з попереднім терміном, та в 5,2 й 6,2 рази вище, ніж ці показники контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.4.5). Також продовжується підвищення вмісту загального білірубіну – на 57,4 % - у порівнянні з попереднім терміном та в 7,6 рази – у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (табл.4.5). Вміст загального білку продовжує знижуватись, і стає майже в 6

разів нижче показника контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.4.5). Такі низькі показники функціональної активності печінки характеризують її катастрофічний стан, що також підтверджується морфологічною картиною, та відповідає майже термінальній стадії цирозу печінки.

4.3.3 Морфо-функціональний стан печінки за умов моделювання цирозу печінки на 56-у добу експерименту

На 56-у добу печінка має бурий колір, тьмяну поверхню, порівняно збільшені розміри.

Мікроскопічно спостерігається гіперемія, білірубіностаз, ділянки централобулярного некрозу, ознаки гідропічної дистрофії, виразна лімфогістіоцитарна інфільтрація, проліферація сполучної тканини з формуванням вузлів-регенератів (хибних часточок) та сполучнотканинних септ (рис.4.10).

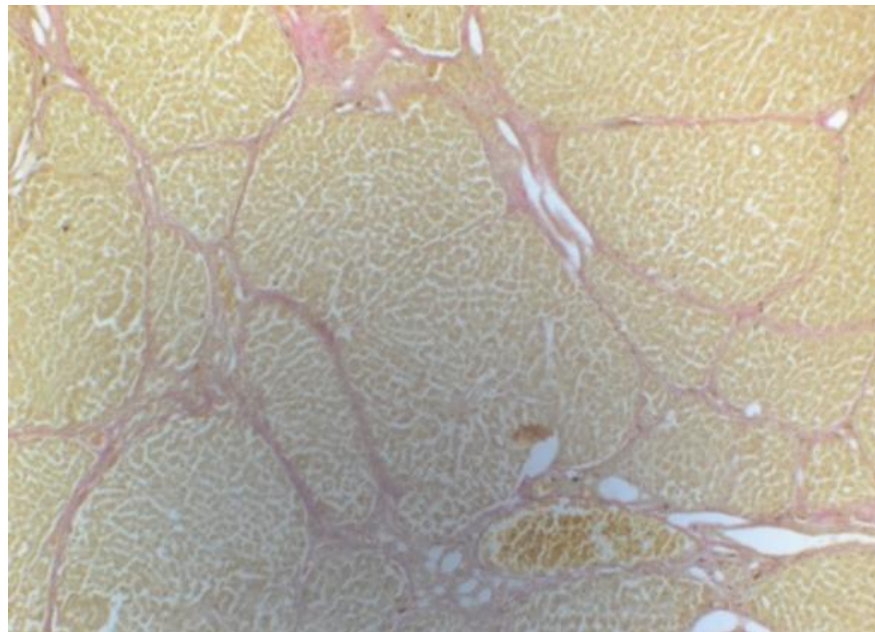


Рисунок 4.10 - Печінка щура на 56-й день після закінчення моделювання цирозу печінки: гіперемія, сформований мікро-макронодулярний цироз, незначна лімфогістіоцитарна інфільтрація.

Забарвлення: Ван-Гізон, збільшення $\times 100$.

В крові експериментальних тварин – помірне зниження вмісту лейкоцитів у порівнянні з попередніми термінам ($p < 0,05$), але навіть таке явище суттєво не

впливає на різницю з показником контрольної групи – вона все ще демонструє підвищення в 3,5 рази ($p<0,05$) (табл.4.4). Зростає вміст лімфоцитів – на 54,5 % порівняно з попереднім терміном ($p<0,05$), хоча й залишається на 27, 6 % нижче рівня контрольної групи ($p<0,05$) (табл.4.4).

Активність ферментів цитолізу знижується порівняно з попереднім терміном, але ці показники не є статистично достовірними (табл.4.5). Вміст загального білірубіну у порівнянні з попереднім терміном знижується на 21, 5 %, а загального білку – зростає на 56 % ($p<0,05$), але ці показники все ще залишаються надзвичайно низькими порівняно з даними контрольної групи ($p<0,05$) (табл.4.5).

4.4 Характеристика стану прозапальної ланки системи цитокінів щурів за умов моделювання цирозу

У щурів III групи після закінчення моделювання цирозу печінки на 14-у добу експерименту вміст ІЛ-2 та ІЛ-6 стрімко зростав і становив $34,6\pm 1,2$ та $183, 7 \pm 2,8$ пг/мл, в той час як на 28-у добу їх рівень суттєво знижувався у порівнянні з контрольною групою, при цьому рівень ІЛ-6 майже сягав значень контрольної групи, в той час коли рівень ІЛ-2 залишався достовірно вищим за показник контролю (табл.4.6).

Таблиця 4.6 - Вміст цитокінів у крові щурів III групи з модельованим ЦП (пг/мл) ($M\pm m$, $p<0,05$)

Термін спостереження/ Показник	Контроль	14-а доба	28-а доба	56-а доба
ІЛ-2	$16,7\pm 0,04$	$34,6\pm 1,2^*$	$19,0\pm 1,2^{*\ll}$	$34,1\pm 0,4^*$
ІЛ-6	$75,3\pm 0,76$	$183,7\pm 2,8^*$	$77,2\pm 4,3^{*\ll}$	$104,3\pm 3,1^{*\ll}$

Примітка. *- $p<0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p<0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну.

На 56-у добу спостереження у щурів III групи знов відбувалося суттєве зростання вмісту як ІЛ-2, так і ІЛ-6, при цьому вміст ІЛ-2 зростає вдвічі, а ІЛ-6 – майже на 40 % у порівнянні з контролем ($p < 0,05$, різниця є достовірною). Порівняно з попереднім терміном, в свою чергу, відбувалося зростання майже на 80 % для ІЛ-2 та на 35, 1 % - для ІЛ-6 ($p < 0,05$, різниця є достовірною).

Відомо, що збільшення в крові вмісту ІЛ-2 є характерним для запальних процесів травного тракту, але тривала дія патогенних чинників призводить до виснаження імунної відповіді [4, 228], що ми й спостерігали в нашому дослідженні.

На 14-у добу експерименту спостерігалось збільшення рівня ІЛ-6 на 144 % ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою, згодом відбувалося коливання його вмісту, і в кінці експерименту все ще залишався значно вищим, ніж показник контрольної групи. ІЛ-6 має властивість стимулювання та регуляції імунної відповіді та процесів запалення. Також відомо, що у певних випадках він може чинити як про- так і протизапальний вплив [229, 230]. Саме такою особливістю ІЛ-6 можна пояснити пригнічення його синтезу на 28-у добу експерименту – результат виснаження первинної імунної відповіді на гостре ураження.

Отримані дані дають уявлення щодо реакції прозапальної ланки системи цитокінів при цирозі печінки, оскільки саме ІЛ-2 та ІЛ-6 беруть активну участь в регуляції процесів неоангіогенезу та утворення колагену фібробластами.

Матеріали даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [231 - 236]

РОЗДІЛ 5

КОРЕКЦІЯ ХРОНІЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ФІБРОЗУ ПЕЧІНКИ У ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ ЗБАГАЧЕНОЇ ТРОМБОЦИТАМИ ПЛАЗМИ

В п'ятому розділі наведені дані щодо впливу збагаченої тромбоцитами плазми на морфо-функціональний стан печінки та прозапальну ланку системи цитокінів тварин з модельованим токсичним гепатитом та цирозом печінки в динаміці перебігу патологічного процесу.

5.1 Ефективність корекції хронічного токсичного гепатиту

5.1.1 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 14-у добу експерименту

Через 2 тижні від початку експерименту розміри печінки помірно зменшені у порівнянні з контрольною групою, колір червоно-коричневий, поверхня блискуча, консистенція щільно-еластична.

Спостерігаються поодинокі мононодулярні вузлики, поруч з якими розташована велика кількість двоядерних гепатоцитів. Виявляються новоутворені судини та жовчні протоки в порталних трактах. В окремих місцях знайдені ділянки з явищами централобулярної лімфоцитарної інфільтрації. По всьому органу спостерігаються судини з суттєвим кровонаповненням. Виявляється помірне розширення порталних трактів.

В центрі часточок виявлено розростання сполучної тканини, помірний периваскулярний фіброз окремих волокнистих структур з явищами гіалінозу (рис.5.1, 5.2). В багатьох ділянках органу з'являється велика кількість дрібних новоутворених судин, що є ознакою неоангіогенезу. Оскільки в оточенні судин, які врастають в тканину печінки, знаходяться стовбурові та прогеніторні клітини, є всі підстави вважати, що вони стануть попередниками майбутніх гепатоцитів, тобто відбудеться не заміщення зруйнованої тканини

сполучнотканинним рубцем, а буде побудована тканина, тотожна втраченій внаслідок тривалого токсичного впливу чотирихлористого вуглецю.

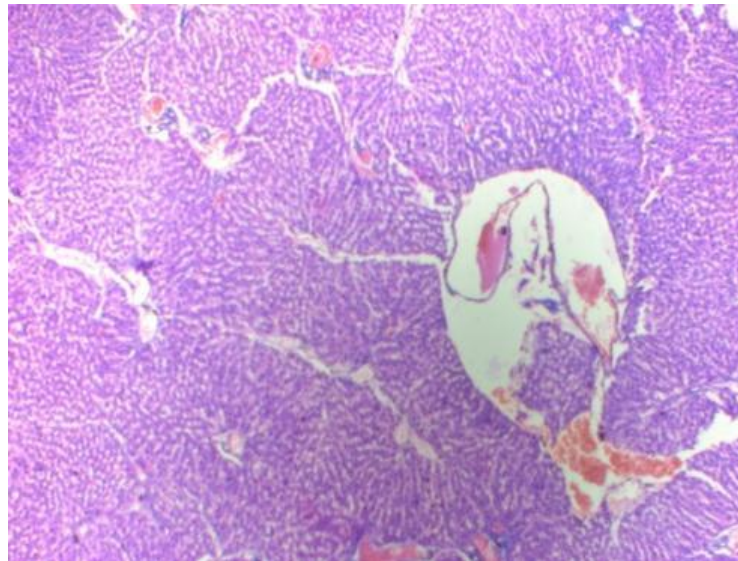


Рисунок 5.1 - Печінка тварин з ХГ на 14-у добу після останнього введення ЗТП – помірна периваскулярна переважно лімфогістоцитарна інфільтрація, повнокрів'я судин зі склерозом їх стінок. Забарвлення: гематоксилін-еозин.

Збільшення x 100.

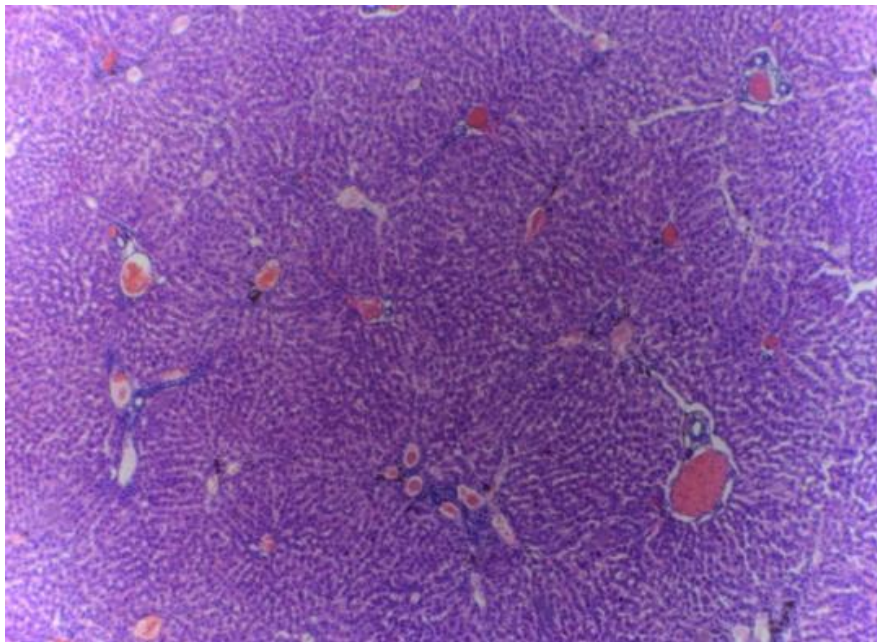


Рисунок 5.2 - Печінка тварин з ХГ на 14-у добу після останнього введення ЗТП – підсилення неоангіогенезу, відтворення цитоархітекτονіки органу.

Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення x 100.

В центрі часточок виявлено розростання сполучної тканини, помірний периваскулярний фіброз окремих волокнистих структур з явищами гіалінозу. У деяких тварин спостерігаються ознаки дрібнокрапельної жирової дистрофії гепатоцитів на периферії часточок (рис.5.3).

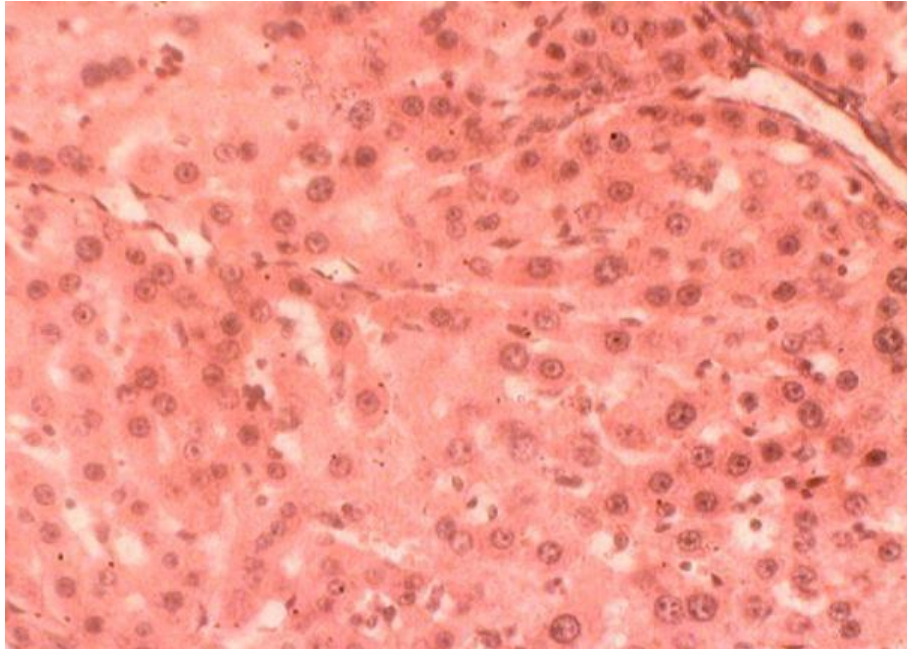


Рисунок 5.3 - Печінка тварин з ХГ на 14-у добу після останнього введення ЗТП – вузлова регенерація, дрібнокрапельна жирова дистрофія.

Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення x 200

Аналіз показників вмісту формених елементів крові на 14-у добу після останнього введення ЗТП на тлі моделювання хронічного гепатиту, показав, що кількість лейкоцитів на 19,5 % зростає по відношенню до групи без корекції ХГ, та у 4,2 рази – порівняно з контролем (табл.5.1), ($p < 0,05$). Вміст лімфоцитів після корекції зростав на 26 % порівняно з групою без корекції, та був на 39,3 % нижчим порівняно з показником контрольної групи (табл.5.1), ($p < 0,05$). Інші досліджувані показники – вмісту еритроцитів, гемоглобіну та тромбоцитів – хоча й демонстрували певні коливання, як відносно групи без корекції, так і відносно контрольної групи, але ці відмінності не мали статистичної достовірності (табл.5.1).

Таблиця 5.1 - Динаміка складу формених елементів крові щурів II та V групи (з модельованим ХГ та після його корекції ЗТП) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник/ термін / група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП
Лейкоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$8,0 \pm 0,4$	$28,2 \pm 1,6$ *	$33,7 \pm 1,3$ *	$32,0 \pm 1,2^*$ »	$24,2 \pm 1,1$ *»	$17,0 \pm 0,8$ *»	$12,6 \pm 1,2^*$ 2*»
Лімфоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$4,7 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,2^*$	$2,9 \pm 0,2^*$	$2,7 \pm 0,08^*$ »	$2,5 \pm 0,1^*$ »	$3,2 \pm 0,4^*$ »	$4,6 \pm 0,8$ »
Еритроцити $\times 10^{12} / \text{л}$	$6,6 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,7^*$	$5,4 \pm 0,6^*$	$5,2 \pm 0,7^*$	$6,2 \pm 0,5^*$ »	$5,8 \pm 0,4^*$ »	$6,3 \pm 0,7$
Гемоглобін г/л	$117 \pm 6,9$	$108 \pm 8,1$	$101 \pm 4,2$	$102 \pm 6,2$	$114 \pm 4,6$	$96,4 \pm 3,7$ *	$122 \pm 5,1$ 1
Тромбоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$201,3 \pm 7,6$	$206 \pm 3,9$	$208 \pm 4,1$	$196,2 \pm 4,9$	$227,2 \pm 6,8$	$188 \pm 3,1^*$ »	$221 \pm 4,6$ 6

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

Аналіз змін біохімічних параметрів крові тварин після корекції ХГ показав, що активність АЛАТ знижується майже на 20 %, АсАТ – 28 % у порівнянні з показниками II групи з ХГ без корекції, і зростає на 57,3 % та майже у 6 разів відповідно у порівнянні з показниками контрольної групи (табл.5.2), ($p < 0,05$). Вміст загального білірубіну знижується на 23,5 % порівняно з групою без корекції ХГ, та в 2,8 рази перевищує показник контрольної групи (табл.5.2), ($p < 0,05$). Вміст загального білку зростає на 21,3 % у порівнянні з групою без корекції ХГ, але становить лише 36,6 % від показника контрольної групи (табл.5.2), ($p < 0,05$).

Таблиця 5.2 - Аналіз біохімічного складу крові щурів II та V групи (з модельованим ХГ та після його корекції ЗТП) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник термін/ група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП
АлАТ (Од/л)	54,8±0,3	107±2,7*	86,2±2,3*	117,6±4,7 *	70,4±2,7 *»	85,7±3,1* »	56,0±2,1* »
АсАТ (Од/л)	64,2±0,2	524±10,6 *	377,6±9,3 *	487±12,7 *	308±9,6* »	210±4,4*» »	92,5±2,7* »
Заг-ний білірубін, мкмоль/л	1,4±0,01	5,1±0,3*	3,9±0,3*	5,2±0,3*	2,9±0,2*» »	2,7±0,2*» »	1,8±0,1*» »
Заг-ний білок, г/л	98±2,8	29,6±3,3 *	35,9±3,6* »	38,3±2,6* »	51,4±2,2* »	66,8±2,1* »	89,1±2,4 *»

Примітка. * - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

В результаті корекції хронічного гепатиту на 14-у добу експерименту у тварин спостерігалися такі зміни вмісту прозапальних цитокінів: вміст ІЛ-2 достовірно знижується на 11,7 % порівняно з групою без корекції, та на 62,3 % залишається вище показника контрольної групи (табл.5.3) ($p < 0,05$). Вміст ІЛ-6 стає на 13,8 % нижчим у порівнянні з групою без корекції, в той час як при порівнянні з показником контрольної групи його значення є на 44 % вищим (табл.5.3) ($p < 0,05$). Таке коливання рівнів прозапальних цитокінів, з одного боку, можна пояснити необхідністю активації запального процесу для початку регенерації, а з іншого – вже активним процесом відтворення тканини печінки, який на цей час проявляється підсилення неоангіогенезу та активацією зірчастих клітин печінки з підсиленням мітотичним поділом клітин паренхіми.

Таблиця 5.3 - Вміст цитокінів у крові щурів II та V групи (з модельованим ХГ та після його корекції ЗТП), (пг/мл) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Термін / показник / група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП	ХГ	ХГ+ ЗТП
ІЛ-2	16,7±0,04	30,7±1,6*	27,1±0,06 *	24,0±0,07 *«	19,1±0,2 »	25,4± 0,06*	17,2± 0,06
ІЛ-6	75,3±0,76	125,8±0,8 *	108,4±1,2 *	64,8±0,74 *«	73,7±0,6 »	102,4± 1,2*«	77,6± 0,7

Примітка. *- $p < 0,05$ – достовірні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

5.1.2 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 28-у добу експерименту

Через 4 тижні від початку експерименту виявлялися вогнища незначної периваскулярної інфільтрації, помірне фіброзування судинної стінки з помірно вираженим кровонаповненням судин (рис.5.4).

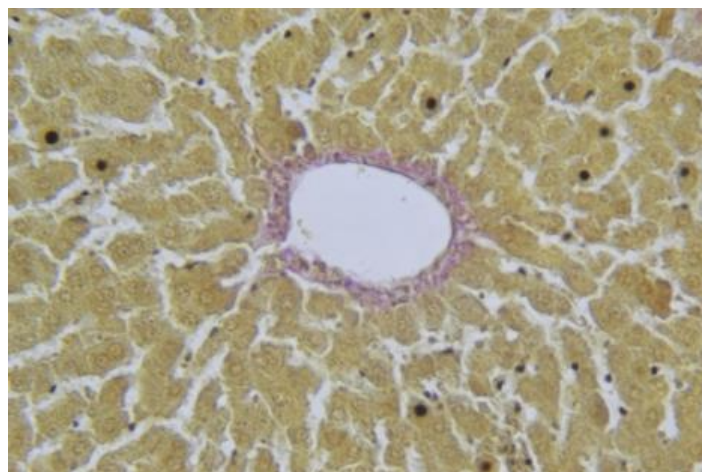


Рисунок 5.4 - Печінка щура з ХГ на 28-у добу після корекції ЗТП – ознаки периваскулярної інфільтрації, ущільнення судинної стінки. Забарвлення: Ван-Гізон, збільшення x 100.

Аналіз вмісту формених елементів крові показав, що в цей термін у тварин після введення ЗТП відбувається виражене зниження прояву запального процесу: вміст лейкоцитів знижується майже на чверть порівняно з групою без корекції, що є на 28,2 % нижче показника попереднього терміну, але він все ще залишається втричі вищим за контроль (табл. 5.1), ($p < 0,05$). Вміст лімфоцитів дещо знижується порівняно з групою без корекції, а також з попереднім терміном (на 13,8 %), і становить лише 53 % від показника контрольної групи (табл. 5.1), ($p < 0,05$). Вміст еритроцитів зростає на 14,8 % у порівнянні з попереднім терміном, і майже не відрізняється від показника контролю (табл. 5.1), ($p < 0,05$). Вміст гемоглобіну та тромбоцитів достовірно не відрізняється від показників попереднього терміну та контрольної групи (табл. 5.1), ($p < 0,05$).

Активність ферментів цитолізу на 28-у добу знижується на 40 % та 36,7 % відповідно, порівняно з показниками групи без корекції, а у порівнянні з попереднім терміном: АЛАТ знижується на 18,3 %, АсАТ – на 18,4 %, але їх значення все ще перевищують показники контрольної групи, при чому для АЛАТ ця різниця становить 128,5 %, тоді як для АсАТ – в 4,8 рази (табл. 5.2), всі дані статистично достовірні. Вміст загального білірубину знижується на 25,6 % порівняно з попереднім терміном, та майже вдвічі – порівняно з групою без корекції, і становить 207 % від показника контрольної групи (табл.5.2), ($p < 0,05$). Вміст загального білку зростає на 43 % порівняно з попереднім терміном, на 34, 2 % зростає у порівнянні з групою без корекції у відповідний термін, і становить 52,4 % від показника контролю ($p < 0,05$) (табл. 5.2).

На 28-у добу експерименту спостерігалось значне зниження рівнів досліджуваних цитокінів порівняно з попереднім терміном: ІЛ-2 – на 30 %, ІЛ-6 – на 32 %, становлячи $19,1 \pm 0,2$ та $73,7 \pm 0,6$ пг/л відповідно, таким чином, ці показники майже сягають показників контрольної групи, лише рівень ІЛ-2 на 14 % перевищував показник контрольної групи тварин (різниця є достовірною), (табл.5.3). При порівнянні результатів з показниками групи без корекції з'ясувалося, що вміст ІЛ-2 був на 20,5 % нижчим, а ІЛ-6 – на 13,7 % вищим у групі після введення ЗТП (табл.5.3), ($p < 0,05$). Зважаючи на отримані дані можна

зробити висновок про те, що в печінці експериментальних тварин продовжуються одночасно протікати процеси запалення та регенерації.

5.1.3 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку хронічного токсичного гепатиту та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 56-у добу експерименту

Через 8 тижнів від останнього введення збагаченої тромбоцитами плазми тваринам з експериментальним фіброзом печінки спостерігається нормалізація розмірів печінки, її поверхня – блискуча, однорідна, консистенція – тугоеластична.

В поодиноких ділянках виявляються ознаки білкової дистрофії гепатоцитів. Кількість двоядерних гепатоцитів різко зростає у порівнянні як з попереднім терміном дослідження, так і з контролем. В порталних трактах та септах виявлена велика кількість новоутворених судин та жовчних проток. Фіброзні перетинки різко потоншені, зменшений вміст колагенових судин. В центрі часточок спостерігається незначно виражений периваскулярний фіброз, помірно виражена дрібнокрапельна жирова дистрофія, також виявляються ділянки із сполучнотканинними тяжами (рис.5.5).

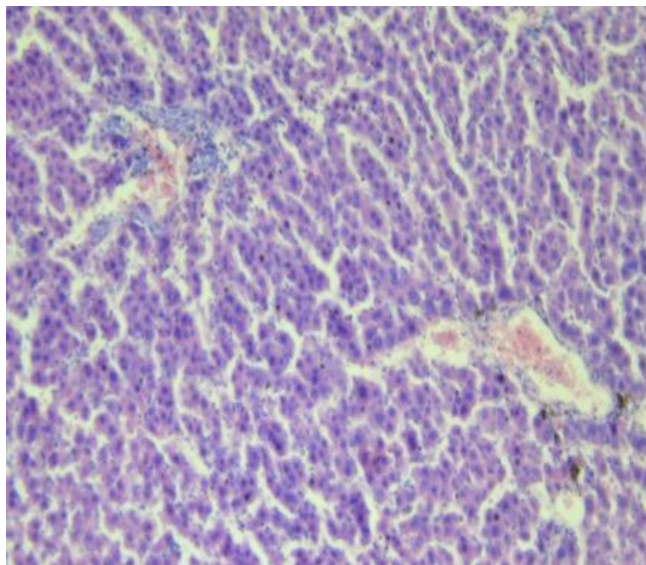


Рисунок 5.5 - Печінка щура з індукованим хронічним гепатитом та введенням ЗТП на 56-у добу експерименту – помірний периваскулярний фіброз.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

Такий стан гістоморфології печінки свідчить про активний розвиток пристосовно-компенсаторних та регенераційних процесів в печінці експериментальних тварин. Слід зазначити, що відбувається не репаративна регенерація, коли в некротизованих ділянках органу утворюється сполучна тканина, а спостерігається регенерація з повним відтворенням структури органу із збереженням її основних компонентів.

Вміст лейкоцитів знижався на 48 % порівняно з попереднім терміном, порівняно з показником 14-ої доби цей показник знижався майже втричі, в той час, коли у порівнянні з групою без корекції у відповідний термін цей показник був на 25 % нижчим, хоча й все ще у 1,6 рази перевищував показник контролю; вміст лімфоцитів продовжував зростати і на 84 % перевищував показник 28-ої доби, сягаючи значення контрольної групи (табл. 5.1). Вміст еритроцитів помірно зростав по відношенню до показника попереднього терміну, хоча різниця не була достовірною, а також по відношенню до показника 14-ої доби, перевищуючи його на 17 %, і не відрізнявся від показника контролю (табл. 5.1). Зростання вмісту гемоглобіну порівняно з попереднім терміном було недостовірним, хоча цей показник на 20,8 % перевищував показник 14-ої доби і сягав рівня контрольного показника ($p < 0,05$). Кількість тромбоцитів зростала на 12,8 % порівняно з попереднім терміном, і перевищувала значення контролю на 10 % (табл.5.1), ($p < 0,05$).

Активність АлАТ на 56-у добу експерименту продовжувала знижуватись: порівняно з показником попереднього терміну – на 20, 5 %, порівняно з показником 14-ої доби – на 35 %, і сягнула показника контролю ($p < 0,05$). Активність АсАТ також знижувалась: втричі – порівняно з попереднім терміном та майже в 4 рази – порівняно з показником 14-ої доби, достовірно не відрізняючись від показника контролю (табл. 5.2), ($p < 0,05$). Вміст загального білірубину знижався майже на 40 % порівняно з попереднім терміном, на 63,8 % - порівняно з показником 14-ої доби, але все ще перевищував показник контролю на 28,6 % (табл. 5.2), ($p < 0,05$). Вміст загального білку зростав на 73,3

% порівняно з попереднім терміном, був у 2,5 рази вищий за показник 14-ої доби, та лише на 9,1 % менший за показник контролю (табл. 5.2), ($p < 0,05$).

Вміст прозапальних цитокінів, що досліджували, суттєво не змінювався у порівнянні з показниками попереднього терміну: рівень ІЛ-2 дещо знижався, а ІЛ-6 – навпаки – зростав, і не відрізнявся від значень контрольної групи тварин (табл.5.3), ($p < 0,05$).

Таким чином, результати проведених досліджень демонструють, що застосування збагаченої тромбоцитами плазми для корекції фіброзних змін у печінці за умов експериментального хронічного гепатиту викликає розвиток низки морфологічних та функціональних змін в організмі щурів: поступове зтоншення та зникнення сполучнотканинних тяжів, відтворення цитоархітекtonіки органу, утворення великої кількості судин різного калібру; рівень прозапальних цитокінів поступово знижався, й наприкінці експерименту сягав значень контрольної групи; зберігався помірний лейкоцитоз; знижалась до рівня контрольної групи активність ферментів цитолізу; значною мірою відтворювалась білок-синтетична функція печінки.

Слід зазначити, що позитивні зміни експериментального лікування можна простежити вже починаючи з 14-ої доби після введення ЗТП, на 28-у добу печінка продовжує активно регенерувати, хоча одночасно можна спостерігати і наявність ознак запального процесу, а на 56-у добу більшість показників функціонального стану печінки та її морфологія майже не відрізняються від групи контролю. В цей же час, протягом всього терміну спостереження у тварин без лікування спостерігалось розростання сполучної тканини на площі всього органу, тоді як у тварин після введення ЗТП виявлялося достовірне збільшення новоутворених судин, зберігалася балкова структура печінкових часточок, а також збільшення кількості двоядерних гепатоцитів та синусоїдних клітин Купфера.

5.2 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою

5.2.1 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 14-у добу експерименту

Після введення ЗТП тваринам з модельованим ЦП печінка має коричневий колір, розміри зменшені, капсула тьмяна.

При гістологічному дослідженні виявляється розширення портальних трактів, локуси лімфогістіоцитарної інфільтрації, помірний периваскулярний фіброз (рис. 5.6, 5.7). На окремих ділянках спостерігаються двоядерні гепатоцити, а також новоутворені судини середнього та дрібного калібру. Виявляються судини з суттєвим кровонаповненням.

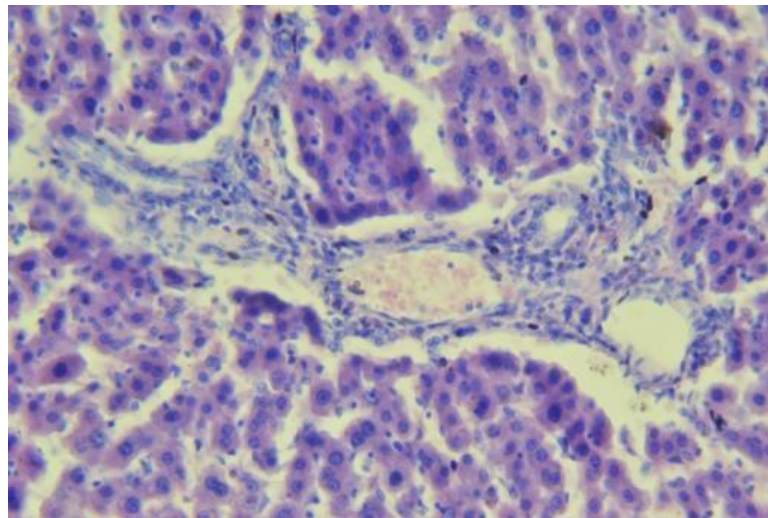


Рисунок 5.6 - Печінка щура з індукованим цирозом печінки та введенням ЗТП на 14-у добу експерименту – локуси лімфогістіоцитарної інфільтрації, помірний периваскулярний фіброз, поодинокі двоядерні гепатоцити.

Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 200.

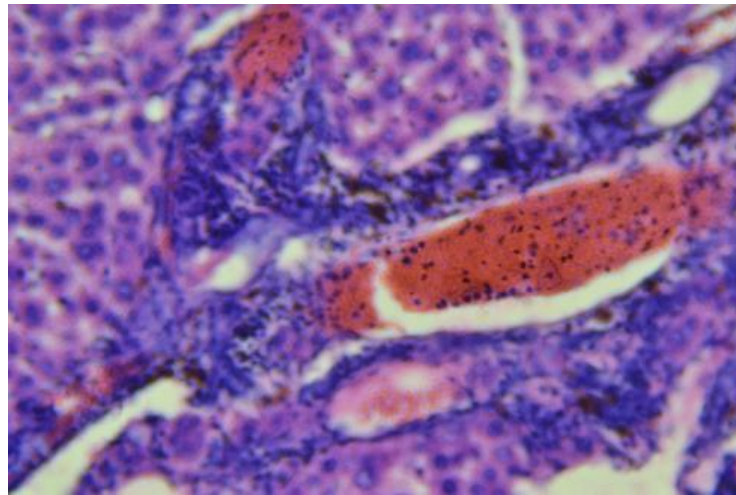


Рисунок 5.7 - Печінка щура з індукованим цирозом печінки та введенням ЗТП на 14-у добу експерименту – виразна лімфогістіоцитарна інфільтрація, помірно виражений периваскулярний фіброз, вогнища внутрішньоклітинного холестазу та випадіння гемосидеринового пігменту.

Забарвлення: гематоксилін-еозін, збільшення x 200.

Аналіз показників вмісту формених елементів крові на 14-у добу після останнього введення збагаченої тромбоцитами плазми на тлі моделювання цирозу печінки, показав, що кількість лейкоцитів значно знижувалася (майже на 60 %) порівняно з відповідним терміном групи без корекції, і в той же час була суттєво вищою (на 77,5 %) порівняно з контролем, і становила $14,2 \times 10^9/\text{л}$ ($p < 0,05$); вміст лімфоцитів зростав на 30,8 % відносно показника відповідного терміну III групи, але був понад чверть нижчим за дані контрольної групи (всі різниці достовірними) (табл. 5.4). Кількість еритроцитів достовірно не відрізнялась від показника відповідного терміну групи без корекції, та все ще залишалась вдвічі нижчою відносно контрольної групи тварин ($p < 0,05$), вміст гемоглобіну на 42,4 % був нижчим у порівнянні з показником відповідного терміну тварин III групи, і також майже вдвічі нижчим порівняно з контролем ($p < 0,05$) (табл.5.4). Кількість тромбоцитів зростала на 16,5 % порівняно з відповідним терміном групи без корекції, але становила лише 40 % від показника контрольної групи (табл. 5.4) ($p < 0,05$).

Таблиця 5.4 - Динаміка змін складу формених елементів крові щурів при моделюванні ЦП та після його корекції ЗТП – III та VI групи ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник / Термін / Група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ЦП	ЦП+ ЗТП	ЦП	ЦП+ ЗТП	ЦП	ЦП+ ЗТП
Лейкоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$8,0 \pm 0,4$	$34,5 \pm 0,9^*$	$28,2 \pm 1,6^*$	$36,7 \pm 1,5^*$	$24,8 \pm 0,9^*$ »	$28,3 \pm 1,6^*$ *»	$21,4 \pm 1,1^*$ *»
Лімфоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$4,7 \pm 0,1$	$2,6 \pm 0,3^*$	$2,5 \pm 0,2^*$	$2,2 \pm 0,1^*$ »	$2,8 \pm 0,4^*$ »	$3,4 \pm 1,1^*$ *»	$3,8 \pm 0,3^*$ »
Еритроцити $\times 10^{12} / \text{л}$	$6,6 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,3^*$	$3,3 \pm 0,4^*$	$3,2 \pm 0,4^*$	$4,5 \pm 0,3^*$ »	$2,8 \pm 0,1^*$ »	$4,8 \pm 0,1^*$ *»
Гемоглобін г/л	$117 \pm 6,9$	$97,5 \pm 2,2^*$	$56,2 \pm 1,6^*$	$58,4 \pm 4,4$	$50,8 \pm 3,1^*$	$42,6 \pm 3,1^*$ »	$69,4 \pm 2,8^*$ *»
Тромбоцити $\times 10^9 / \text{л}$	$201,3 \pm 7,6$	$69,2 \pm 4,1^*$	$80,6 \pm 2,3$	$48,8 \pm 1,7^*$ *»	$115,4 \pm 4,6^*$ *»	$44,3 \pm 4,2^*$	$120,2 \pm 3,7^*$ »

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

Вимірювання біохімічних показників крові («печінкові проби») показало, що у тварин після введення ЗТП на 14-у добу експерименту активності ферментів цитолізу різко падає у порівнянні з групою без корекції цирозу (табл.5.5). Так, активність АЛАТ знижується майже втричі, АсАТ – на третину, порівняно з III групою (ЦП без корекції), хоча на 57,3 % та в 5,9 разів відповідно перевищують показники контрольної групи (табл.5.5), ($p < 0,05$). Вміст загального білірубину становить 57,4 % від показника групи без корекції, але є в 2,8 рази вищим за показник контрольної групи (табл 5.5), ($p < 0,05$). Вміст загального білку суттєво зростає (майже на 90 %) порівняно з групою без корекції ЦП, але становить лише 62,4 % від показника контрольної групи тварин (табл. 5.5) (всі показники є достовірними, $p < 0,05$).

Таблиця 5.5 - Біохімічні показники крові щурів III та VI групи (з модельованим ЦП та після введення ЗТП) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Показник / Термін/ Група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ЦП	ЦП+ ЗТП	ЦП	ЦП+ ЗТП	ЦП	ЦП+ ЗТП
АЛАТ (Од/л)	54,8±0,3	246,6± 8,1*	179,4± 4,2*	286,4±7,5*	108,2± 3,1*»	223,6± 12,3*	66±2,1* »
АсАТ (Од/л)	64,2±0,2	220,1± 11,2*	218,5± 4,8*	395,4±12,8 *	204±4,2*»	382,3± 14,2*	212,5± 4,1»
Заг-ний білірубін (мкмоль/л)	1,4±0,01	6,8± 1,2*	6,3± 0,2*	10,7±1,6*»	4,5±0,3*»	8,4±0,8*»	2,3± 0,2*»
Заг-ний білок (г/л)	98±2,8	18,9± 2,2*	27,6± 1,7*	16,5±1,8*	45,7±1,6*	25,7± 1,3*»	61,2± 2,7*»

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

На 14-у добу експерименту у тварин після корекції ЦП збагаченою тромбоцитами плазмою рівень ІЛ-2 не відрізняється від групи без корекції в цей же термін, і вдвічі перевищує показник контрольної групи (табл.5.6).

Таблиця 5.6 - Вміст цитокінів у крові щурів III та VI групи (з модельованим ЦП та після введення ЗТП) ($M \pm m$, $p < 0,05$)

Термін / Показник, пг/мл / група	К-ль	14-а доба		28-а доба		56-а доба	
		ЦП	ЦП+ЗТП	ЦП	ЦП+ЗТП	ЦП	ЦП+ЗТП
ІЛ-2	16,7± 0,04	34,6±1,2*	35,0±1,3*	19,0±1,2 *»	21,6±1,4* »	34,1±0,4* »	18,8±0,6* »
ІЛ-6	75,3± 0,76	183,7±2,8 *	162,5±2,2 *	77,2±4,3 *»	54,8±2,0* »	104,3±3,1 *»	60,4±1,4* »

Примітка. *- $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в контрольних спостереженнях; » - $p < 0,05$ – вірогідні розбіжності досліджуваного показника порівняно з таким в спостереженнях попереднього терміну відповідної групи.

Вміст ІЛ-6 виявляється на 11, 5 % нижчим за показник групи без корекції та у 2,2 рази перевищує показник тварин контрольної групи (табл.5.6), ($p < 0,05$).

5.2.2 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 28-у добу експерименту

Через 4 тижні експерименту печінка тварин червоно-коричневого кольору, має глянцеvu поверхню, розміри дещо зменшені.

В тканині печінки зберігаються явища помірнього холестазу, з'являються вогнища двоядерних гепатоцитів, зниження об'єму клітинної інфільтрації, нерівномірне наповнення кровоносних судин (рис.5.8, 5.9).

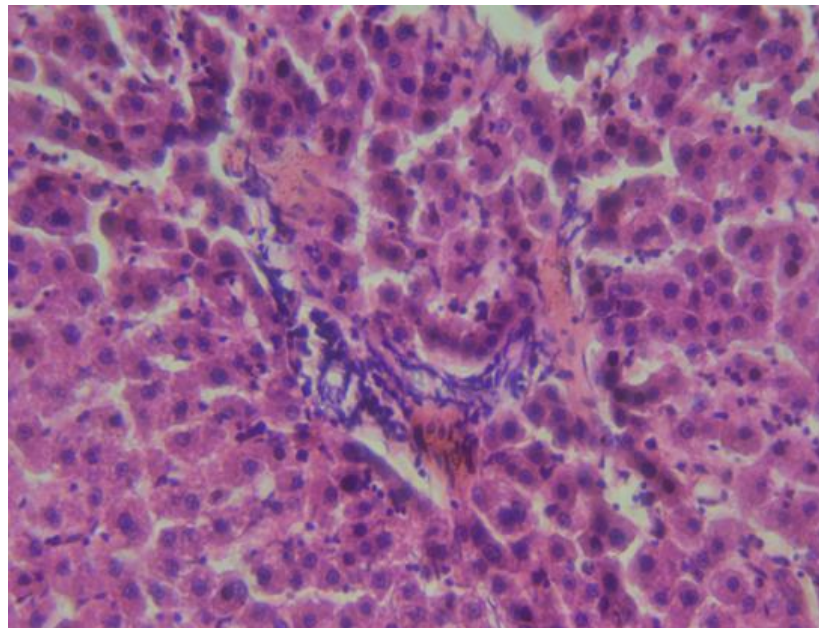


Рисунок 5.8 - Печінка щура з індукованим цирозом печінки та введенням ЗТП на 28-у добу експерименту – нерівномірне наповнення кровоносних судин, помірний периваскулярний фіброз. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 200.

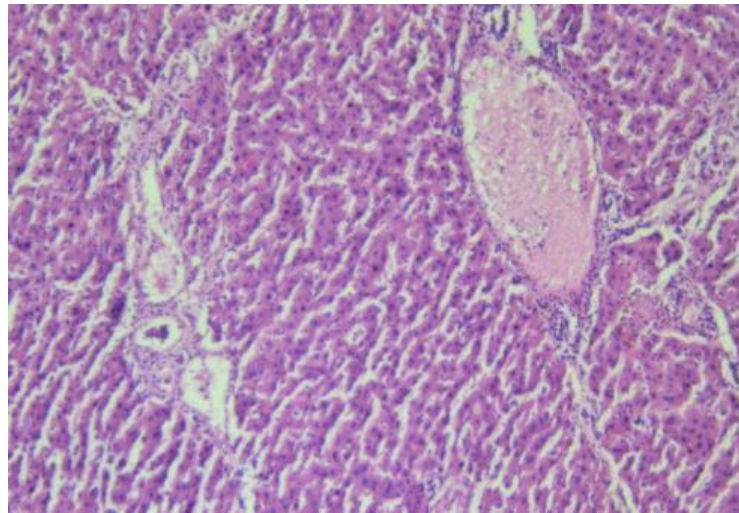


Рисунок 5.9 - Печінка щура з введенням ЗТП на тлі цирозу на 28-у добу експерименту – помірно виражений фіброз, повнокрів'я портальних трактів з ознаками сепарації плазми, вогнищева переважно лімфогістіоцитарна інфільтрація, скупчення двоядерних гепатоцитів. Забарвлення: гематоксилін-єозин, збільшення $\times 100$.

У експериментальних тварин на 28-у добу після корекції ЦП спостерігається зниження вмісту лейкоцитів на 12 % у порівнянні з попереднім терміном, водночас у порівнянні з групою без корекції цей показник знижується на 32,4 %, але все ще втричі перевищує показник контрольної групи тварин (табл.5.4), ($p < 0,05$). Кількість лімфоцитів зростає майже на 12 % у порівнянні з попереднім терміном спостереження, на 27,3 % - порівняно з групою без корекції, хоча все ще становить лише 60 % від показника контролю (табл.5.4), ($p < 0,05$). На 36,4 % зростає вміст еритроцитів порівняно з попереднім терміном, що становить 68,2 % від показника контрольної групи (табл.5.4), ($p < 0,05$). Натомість, вміст гемоглобіну дещо знижується як у порівнянні з попереднім терміном, так і у порівнянні з групою без корекції, і становить лише 43,4 % від показника контрольної групи (табл.5.4), ($p < 0,05$). Кількість тромбоцитів зростає на 43,2 % порівняно з попереднім терміном, і в 2,4 рази перевищує показник групи без корекції, залишаючись на 52,7 % нижчою від показника контрольної групи (табл.5.4), ($p < 0,05$).

На 28-у добу після корекції ЦП активність АЛАТ знижується на 40 % відносно попереднього терміну і майже на 60 % - відносно групи без корекції у відповідному терміні, але все ще може вдвічі перевищує показник контролю ($p < 0,05$) (табл.5.4). Активність АсАТ дещо знижується у порівнянні з показником попереднього терміну, але ця різниця не є достовірною, в той же час у порівнянні з групою без корекції вона стає нижчою на 48,6 %, хоча втричі перевищує показник контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.5.4).

Вміст ІЛ-2 знижується майже на 40 %, а ІЛ-6 – більше, ніж втричі, відносно попереднього терміну, при цьому вміст ІЛ-2 на 29,3 % перевищує показник контролю, в той час, коли вміст ІЛ-6 становить 72,8 % контрольного показника ($p < 0,05$) (табл.5.6)

5.2.3 Морфо-функціональний стан печінки за умов розвитку цирозу печінки та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою на 56-у добу експерименту

На 56-у добу експерименту печінка тварин червоно-коричневого кольору, поверхня органу блискуча, розміри дещо зменшені.

В тканині печінки відбувається активна проліферація судин та гепатоцитів, виокремлюється балочна структура органу, зберігаються окремі ділянки з локусами помірної лімфогістіоцитарної інфільтрації (5.10, 5.11).

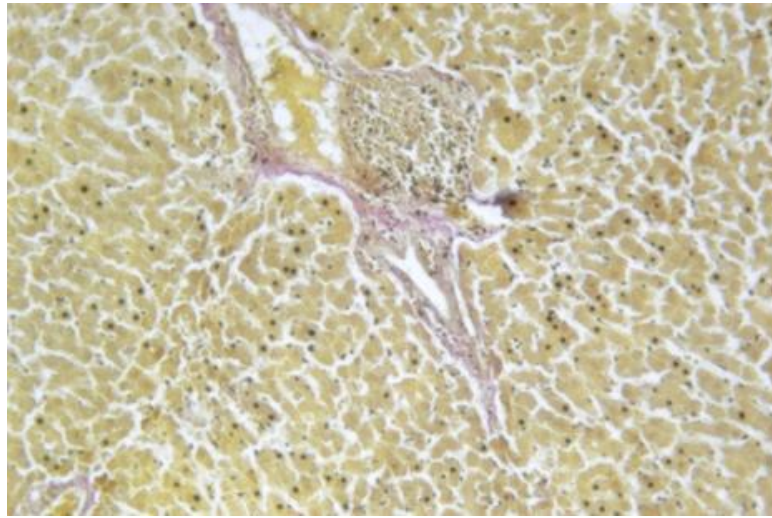


Рисунок 5.10 - Печінка щура з індукованим цирозом печінки та введенням ЗТП на 56-у добу експерименту – вогнищева слаюка лімфогістіоцитарна інфільтрація, нерівномірне наповнення кровоносних судин, помірний периваскулярний фіброз. Забарвлення: за Ван-Гізон, збільшення x 100.

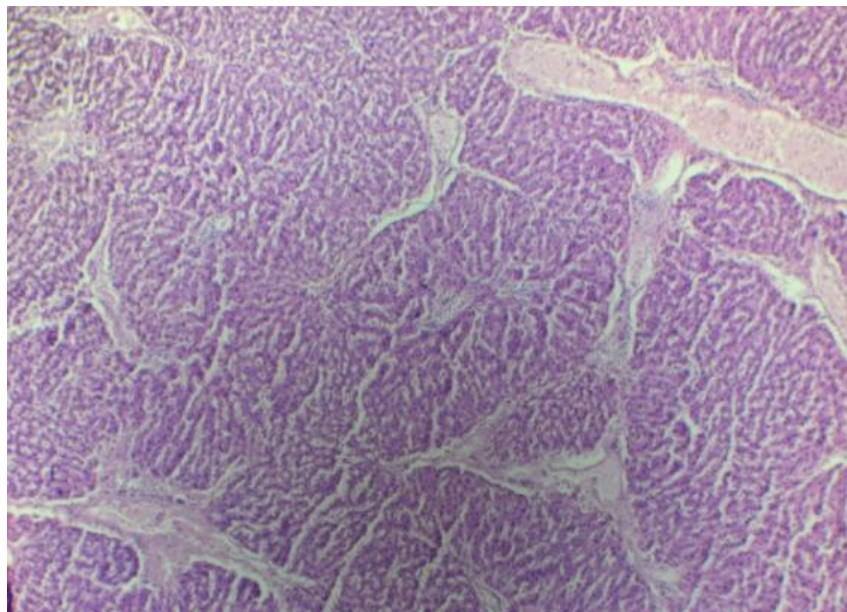


Рисунок 5.11 - Печінка щура з індукованим цирозом печінки та введенням ЗТП на 56-у добу експерименту – нерівномірно виражений (від слабкого до фокально помірного) периваскулярний фіброз, збереження часточкової структури органу. Забарвлення: гематоксилін-еозин, збільшення x 100.

В крові щурів на 56-у добу після корекції ЦП прояви запалення та анемії, що ми їх спостерігали на попередніх термінах дослідження, поступово гальмуються: зберігається високий лейкоцитоз, але у порівнянні з попереднім

терміном його показник знижується на 14,3 %, а у порівнянні з групою без корекції – майже на чверть; порівняно з попереднім терміном на 35,7 % зростає кількість лімфоцитів, хоча цей показник являється все ще на 20 % нижчим за контрольні дані; по відношенню до попереднього терміну помірно зростає кількість еритроцитів – на 6,7 %, та значно – гемоглобіну – на 36,6 %, але відносно контролю ці показники все ще становлять 72,7 та 59,3 % відповідно (всі показники достовірні, $p < 0,05$) (табл.5.4). Майже на 40 % знижується активність АЛАТ у порівнянні з попереднім терміном, що становить 120 % у порівнянні з контролем ($p < 0,05$) (табл.5.5). Активність АсАТ достовірно не змінюється порівняно з попереднім терміном, але майже вдвічі знижується порівняно з групою без корекції, що втричі перевищує показник контрольної групи ($p < 0,05$) (табл.5.5). Вміст загального білірубіну знижується вдвічі, у порівнянні з попереднім терміном, що на 64,3 % перевищує показник контролю ($p < 0,05$) (табл.5.5). Вміст загального білку суттєво зростає порівняно з попереднім терміном і групою без контролю: на 34 та 238 % відповідно ($p < 0,05$) (табл.5.5).

Дослідження прозапальних цитокінів на 56-у добу експерименту показало, що вміст ІЛ-2 продовжує знижуватися, і стає на 13 % нижчим відносно показника попереднього терміну, що на 12,8 % перевищує показник контрольної групи (табл.5.6), ($p < 0,05$). Вміст ІЛ-6 на 10,2 % зростав порівняно з попереднім терміном, і становив 80,2 % від показника контрольної групи (табл.5.6), ($p < 0,05$).

Такі зміни функціонального стану печінки демонструють, що регенеративні властивості збагаченої тромбоцитами плазми дають експериментально обгрунтовані підстави вважати її застосування патогенетичним методом корекції цирозу печінки у тварин.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [237 - 244]

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хронічні захворювання печінки, зокрема гепатит та цироз, багато десятиріч залишається важливою медико-соціальною проблемою. Захворюваність на гепатити різної етіології невідомо зростає в країнах Старого Світу та Америки [37, 245-246]. Наслідком хронічного запального процесу в печінці зазвичай стає фіброз, що змінює будову органу та припиняє його нормальне функціонування [33, 247]. У більшості випадків ХГ супроводжується запальною реакцією з боку жовчовивідних шляхів та порушенням метаболічних процесів в організмі [227, 248]. Така ситуація зумовлює обмеження працездатності, збільшення витрат на амбулаторне лікування та утримання в лікарнях, а також підвищення кількості людей з інвалідністю.

У відповідь на хронічне запалення в печінці утворюються вузлики регенерації, де відбувається формування фіброзної тканини [3, 82, 105, 109, 110], згодом руйнація нормальної тканини органу призводить до гемодинамічних розладів. Оскільки фіброз печінки являється необхідною стадією процесу регенерації, важливо контролювати та спрямовувати його, утримуючи в припустимих межах [249-250].

В механізмі розвитку ФП провідну роль відіграє альтерація гепатоцитів та фібробластів [108], з наступною активацією ЗКП, що вимушені перетворюватися на міофібробласти [109]. При цьому розчинні медіатори цих процесів продукуються активованими клітинами Купфера [110].

Однією з важливих ланок у патогенезі ушкодження гепатоцитів при токсичному гепатиті являється перекисне окиснення ліпідів, коли відбувається вільнорадикальне окиснення ненасичених жирних кислот у складі фосфоліпідів мембран клітин [14, 55]. Внаслідок ланцюгового характеру протікання ПОЛ в тканинах накопичуються гідропероксиди і нові вільні радикали. Так, саме надмірне утворення вільних радикалів спостерігається при впливі

чотирьохлористого вуглецю [98-99]. Вільнорадикальні процеси відносять до так званих «критичних систем» організму, тобто таких, що знаходяться під багатосходиноким контролем механізмів регуляції [98-100].

Відомо, що вільні радикали мають високу реакційну здібність, здатні пошкоджувати біологічні мембрани, гальмувати активність ферментів, призводити до створення перекисних сполук [100-102], які, в свою чергу, накопичуються в організмі, активують окиснення ліпідних та фосфоліпідних структур – мембранні оболонки клітин та органел.

Певною мірою ПОЛ є фізіологічним процесом, а будь-яка біологічна система містить деяку кількість вільних радикалів [99, 103], але такий стан чітко регулюється системами антиоксидантного захисту, які забезпечують рівновагу прооксидантно-антиоксидантних взаємовідносин [101]. Тривале надходження патологічного чинника (в нашому випадку – чотири хлористого вуглецю) викликає зрушення відносно сталої рівноваги прооксидантної та антиоксидантної системи (АОС), активує, таким чином, каскад перекисного окислення і руйнації гепатоцитів. Саме такий стан ми спостерігали при надходженні чотирьохлористого вуглецю: біотрансформація токсичної сполуки відбувалася, головним чином, в печінці шляхом окиснення, внаслідок чого утворювалися високо реактивні первинні метаболіти, які вступали в реакції кон'югації для утворення вторинних метаболітів і виведення з організму. Але тривалий вплив CCl_4 став постійним джерелом вільних радикалів, посилення окислювальних процесів призвело до виникнення дисбалансу в системі ПОЛ-АОС, ліпіди клітинних мембрани почали руйнуватися, і спричинили некроз клітин.

Пристосуванням організму у відповідь на ушкодження являється розвиток компенсаторних захисних реакцій, спрямованих на відтворення клітинного гомеостазу або на стабілізацію ушкодження [98]. До них, зокрема, відносяться: активація механізмів енерго-залежного транспорту; підсилення антиоксидації; активація процесу зв'язування вільних жирних кислот; стимуляція синтезу білків, фосфоліпідів, біологічно активних речовин, які

відтворюють цілісність компонентів клітини [106, 251]. Важливо, що дані процеси відбуваються лише за умов високої інтенсивності енергетичного обміну [249]. Крім того, функціональний спокій клітині, що пошкоджена, забезпечують механізми порушення рецепції медіаторів, гормонів та ін.; зниження активності внутрішньоклітинної передачі сигналів; пригнічення реалізації стимулу [98]. Якщо дія патологічного чинника призводить до загибелі клітин, відбувається вивільнення лізосомних ферментів в міжклітинний простір, що активує викид прозапальних цитокінів з клітин оточення й наступна активація ЗКП [28, 249]. Також, внаслідок запального процесу і руйнації гепатоцитів відбувається підсилення дегрануляції тканинних базофілів з вивільненням нейтральних протеаз, кислих гідролаз та протеогліканів, що в свою чергу стимулює ушкодження тканини печінки, підсилює судинну проникність та міжклітинний набряк [106]. Крім того, вивільняється велика кількість прозапальних цитокінів та хемокінів, які підтримують активність запалення на високому рівні, створюючи в такий спосіб «порочне коло».

Слід зазначити, що важливу роль в стимуляції запального процесу відіграє фактор активації тромбоцитів (ФАТ, PAF – platelet-activating factor), який у вогнищі запалення підсилює хемотаксис нейтрофілів і макрофагів, підсилює дегрануляцію лейкоцитів з викидом вільних радикалів та пероксидів [95, 194, 252]. Таким чином, хронічне запалення підтримується в активному стані досить тривалий час. Але, запалення має певну стадійність перебігу, і згодом проліферація пересилує альтерацію. Тривалий вплив чотирихлористого вуглецю викликає біологічний ефект репарації, тобто заміщення тканини, що зруйнувалася, новими клітинами та волокнистими елементами.

Виділяють певну стадійність активації ЗКП: ініціації, прогресування та резолюції [105]. У випадку гострого запалення всі ці стадії проходять послідовно, ЗКП підлягають апоптозу або переходять у фазу спокою [97, 253-254], а у випадку хронічної патологічної стимуляції ЗКП стають стало активованими: відбувається проліферація, активний фіброгенез, змінюється

скоротливість, деградує матрикс, зникає ретиноїд, починається активний синтез білків позаклітинного матриксу з його накопиченням [96].

Слід зазначити, що загоєння забезпечується впливом місцевих – резидентних клітин та клітин, які циркулюють і надходять до місця ураження, звідки йдуть відповідні сигнали [104]. При надходженні тромбоцитів відбувається їхня дегрануляція з вивільненням специфічних для тромбоцитів протеїнів, факторів росту, молекул адгезії, ангіогенних факторів, протеогліканів, цитокінів [170]. Основним ефектом багатьох цитокінів є мітогенна активність, внаслідок чого індукується проліферація та активація фібробластів, нейтрофілів, моноцитів, гладеньких м'язів та мезенхімальних стовбурових клітин [198]. Зниження інтенсивності альтерації стимулює початок ангіогенезу, який складається з активації, проліферації та міграції ендотеліальних клітин для будови судин [253]. В той же час IL-10 здатний пригнічувати синтез біологічно активних речовин, що стимулюють і підтримують запалення [106].

Таким чином, головним завданням лікування хронічного ураження печінки являється перетин низки патогенетичних реакцій, що призводять до посилення важкості стану (і розвитку цирозу), а також інтенсифікація неоангіогенезу, оскільки разом із судинами, які ростуть, всередину тканини печінки надходять також й стовбурові клітини, що стануть попередниками гепатоцитів внаслідок епітеліо-мезенхімальної взаємодії у відповідному мікрооточенні.

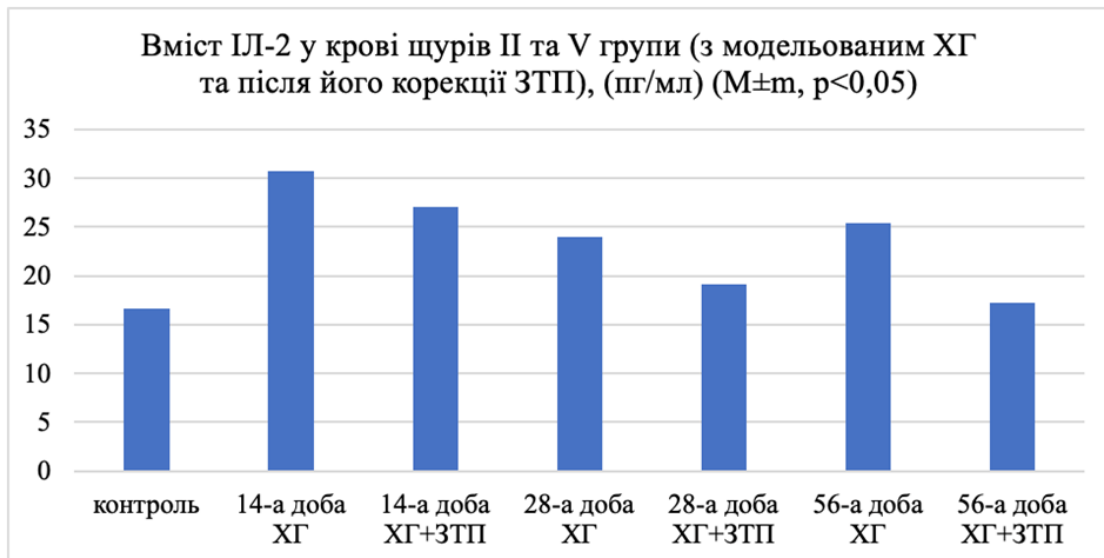
Застосування експериментальної моделі, яка включає внутрішньошлункове введення олійного розчину чотирьохлористого вуглецю протягом 8 тижнів продемонструвало, що у тварин достовірно змінюються показники морфо-функціонального стану печінки, які можна розцінювати як фіброзні зміни в тканині печінки за умов хронічного гепатиту: по всій площі печінки виявлялися некробіотичні зміни, клітини в стані вакуольної та дрібнокрапельної жирової дистрофії, нерівномірне кровонаповнення судин,

венозні стази, периваскулярний фіброз з наступним утворенням «хибних» часточок.

В крові тварин з модельованим ХГ виявлявся значний лейкоцитоз протягом всього періоду спостереження, стало зниження вмісту лімфоцитів, відбувалося також поступове зниження вмісту еритроцитів, на 56-у добу їх кількість була на третину нижчою за контрольну групу тварин. Достовірних змін концентрації гемоглобіну виявлено не було. В той же час спостерігалася тенденція до помірною зниження вмісту тромбоцитів, і на 56-у добу він був на 14 % нижчим за показник контрольної групи.

Значне зростання активності ферментів цитолізу відбувалося вже на 14-у добу, при чому активність АсАТ була значно вищою за активність АлАТ – в 8,2 та в 2 рази відповідно у порівнянні з контролем, залишаючись на вкрай високому рівні до кінця терміну спостережень. Руйнація клітин спричинила також значне зростання вмісту загального білірубіну протягом всього терміну експерименту. Білок-синтезуюча функція печінки значно пошкоджувалася, на що вказує різке зниження вмісту загального білку, починаючи з 14-ої доби, і збереження цієї тенденції до кінця експерименту.

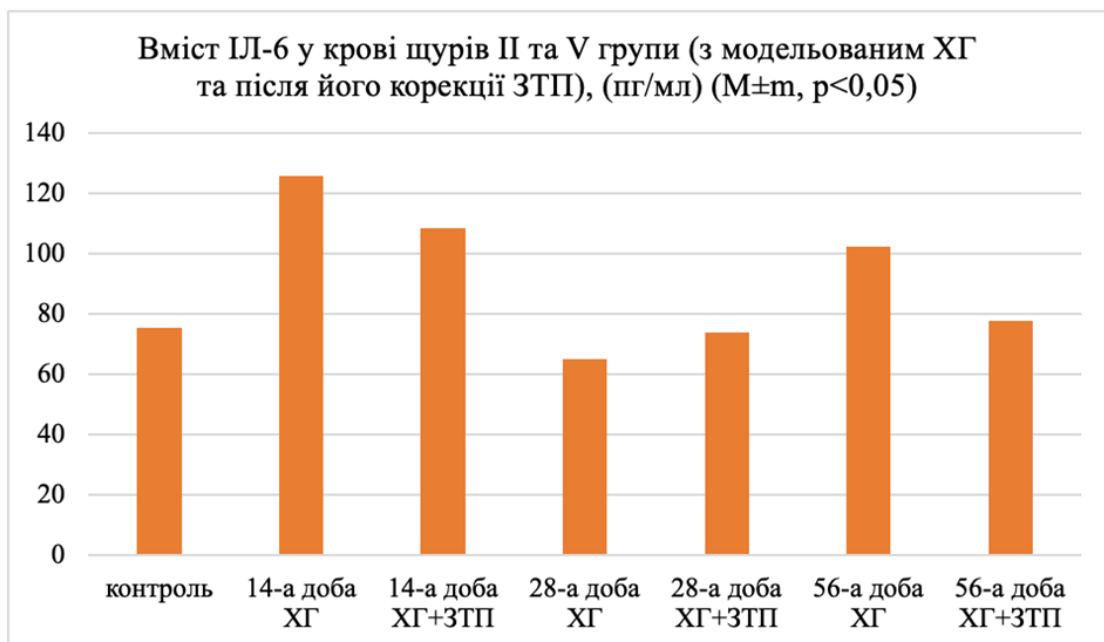
Вміст обох досліджуваних прозапальних цитокінів різко зростав на 14-у добу експерименту, дещо знижувався на 28-у добу і знов зростав на 56-у добу (рис.6.1, 6.2). Такий стан в цілому відповідає уявленню щодо механізмів дії прозапальних цитокінів при запаленні, оскільки воно проявляється сукупністю процесів, які регулюються цитокінами: підсиленням кровопостачання органу, що уражений, порушенням його морфології та функції – некрозами, кровостазми, з наступним утворенням надлишкової кількості колагену для заміщення дефекту тканини [108, 255].



*- різниця достовірна по відношенню до контролю;

« - різниця достовірна до попереднього терміну

Рисунок 6.1 - Динаміка вмісту ІЛ-2 в крові щурів за умов експериментального моделювання хронічного гепатиту та після його корекції.



*- різниця достовірна по відношенню до контролю;

« - різниця достовірна до попереднього терміну

Рисунок 6.2 - Динаміка вмісту ІЛ-6 в крові щурів за умов експериментального моделювання хронічного гепатиту та після його корекції.

Оскільки для запальних процесів травного тракту збільшення вмісту ІЛ-2 в крові та в тканині органу, що уражений, є характерним [228], то довготривалий вплив патогенного чинника з наступним формуванням хронічного процесу викликає зниження секреції ІЛ-2, тобто – виснаження імунної відповіді. ІЛ-6 стимулює та регулює імунну відповідь та запальні процеси і, за певних умов виявляються майже протилежні ефекти, що мають про- та протизапальну дію [228, 255]. Саме такою особливістю ІЛ-6 можна пояснити пригнічення його синтезу на 28-у добу експерименту – виснаження первинної імунної відповіді на гостре ураження, з наступним підсиленням синтезу у відповідь на хронічний патологічний вплив, коли його вміст в крові становив 138,5 % від показника контрольної групи.

У тварин з модельованим цирозом печінки процеси порушення морфофункціонального стану печінки були подібні до таких в групі з хронічним гепатитом, хоча й спостерігалися певні відмінності. Так, вже на 14-у добу експерименту виявлялося значне розростання сполучнотканинних тяжів та утворення хибних часточок, фіброзування судинних стінок, гіаліноз, лімфогістіоцитарна та макрофагальна інфільтрація. Явища хронічного важкого запального процесу прогресували весь період спостереження: значний лейкоцитоз, виразна лімфоцитопенія, анемія, тромбоцитопенія. В крові руйнація гепатоцитів підтверджувалась сталим зростанням активності ферментів цитолізу, різким підвищенням вмісту білірубіну та мінімальним вмістом загального білку.

Експериментальні дані дослідження моделі цирозу печінки свідчать про наявність певних закономірностей його перебігу. У тварин з ЦП на початку спостереження виявлялися вогнищеві некрози, явища жирової та білкової дистрофії гепатоцитів, значна лімфогістіоцитарна інфільтрація, формування хибних часточок, гіаліноз судин. Морфологічні прояви супроводжувались відповідними біохімічними змінами в крові – значний лейкоцитоз, лімфоцитопенія, анемія, а також суттєве зростання вмісту досліджуваних прозапальних цитокінів, що свідчить про наявність імунної відповіді. За місяць

після припинення моделювання патології активність процесу помірно знижувалась – поряд з порушенням цитоархітекτονіки виявлялись гепатоцити в стані жирової дистрофії, крововиливи, а також ознаки певного гальмування імунної відповіді – зниження рівнів прозапальних цитокінів в крові на тлі лейкоцитозу та лімфоцитопенії, що зберігалися. Такий стан може свідчити про виснаження адаптивно-присосовних реакцій та розвиток хронічного запального процесу.

Слід зазначити, що тривале надходження патологічного чинника (в нашому випадку – чотири хлористого вуглецю) викликає зрушення відносно сталої рівноваги прооксидантної та антиоксидантної системи (АОС), активує, таким чином, каскад перекисного окислення і руйнації гепатоцитів. Саме такий стан ми спостерігали при надходженні чотирихлористого вуглецю: біотрансформація токсичної сполуки відбувалася, головним чином, в печінці шляхом окиснення, внаслідок чого утворювалися високо реактивні первинні метаболіти, які вступали в реакції кон'югації для утворення вторинних метаболітів і виведення з організму. Але тривалий вплив CCl_4 став постійним джерелом вільних радикалів, посилення окислювальних процесів призвело до виникнення дисбалансу в системі ПОЛ-АОС, ліпіди клітинних мембрани почали руйнуватися, і спричинили некроз клітин.

Пошкодження клітин при формуванні хронічного токсичного ураження печінки проявляється локусами некрозів в тканині, що призводить до наступною стимуляції зірчастих клітин для створення каскаду хімічних реакцій – синтезу та виділення в кров надмірної кількості прозапальних цитокінів, які, в свою чергу, активують імунну відповідь, стимулюють проліферацію та диференціацію лімфоцитів, моноцитів та макрофагів. Такий ефект також був описаний при виразковій хворобі шлунку [126].

Внаслідок обрання терапевтичною субстанцією концентрату тромбоцитів крові щурів, виникла необхідність з'ясування можливості безпечного застосування збагаченої тромбоцитами плазми. Для вирішення цього питання

нами, по-перше, були відпрацьовані зручні та доступні способи її введення в тканину печінки.

Співставлення результатів патоморфологічного дослідження після введення ЗТП «відкритим» та «закритим» шляхом показало, що не було істотної різниці при дії будь-якого з цих способів введення. Порушень морфо-функціонального стану печінки виявлено не було; вміст прозапальних цитокінів дещо підвищувався на 14-у добу експерименту, але вже на 28-у добу сягав значень контрольної групи; також не було достовірних змін вмісту більшості формених елементів крові, тільки вміст тромбоцитів на 13,4 % зростав наприкінці експерименту; біохімічні показники функціонального стану печінки достовірно не відрізнялися від контрольної групи. Крім того, мікроскопічне дослідження міокарду та нирок експериментальних тварин не виявило значущих відмінностей їх будови після введення ЗТП будь-яким методом.

Отримані дані демонструють, що збагачена тромбоцитами плазма є безпечною сумішшю тромбоцитів у невеликому об'ємі плазми, а внутрішньопечінкове введення її «закритим» шляхом є доступним, зручним та дешевим способом застосування при модельованому патологічному процесі в печінці.

Після застосування збагаченої тромбоцитами плазми в печінці щурів з модельованим ФП відбувається процес регенерації, що розвивається поступово. Так, через 14 діб від останньої ін'єкції ЗТП в печінці виявляються новоутворені судини та жовчні протоки в порталних трактах. Хоча розростання сполучної тканини в центральних зонах часточок ще залишається досить виразним, спостерігається велика кількість двоядерних гепатоцитів. Визначаються клітини в стані жирової дистрофії.

На наявність запального процесу, що триває в цей період, вказують певні загальні показники крові, де спостерігається лейкоцитоз, лімфоцитопенія, помірна еритроцитопенія, і біохімічні показники крові з підвищенням активності ферментів цитолізу, вмісту загального білірубину та зниженням вмісту загального білку (рис. 6.3, 6.4).

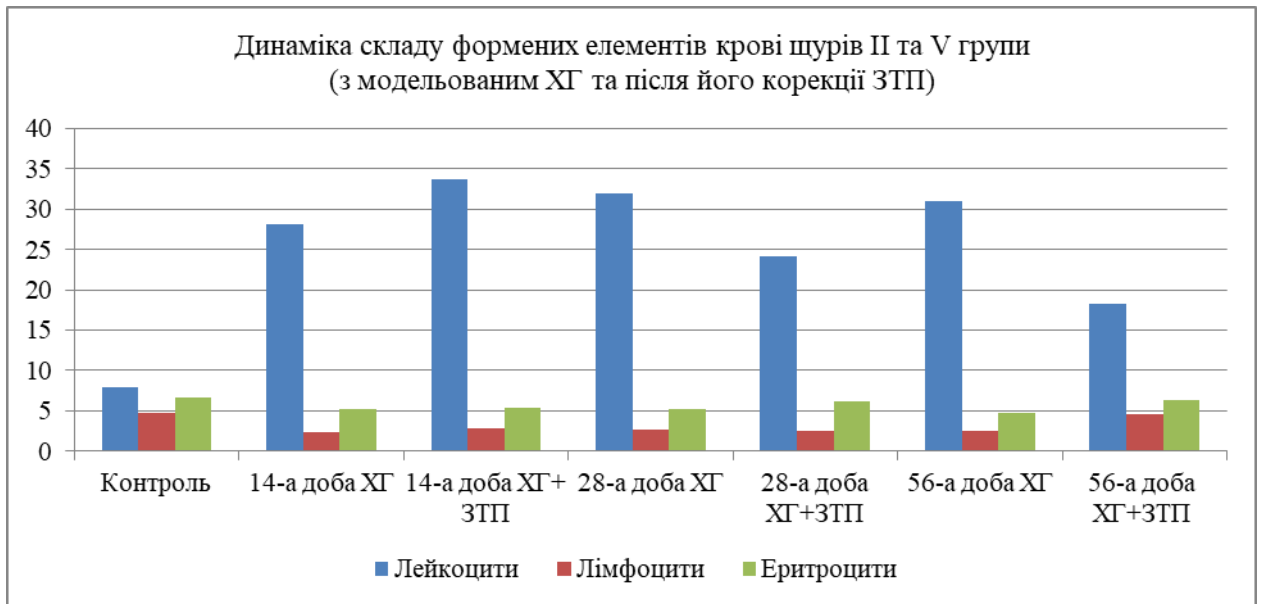


Рисунок 6.3 - Динаміка складу формених елементів крові щурів з модельованим ХГ та після його корекції ЗТП (* - $p < 0,05$).

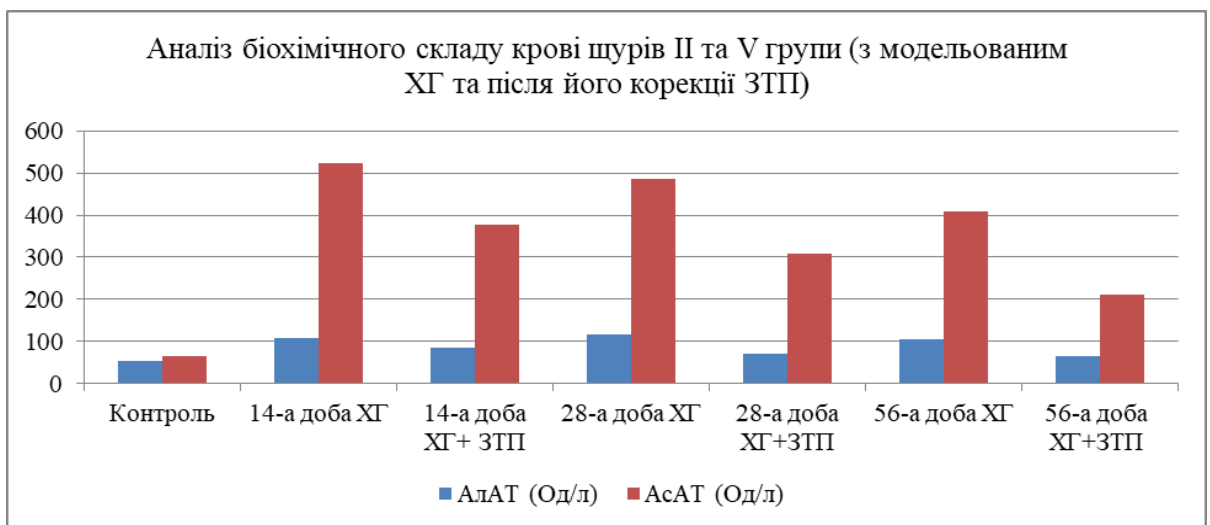


Рисунок 6.4 - Динаміка біохімічного складу крові щурів з модельованим ХГ та після його корекції ЗТП (* - $p < 0,05$).

Таке явище можна пояснити тим, що печінка є функціонально активним органом, який постійно знаходиться під впливом внутрішніх та зовнішніх чинників, і вимагає високої активності біохімічних процесів в гепатоцитах. Навіть надходження біологічно активних сполук, які забезпечують потенційний регенеративний вплив, не в змозі за досить короткий термін забезпечити

відтворення не тільки структурної цілісності, а й функціональної здатності органу.

Співставлення результатів аналізу крові експериментальних тварин показало, що на 14-у добу вміст прозапальних цитокінів був значно підвищеним у порівнянні з контролем (рис.6.1) і майже не відрізнявся від показників тварин з ФП. Така ситуація відповідає даним, що їх отримали інші дослідники за умов тривалого процесу запалення в органах ШКТ [40, 256-258], а також уявленню щодо біологічних властивостей ІЛ-2 та ІЛ-6. На 28-у добу після застосування ЗТП ознаки запалення майже зникають, спостерігаються лише вогнища незначної периваскулярної інфільтрації з ділянками некрозу, відбувається нормалізація вмісту прозапальних цитокінів та зниження рівня лейкоцитозу, значне зниження активності ферментів цитолізу та загального білірубіну. Одночасно відбувається відтворення білок-синтезуючої функції печінки, зникають явища анемії.

Відомо, що тромбоцити після дегрануляції в тканині печінки певний час продовжують синтезувати гранули і поступово вивільняти їх, хоча й не на стабільно високому рівні. Можна припустити, що реакція гепатоцитів, які зберіглися, на надходження біологічно активних сполук тромбоцитарного походження, також буде розтягнута в часі, тому дія ЗТП не є одномоментною, а відбувається певний час. Це дає можливість розглядати регенеративний потенціал збагаченої тромбоцитами плазми як високий та тривалий.

В цілому можна говорити, що ознаки патологічної регенерації, які ми спостерігали при хронічному гепатиті без корекції, після застосування ЗТП поступово заміщаються на ознаки репаративної регенерації, коли активність викиду прозапальних цитокінів певний час триває, але надходження у складі ЗТП ендотеліального фактору росту судин, інсуліноподібного фактору росту, фактору росту фібробластів, тромбоцитарного фактору росту сприяють гармонізації етапності процесу відтворення тканини після ураження.

Вже через 8 тижнів після останнього введення ЗТП структура печінки майже не відрізняється від такої, як у інтактних тварин. Протягом всього

терміну спостереження у тварин без лікування спостерігалось розростання сполучної тканини на площі всього органу. Біохімічні показники крові також зазнають суттєвих змін: активність ферментів цитолізу, що є суттєво підвищеною через 2 тижні експерименту у всіх досліджуваних групах, на 4-ий тиждень значно знижується в групі тварин з корекцією ЗТП, але залишається на високому рівні в групі тварин без корекції, на 6-ий тиждень ці показники майже не відрізняються від контролю в групі з застосуванням ЗТП і значно перевищують результати контрольної групи у щурів без корекції. Рівень загального білірубіну в групі тварин з корекцією достовірно не відрізнявся від показника контрольних тварин і в 2,6 рази знижувався порівняно з групою без лікування. Слід зазначити, що вміст загального білку навіть наприкінці спостереження не сягав рівня здорових тварин, а був на 37,5 % нижчим, хоча й достовірно зростав у порівнянні з відповідним терміном в групі без корекції.

Той факт, що у тварин, які зазнали корекції ЗТП, через 2 тижні експерименту спостерігається значне підвищення рівнів прозапальних цитокінів свідчить про активний процес імунної відповіді на пошкоджуючий вплив з активацією імунної системи, з метою мінімізації ушкодження клітин для більш швидкого відтворення за короткий термін. Наявність в ЗТП різноманітних цитокінів у концентраціях, що значно перевищують фізіологічні показники в крові, призводить до активації проліферації клітин паренхіми і стромы печінки, неоангіогенезу, і, як наслідок, ефективної регенерації органу після моделювання хронічного токсичного впливу. Відомо, що місцеве застосування тромбоцитів викликає вивільнення вмісту їх гранул з наступним виходом стовбурових клітин з депо та подальшою міграцією в ділянки регенерації, диференціацією в ендотеліюцити та стимуляцією ангіогенезу. Підсилений ангіогенез, активний клітинний поділ та диференціація призводять до структурного відтворення тканини печінки і відновлення функцій, притаманних даному органу: детоксикації, синтезу білків «на експорт», виробленню гормонів та біологічно активних сполук, участі в підтримці гомеостазу всього організму.

На 28-у добу експерименту у тварин після введення ЗТП рівень досліджуваних цитокінів сягнув значень контрольної групи тварин. В групі тварин без корекції вміст ІЛ-2 хоча й значно знизився порівняно з попереднім терміном і залишався на тому ж рівні до 56-ої доби, був в 1,4 рази вищим за показник контрольної групи. Вміст ІЛ-6 на 28-у добу знизився майже вдвічі у порівнянні з попереднім терміном і став нижчим за показник контролю на 16 %. На 56-у добу рівень ІЛ-6 у групі без корекції знов зростає і на 36 % перевищує показник контрольної групи. Таке хвилеподібне коливання вмісту ІЛ-6 підтверджує результати досліджень [228], де обговорюється двобічний вплив ІЛ-6 на процес запалення: з одного боку його відносять до прозапальних цитокінів, а з іншого – за певних умов він може виступати в якості активного гальма для синтезу медіаторів запалення.

Після корекції ЦП збагаченою тромбоцитами плазмою у експериментальних тварин виявляються морфологічні ознаки активної регенерації: наявність двоядерних гепатоцитів, новоутворених судин, суттєве кровонаповнення. В крові поступово знижуються показники активності запального процесу: зменшується ступінь лейкоцитозу, лімфопенії, анемії.

Також поступово відбувається процес гальмування цитолізу – вже на 14-у добу активність АЛАТ падає майже втричі, АсАТ – на третину у порівнянні з групою без корекції ЦП, але все ще значно перевищує показники здорових тварин. Вміст загального білірубіну поступово знижується протягом спостережень, і майже сягає показника контрольних тварин на 56-у добу експерименту. Поступово відновлюється білок-синтезуюча функція печінки – вміст загального білку вже на 14-у добу зростає вдвічі порівняно з групою без корекції, і на 56-у добу цей показник знов майже подвоюється, хоча й залишається на третину меншим за показник контрольної групи.

Вміст прозапальних цитокінів в групі тварин після корекції ЦП поступово знижується, і на 56-у добу сягнув значень контрольної групи (рис.6.5, 6.6).

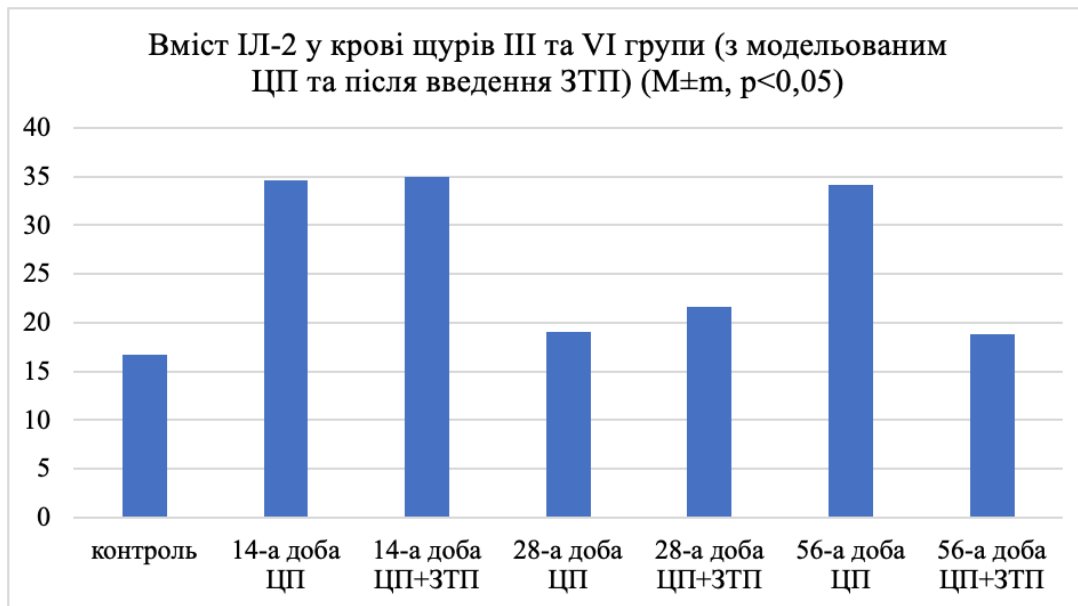


Рисунок 6.5 - Динаміка вмісту ІЛ-2 у крові щурів з модельованим ЦП та після введення ЗТП.

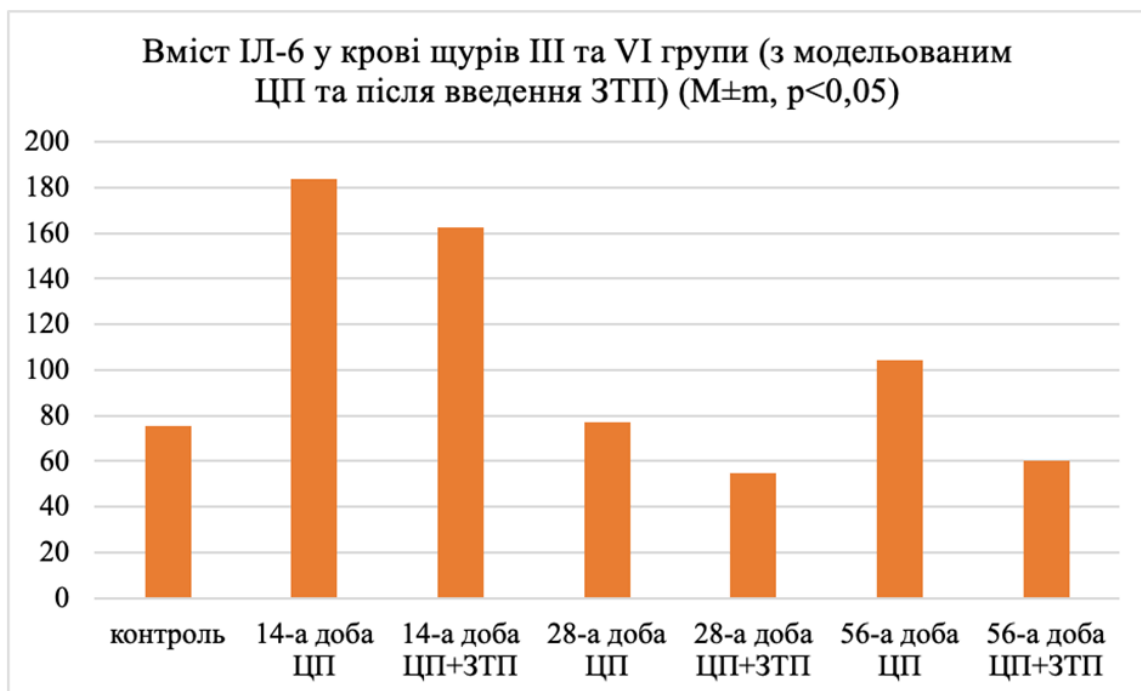


Рисунок 6.6 - Динаміка вмісту ІЛ-6 у крові щурів з модельованим ЦП та після введення ЗТП.

Дослідження динаміки вмісту прозапальних цитокінів за умов формування фіброзу печінки різного ступеня та після його корекції збагаченою тромбоцитами плазмою підтвердило їх важливу роль у забезпеченні

внутрішньоорганного обміну інформацією, зв'язку між органами та системами за умов впливу патогенного чинника. Чотирихлористий вуглець являється індуктором підсилення синтезу прозапальних цитокінів. Запалення, як універсальна реакція організму на вплив токсину, в печінці призводить до активації імунної, нейроендокринної, антиоксидантної та інших систем, що викликає системні реакції організму в цілому [134, 259, 260]. Цитокіни, власне, й реалізують запалення, тому в препаратах на початку дослідження ми знаходили набряк, порушення структури печінки, лімфогістіоцитарну інфільтрацію, а на пізніших етапах – накопичення фібробластів, утворення сполучнотканинних тяжів. Відомо, що атрофія та некроз замінюються процесами репарації та регенерації, при чому регулювання міграції лейкоцитів здійснюють молекули адгезії, які експресують клітини ендотелію та лейкоцитів під впливом цитокінів [106]. Прозапальні цитокіни характеризуються широким спектром дії, в тому числі, підсилюють міграцію лейкоцитів до запального вогнища, де регулюють функціональну активність лейкоцитів, тканинних базофілів, тромбоцитів, які продукують вазоактивні медіатори запалення – гістамін, брадікінін та ін., а вони, в свою чергу сприяють підсиленню проникності судин, згортанню крові та набряку [261]. Також прозапальні цитокіни збільшують пряму та опосередковану цитотоксичність лімфоцитів, регулюють інтенсивність та тривалість запалення. Інтерлейкіни 1 β , 4, 6, 8 спочатку ініціюють низку запальних реакцій (альтерацію, деструкцію), а згодом – захисні реакції організму (репарацію, регенерацію, відтворення дефекту тканини за рахунок підсиленої проліферації ендотеліоцитів, гладеньких міоцитів, фібробластів) [230, 262, 263]. Крім того, ІЛ-6 бере участь в активації синтезу білків гострої фази в печінці та регуляції окиснювального метаболізму макрофагів [230]. Взаємодія цитокінів і відповідних клітин індукує початок клітинного поділу, проліферацію та подальшу диференціацію.

Узагальнюючи вищенаведені факти проведеного дослідження можна зазначити, що застосування ЗТП, незалежно від етіо-патогенетичних механізмів ураження печінки, ініціює репаративну регенерацію тканини печінки з

відтворенням її нормальної мікроструктури. Місцеве введення ЗТП в паренхіму печінки формує комплексні системні зміни у стані імунної системи за рахунок пролонгованого динамічного впливу на рівень прозапальних цитокінів. Нормалізація імунної відповіді гальмує цитоліз гепатоцитів, через що відбувається часткове відтворення цитоархітектоніки печінки, підвищуються показники її функціональної здібності та стабілізуються гематологічні показники. Тобто, біотехнологія, яка базується на застосуванні ЗТП, для корекції експериментального ХГ та ЦП, демонструє високу ефективність при використанні у вигляді ін'єкцій безпосередньо в орган, що уражений.

ВИСНОВКИ

Важливою медико-соціальною проблемою сучасної медицини є пошук нових стратегій корекції уражень печінки, що обумовлений неухильним зростанням захворюваності на гепатити та цироз серед працездатного населення. Багато уваги при цьому приділяється вивченню застосування стовбурових, прогеніторних клітин та їх активаторів – цитокінів. У дисертаційній роботі надано теоретичне узагальнення та вирішено важливе для патологічної фізіології науково-практичне завдання, яке полягає у дослідженні особливостей морфо-функціонального стану печінки при експериментальному хронічному гепатиті та цирозі, патогенетичному обґрунтуванні ефективності застосування збагаченої тромбоцитами плазми при сформованій патології.

1. Експериментальний хронічний гепатит, що формується тривалим (56 діб) внутрішньошлунковим введенням чотирьохлористого вуглецю, характеризується розвитком типових патоморфологічних змін у печінці: значною жировою дистрофією і вогнищевими некрозами гепатоцитів з лімфомакрофагальними інфільтратами навколо них, внутрішньоклітинними холестазами і біліостазами, порушенням упорядкованої балочної структури печінкових часточок, септальним фіброзом в часточках з утворенням дрібних вузликів, оточених сполучною тканиною. В крові – лейкоцитоз, лімфопенія, підвищення загального білірубіну та активності ферментів цитолізу. Вміст прозапальних цитокінів ІЛ-2 та ІЛ-6 показує різке зростання на 14-у добу перебігу патологічного процесу, на 28-у добу відбувається їх суттєве зниження, та підвищення на 56-у добу виключно ІЛ-6.

2. У експериментальних щурів цироз печінки формується після внутрішньошлункового введення чотирьохлористого вуглецю протягом 150 діб із заміною питної води розчином етилового спирту, характеризується наявністю вогнищевих некрозів та тяжкої жирової дистрофії гепатоцитів, внутрішньоклітинних холестазів в гепатоцитах та біліостазів в дрібних жовчних дуктулах, фіброзом портальних трактів, формуванням сполучнотканинних септ і вузлів-регенератів (хибних часточок). В крові - лейкоцитоз, лейкопенія,

анемія, тромбоцитопенія, зростання активності ферментів цитолізу (АлАТ – в 4,5 рази, АсАТ – в 3,4 рази), загального білірубину в 5 разів та зниження вмісту загального білку в 5,2 рази у порівнянні з контрольною групою ($p < 0,05$). Рівень прозапальних цитокінів має піки на 14-у та 56-у добу (ІЛ-2 на 207,2 % та 204,2 % відповідно, ІЛ-6 на 244 % та 138,5 % відповідно), із зниженням на 28-у добу майже до контрольних значень ($p < 0,05$).

3. Збагачена тромбоцитами плазма є безпечною аутологічною біологічною сумішшю клітин, що не викликає змін морфо-функціонального стану печінки, нирок та серця за умов внутрішньопечінкового введення здоровим тваринам. На 14-у добу після її введення «відкритим» або «закритим» шляхами спостерігається помірне підвищення рівнів прозапальних цитокінів («відкритим» – ІЛ-2 на 9 %, ІЛ-6 на 21 %; «закритим» – ІЛ-2 на 16,8 %, ІЛ-6 на 9 %) та повне відновлення до контрольних значень з 28-ї по 56-у доби. Відсутня різниця в результатах морфо-функціонального стану печінки, серця та нирок, загальних та біохімічних показників крові між тваринами, що підлягали лапаротомічному оперативному втручання та тваринами з пункційним введенням ЗТП, який є більш зручним, швидким та малотравматичним.

4. Введення збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальному хронічному гепатиті проявляє значний регенеративний ефект, що реалізується за рахунок гальмування хронічного запалення із зменшенням вторинної альтерації гепатоцитів (зниження активності ферментів цитолізу: АлАТ з 14-ї доби та повною нормалізацією на 56-у добу та зниженням на 56 % АсАТ), стимуляції регенерації гепатоцитів (виявлення двоядерних клітин); усунення анемічного синдрому (підвищення до нормативних значень кількості еритроцитів та вмісту гемоглобіну) із відтворенням білок-синтезуючої функції печінки, та ефективної нормалізації імунної системи (збільшення кількості лімфоцитів на 56-у добу та поступового зниження рівнів ІЛ-2 та ІЛ-6 до значень контролю).

5. У щурів з експериментальним цирозом печінки за умов корекції збагаченою тромбоцитами плазмою відбувається помірне зниження активності

запального процесу та гальмування цитолізу (на 56-у добу вміст АЛАТ достовірно не відрізняється від значень контролю, АсАТ –у 3,3 рази більше значень контролю, але на 80 % менше порівняно з групою без корекції), що розвивається через стимуляцію імунної відповіді (підвищення кількості лімфоцитів вже на 28-у добу на 72% перевищуючи значення відповідної групи без корекції ЗТП), нормалізацію вмісту ІЛ-2 (на 56-у добу лише на 12,8 % перевищує показник контрольної групи ($p < 0,05$); зниження концентрації ІЛ-6 (на 28-у добу стає на 27,2 % нижчим за показник контролю, залишаючись зниженим включно до 56-ї доби); зменшення прояву анемічного синдрому (на 56-у добу вміст гемоглобіну був вищим на 62,9 %, кількість еритроцитів на 57 % більше порівняно з групою щурів з ЦП без введення ЗТП), часткового відновлення білково-синтетичної (на 56-у добу вміст загального білку склав 62,4 % від контролю та у 2,48 рази перевищив значення групи з ЦП без корекції ЗТП) та дезинтоксикаційної (порівняно з групою без корекції зниження у 4,66 рази вмісту загального білірубіну) функцій печінки.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Parola M., Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol. Aspects Med.* 2018;65:37–55. 10.1016/j.mam.09.002
2. Rosenberg W, Baldrick T, Tanwar S. Missouri: Elsevier; 2019. Liver Disease. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*: 699–722.
3. Marrone G., Shah V.H., Gracia-Sancho J. Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration. *J. Hepatol.* 2016; Sep;65(3):608-17. doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.018.
4. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression Poll J. G., Caudana P., Paillet J., Piaggio E., Kroemer G. *J. Exp. Med.* (2020) 217 (1): e20191247. <https://doi.org/10.1084/jem.2019>
5. Portal hypertensive bleeding in cirrhosis: risk stratification, diagnosis, and management: 2016 practice guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases [published correction appears in *Hepatology*. 2017;66(1):304]. Garcia-Tsao G, Abraldes JG, Berzigotti A, Bosch J. *Hepatology*. 2017;65(1):310-335.
6. Ge PS, Runyon BA. Treatment of patients with cirrhosis. *N Engl J Med.* 2016;375(8):767-777.
7. Jung YK, Yim HJ. Reversal of liver cirrhosis: current evidence and expectations. *Korean J Intern Med.* 2017;32(2):213-228.
8. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. Baumert T. F., Juhling F., Ono A., Hoshida Y. *BMC Med.* 2017; 15: 52.
9. Diagnosis and management of hepatitis C. Wilkins T, Akhtar M, Gititu E, Jalluri Ch., Ramirez J. *Am Fam Physician.* 2015;91(12):835-842.

10. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. *Microbes Infect.* 2012;14:238-46. doi: 10.1016/j.micinf.2011.10.005.
11. Clinical Trials of Stem Cell Treatment for Spinal Cord Injury. Yamazaki K., Kawabori M., Seki T., Houkin K.. *Int J Mol Sci.* 2020, Jun; 21(11): 3994.
12. Ilic D., Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic StemCells – What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *STEM CELLS* 2017;35:17–25.
13. Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. Wang J., Chen Zh, Sun M., Xu H., Gao Yu., Liu J., Li M.. *Tissue Cell.* 2020, Jun;64:101330. doi: 10.1016/j.tice.2020.101330.
14. Гріднєв ОЄ. Перекисне окиснення ліпідів і печінка. *Сучасна гастроентерол.* 2005;5(25):80-83.
15. Yin Sh., Wang H., Park O. Enhanced Liver Regeneration in IL-10–Deficient Mice after Partial Hepatectomy via Stimulating Inflammatory Response and Activating Hepatocyte STAT3. *Am J Pathol.* 2011;178:1614-21.
16. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(10): 2515-32. doi: 10.3748/wjg.v20.i10.2515.
17. Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. Xu X. R., Zhang D., Oswald B. E., Carrim N., Wang X., Hou Ya., Zhang Q., Lavallo Ch., McKeown Th., Marshall A.H., Ni H. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016;53(6):409-30. doi: 10.1080/10408363.2016.1200008.
18. Kurokawa T., Ohkohchi N. Platelets in liver disease, cancer and regeneration. *World J Gastroenterology.* 2017; 23(18): 3228–323.
19. Serotonin deficiency exacerbates acetaminophen-induced liver toxicity in mice. Zhang J, Song S, Pang Q, Zhang R, Zhou L, Liu S. *Sci Rep.* 2015; 5: 8098. doi: 10.1038/srep08098.

20. Platelets: No longer bystanders in liver disease. Chauhan A., Adams D. H., Watson S. P., Lalor P. *Hepatology*. 2016. Nov;64(5):1774-1784. doi: 10.1002/hep.28526.

21. Effects of platelet-rich plasma on liver regeneration in CCl 4-induced hepatotoxicity model. Mafi A., Dehghani F., Moghadam A., Noorafshan A., Vojdani Z., Talaei-Khozan T. *Platelets*. 2016 Dec;27(8):771-776. doi: 10.1080/09537104.2016.1184749.

22. A focus on the role of platelets in liver regeneration: Do platelet-endothelial cell interactions initiate the regenerative process? Meyer J, Lejmi E, Fontana P, Morel P, Gonelle-Gispert C, Buhler L. *J Hepatol*. 2015;63:1263–1271.

23. Allogeneic platelet-rich plasma (PRP) is superior to platelets or plasma alone in stimulating fibroblast proliferation and migration, angiogenesis, and chemotaxis as relevant processes for wound healing. Van der Bijl, M. Vlig, E. Middelkoop, D. de Korte. *Transfusion*. 2019 Nov;59(11):3492-3500. doi: 10.1111/trf.15535.

24. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is and what is not PRP. *Impl Dent*. 2001;10:225-8.

25. Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems: A Review of the Literature. Oudelaar B.W., Peerbooms j.C., In't Veld R.H., Vochteloo A.J.H. *Am J Sports Med*. 2019 Feb;47(2):479-487. doi: 10.1177/0363546517746112.

26. Stimulation of angiogenesis and survival of endothelial cells by human monoclonal Tie2 receptor antibody. Hwang B., Lee S.-H., Kim J.-S., Moon J. H., Jeung I. C., Lee N. G., Park J., Hong H. J., Cho Y.- L., Jung H., Park Y.- J., Lee S.- J., Lee H. G., Kim W. K., Han B. S., Bae K.- H., Chung S. J., Kwon Y.- G., Lee S. C., Kim S. J., Min J.- K. *Biomaterials*. 2015 May;51:119-128. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.062.

27. Duncan AW, Soto-Gutierrez A. Liver repopulation and regeneration: new approaches to old questions. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(2):197-202. doi: 10.1097/MOT.0b013e32835f07e2.
28. Michalopoulos GK. Advances in liver regeneration. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol* 2014;8:897–907.
29. Dynamic changes and mechanism of intestinal endotoxemia in partially hepatectomized rats. Xu CP, Liu J, Liu JC, Han D-W, Zhang Y, Zhao Y-Ch. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3592-7.
30. Burns G. S., Thompson A. J. Viral hepatitis B: clinical and epidemiological characteristics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Oct 30;4(12):a024935. doi: 10.1101/cshperspect.a024935.
31. Underestimation of liver-related mortality in the United States. Asrani SK, Larson JJ, Yawn B, Therneau TM, Ray KW. *Gastroenterol*. 2013; 145(2): 375-82.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2013.04.005.
32. Makri E., Goulas A., Polyzos S.A. Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis and Emerging Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Arch Med Res*. 2021 Jan;52(1):25-37. doi: 10.1016/j.arcmed.2020.11.010.
33. Експериментально-клінічне обґрунтування хірургічних втручань при цирозі печінки, ускладненому портальною і біліарною гіпертензіями : монографія / О.Ф. Дзигал, Р.С. Вастьянов. Одеса: Астропринт, 2020. – 180 с.
34. Вирусные гепатиты: стандартная терапия и использование природных факторов. Драгомирецкая НВ., Заболотная ИБ, Малыгина ТИ, Ижа АН, Шевченко НА, Калиниченко НВ. *Сучасна гастроентерол*.2011;6(62):92-8.
35. Годован ВВ, Остапчук КВ. Асоціація поліморфізму СYP2T1*6 з ризиком розвитку фіброзу печінки у хворих на хронічний гепатит С. *Бюл. XIII читань ім. В.В. Підвисоцького: міжнар. наук. конф. студентів та молодих вчених; 2014 черв. 19-20; Одеса. Одеса: ОНМедУ; 2014, с.70-1.*

36. Hepatitis C Virus Genetic Variability, Human Immune Response, and Genome Polymorphisms: Which Is the Interplay? Lapa D., Garbuglia A.N., Capobianchi M.R., Del Porto P. *Cells*. 2019 Apr 3;8(4):305. doi: 10.3390/cells8040305.

37. Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts. Alexander M., Loomis K., van der Lei J., Duarte-Salles T., Prieto-Alhambra D., Ansell D., Pasqua A., Lapi F., Rijnbeek P., Mosseveld M., Waterworth D.M., Kendrick S., Sattar N., Alazawi W. *BMC Med*. 2019 May 20;17(1):95. doi: 10.1186/s12916-019-1321-x.

38. Oxidative stress, a trigger of hepatitis C and B virus-induced liver carcinogenesis. Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Tyurina D.A., Ivanova O.N., Kochetkov S.N., Bartosch B., Isaguliants M.G. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):3895-3932. doi: 10.18632/oncotarget.13904.

39. Wang C.-C., Cheng P.-N., Kao J.-H. Systematic review: chronic viral hepatitis and metabolic derangement. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020 Jan;51(2):216-230. doi: 10.1111/apt.15575.

40. Степанов Ю.М. Хвороби органів травлення та гастроентерологічна допомога населенню України: здобутки, проблеми та шляхи їх вирішення. *Здоров'я України. Гастроентерологія*. 2014;вересень:10-11.

41. Koren D., Taveras E.M. Association of sleep disturbances with obesity, insulin resistance and the metabolic syndrome. *Metabolism*. 2018 Jul;84:67-75. doi: 10.1016/j.metabol.2018.04.001.

42. How can we improve the performance of Model for End-Stage Liver Disease sodium score in patients with hepatitis B virus-related decompensated liver cirrhosis commencing antiviral treatment? Kim T. H., Ku D. H., Um S. H., Lee H. A., Park S. W., Chang J. M., Yim S. Y., Suh S. J., Jung Y. K., Seo Y. S., Kim J.H., Yim H. J., Yeon J. E., Byun K. S., Ahn H. *Hepatology and Gastroenterology*. 2018; 33(9):1641-1648.

43. AASLD guidelines for treatment of chronic hepatitis B. Terrault NA, Bzowej NH, Chang KM, Hwang JP, Jonas MM, Murad MH. *Hepatology*. 2016;63(1):261-83. doi: 10.1002/hep.28156.
44. Karayiannis P. Hepatitis B virus: Virology, molecular biology, life cycle and intrahepatic spread. *Hepatology Int*. 2017;11:500–508. doi: 10.1007/s12072-017-9829-7.
45. Alcohol-Attributable Cancer Deaths and Years of Potential Life Lost in the United States. Nelson DE, Jarman DW, Rehm J, Greenfield TK, Rey G, Kerr WC. *Am J Public Health*. 2013;103(4): 641-48. doi: 10.2105/AJPH.2012.301199.
46. HCV genotypes and their determinative role in hepatitis C treatment. Keikha M., Eslami M., Yousefi B., Ali-Hassanzadeh M., Kamali A., Yousefi M., Karbalaee M. *Virusdisease*. 2020 Sep;31(3):235-240. doi: 10.1007/s13337-020-00592-0.
47. Присяжнюк ВП, Волошин ОІ, Сидорчук ЛП. Особливості окремих клінічно-лабораторних показників крові та структурно-функціональних параметрів серця у хворих на цироз печінки не вірусного походження залежно від Т894G поліморфізму гена ендотеліальної синтази оксида азоту. *Укр Мед Альманах*. 2011;14(2):151-4.
48. Njoku DB. Drug-Induced Hepatotoxicity: Metabolic, Genetic and Immunological Basis. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):6990-7003. doi: 10.3390/ijms15046990.
49. Активність ферментів системи антиоксидантного захисту у хворих на неалкогольний стеатогепатит при застосуванні засобів антигомотоксичної терапії. Бабак ОЯ, Фадєєнко ГД, Фролов ВМ, Пересадін МО, Круглова ОВ. *Сучасна гастроентерол*. 2011;4(60):62-7.
50. Neuschwander-Tetri B. A. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Med*. 2017 Feb 28;15(1):45. doi: 10.1186/s12916-017-0806-8.
51. Cobbina E., Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and

transporters. *Drug Metab Rev.* 2017 May;49(2):197-211. doi: 10.1080/03602532.2017.1293683.

52. Huang T. D., Behary J., Zekry A. Non-alcoholic fatty liver disease: a review of epidemiology, risk factors, diagnosis and management. *Intern Med J.* 2020 Sep;50(9):1038-1047. doi: 10.1111/imj.14709.

53. Свінціцький А С, Дземак МІ, Динник НВ. Особливості стану загально адаптивних реакцій організму при захворюваннях печінки. *Сучасна гастроентерологія.* 2012;4:47-52.

54. Consortium CSIOTE-C, The European Foundation for the Study of Chronic Liver F (2016) Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: characterization and role in acute-on-chronic liver failure. Claria J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, Amoros A, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Oettl K, Morales-Ruiz M, Angeli P, Domenicali M, Alessandria C, Gerbes A, Wendon J, Nevens F, Trebicka J, Laleman W, Saliba F, Welzel TM, Albillos A, Gustot T, Benten D, Durand F, Gines P, Bernardi M, Arroyo V. *Hepatology.* 2017; 64:1249–1264.

55. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Masarone M., Rosato V., o Dallio M., Gravina A. G., Aglitti A., Loguercio C., Federico A., Persico M. *Review Oxid Med Cell Longev.* 2018, Jun 11;2018:9547613. doi: 10.1155/2018/9547613. eCollection 2018.

56. Peroxiredoxins-The Underrated Actors during Virus-Induced Oxidative Stress. Karpenko I.L, Valuev-Elliston V.T., Ivanova O.N., Smirnova O.A., Ivanov A.V. *Antioxidants (Basel).* 2021 Jun 18;10(6):977. doi: 10.3390/antiox10060977.

57. Obesity and metabolic syndrome in COPD: Is exercise the answer? James B.D., Jones A.V., Trethewey R.E., Evans R.A. *Chron Respir Dis.* 2018 May;15(2):173-181. doi: 10.1177/1479972317736294.

58. ST2 fibro-citokine and IL-33 alarmin protein are expressed in obese fa/fa- Zucker rat model and correlated with pro-fibrotic gene pathways. Vianello

E., Dozio E., Brizzola S., Acocella F., Tacchini L., Corsi Romanelli M.M. 4th joint meeting of pathology and laboratory medicine sipmet–sipmel - second joint meeting in collaboration with asip–amp–uems–waspalm – 4th sipmel national congress – 34th sipmet national congress – 4th congress of pathology and laboratory medicine. *J Biol Regul Homeost Agents*. Jul-Aug 2018;32(4 Suppl. 1):35.

59. IL2/Anti-IL2 Complex Combined with CTLA-4, But Not PD-1, Blockade Rescues Antitumor NK Cell Function by Regulatory T-cell Modulation. Caudana P., Gonzalo Nunez N,m De La Rochere Ph., Pinto A., Denizeau J., Alonso R., Niborski L.L., Lantz O., Sedlik Ch., Piaggio E. *Cancer Immunol Res*. 2019, Mar;7(3):443-457. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0697.

60. Boyman O., Arenas-Ramirez N. Development of a novel class of interleukin-2 immunotherapies for metastatic cancer. *Swiss Med Wkly*. 2019, Jan 23;149:w14697. doi: 10.4414/smw.2019.14697.

61. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. Klein C., Waldhauer I., Nicolini V. J., Freimoser-Grundschober A., Nayak T., Vugts D.J., Dunn C., Bolijn M., Benz J., Stihle M., Lang S., Roemmele ZM., Hofer Th., Van Puijenbroek E., *Oncoimmunology*. 2017, Jan 11;6(3):e1277306. doi: 10.1080/2162402X.2016.1277306.

62. Modeling the receptor pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of NKTR-214, a kinetically-controlled interleukin-2 (IL2) receptor agonist for cancer immunotherapy. Charych, D., Khalili S., Dixit V., Kirk P., Chang Th., Langowski J., Rubas W., Doberstein S.K., Eldon M., Hoch U., Zalevsky J. *PLoS One*. 2017, Jul. 5;12(7):e0179431. doi: 10.1371/journal.pone.0179431.

63. Schett G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatology* (Oxford). 2018, Feb. 1;57(suppl_2):ii43-ii50. doi: 10.1093/rheumatology/kex513.
64. Vazquez M.I., Catalan-Dibene J., Zlotnik A. B cells responses and cytokine production are regulated by their immune microenvironment. *Cytokine*. 2015 Aug;74(2):318-26. doi: 10.1016/j.cyto.2015.02.007.
65. Li H., Chen Ch., Wang D.W. Inflammatory Cytokines, Immune Cells, and Organ Interactions in Heart Failure. *Front Physiol*. 2021 Jul 1;12:695047. doi: 10.3389/fphys.2021.695047.
66. Anti-Inflammatory Therapy for Atherosclerosis: Focusing on Cytokines. Poznyak A.V., Bharadwaj D., Prasad G., Grechko A.V., Sazonova M.A., Orekhov A.N. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 30;22(13):7061. doi: 10.3390/ijms22137061.
67. Ait-Oufella H., Libby P., Tedgui A. Anticytokine Immune Therapy and Atherothrombotic Cardiovascular Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019 Aug;39(8):1510-1519. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.311998.
68. Autoimmune Rheumatic Diseases: An Update on the Role of Atherogenic Electronegative LDL and Potential Therapeutic Strategies. Chen D.-Y., Sawamura T., Dixon R.A., Sánchez-Quesada J.L., Chen Ch.-H. *J Clin Med*. 2021 May 6;10(9):1992. doi: 10.3390/jcm10091992.
69. Groeger S., Meyle J. Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2019 Feb 14;10:208. doi: 10.3389/fimmu.2019.00208.
70. Oral Versus Gastrointestinal Mucosal Immune Niches in Homeostasis and Allostasis. Suárez L.J., Arboleda S., Angelov N., Arce R.M. *Front Immunol*. 2021 Jul 5;12:705206. doi: 10.3389/fimmu.2021.705206.
71. Ray M., Autieri M.V. Regulation of Pro-and Anti-atherogenic Cytokines. *Cytokine*. 2019 Oct; 122: 154175. Published online 2017 Dec 6. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.031

72. Xu N., Li X., Zhong Y. Inflammatory cytokines: potential biomarkers of immunologic dysfunction in autism spectrum disorders. *Mediators Inflamm.* 2015;531-518. doi: 10.1155/2015/531518.

73. The Immune System, Cytokines, and Biomarkers in Autism Spectrum Disorder. Masi A., Glozier N., Dale R., Guastella A.G. *Neurosci Bull.* 2017 Apr;33(2):194-204. doi: 10.1007/s12264-017-0103-8.

74. SMYD5 regulates H4K20me3-marked heterochromatin to safeguard ES cell self-renewal and prevent spurious differentiation. Kidder BL, Hu G, Cui K, Zhao K. *Epigenetics Chromatin.* 2017;10:8. doi: 10.1186/s13072-017-0115-7.

75. Холодкова ОЛ, Кулешова ОА, Шухтін ВВ. Морфофункціональний стан яєчок та прозапальної ланки системи цитокінів за умов токсичного ураження в експерименті. *Вісн Морфол.* 2015;2:371-4.

76. Engineered Cytokines for Cancer and Autoimmune Disease Immunotherapy. Uricoli B., Birnbaum L.A., Do P., Kelvin J.M., Jain J., Costanza E., Chyong A., Porter C.C., Rafiq S., Dreaden E.C. *Adv Healthc Mater.* 2021 Mar 9;e2002214. doi: 10.1002/adhm.202002214.

77. Engineered IL-21 Cytokine Muteins Fused to Anti-PD-1 Antibodies Can Improve CD8+ T Cell Function and Anti-tumor Immunity. Shen S., Sckisel G., Sahoo A., Lalani A., Otter D.D., Pearson J., DeVoss J., Cheng J., Casey S.C., Case R., Yang M., Low R., Daris M., Fan B., Agrawal N.J., Al K. *Front Immunol.* 2020 May 8;11:832. doi: 10.3389/fimmu.2020.00832.

78. Kang L. I., Mars W. M., Michalopoulos G. K. Signals and cells involved in regulating liver regeneration. *Cell.* 2012;1(4):1261–1292. doi: 10.3390/cells1041261.

79. Rat Model of the Associating Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS) Procedure. Schadde E, Hertl M, Breitenstein S, Beck-Schimmer B, Schläpfer M, Ping C, et al. *J Vis Exp.* 2017;(126). doi: 10.3791/55895.

80. Identifying the Key Genes in Mouse Liver Regeneration After Partial Hepatectomy by Bioinformatics Analysis and in vitro/vivo Experiments. Zhao J, Yu SZ, Cai Q, Ma D, Jiang L, Yang LP, Yu ZY. *Front Genet.* 2021 Jun 23;12:670706. doi: 10.3389/fgene.2021.670706.

81. Khanam A., Saleeb P.G., Kottillil Sh. Pathophysiology and Treatment Options for Hepatic Fibrosis: Can It Be Completely Cured? *Cells.* 2021 May 4;10(5):1097. doi: 10.3390/cells10051097.

82. New Concepts in Liver Regeneration. Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 26(Suppl 1): 203-12. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06539.

83. Michalopoulos G.K. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatology.* 2017;65:1384-92. doi: 10.1002/hep.28988.

84. Huang J, Rudnick DA. Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration. *Am J Pathol.* 2014;184(2):309-21. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.04.034.

85. Control of hepatocyte proliferation and survival by fgf receptors is essential for liver regeneration in mice. Padrissa-Altes S, Bachofner M, Bogorad RL, Pohlmeier L, Rossolini T, Bohm F, Liebisch G., Hellerbrand C., Koteliensky V., Speicher T., Werner S. *Gut* 2015;64:1444-53.

86. Kang LI, Mars WM, Michalopoulos GK. Signals and Cells Involved in Regulating Liver Regeneration. *Cells.* 2012;1(4):1261-92. doi: 10.3390/cells1041261.

87. Defective Initiation of Liver Regeneration in Osteopontin-Deficient Mice after Partial Hepatectomy due to Insufficient Activation of IL-6/Stat3 Pathway. Wen Ya, Feng D, Wu H, Liu W, Li H, Wang F. *Int J Biol Sci.* 2015; 11(10): 1236–1247. doi: 10.7150/ijbs.12118.

88. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:1441-6.

89. Cytokines and STATs in Liver Fibrosis. Kong X, Horiguchi N, Mori M, Gao B. *Front Physiol.* 2012;3:69. doi: 10.3389/fphys.2012.00069.
90. Interleukin-10: An Anti-Inflammatory Marker To Target Atherosclerotic Lesions via PEGylated Liposomes. Almer G, Frascione D, Pali-Schöll I, Vonach C, Lukschal A, Stremnitzer C. *Mol Pharm.* 2013;10(1):175-86. doi: 10.1021/mp300316n.
91. Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. Horiguchi N, Lafdil F, Miller AM, Park O, Wang H, Mohanraj R. *Hepatology.* 2010;51:1724-34.
92. Wu JF, Wu TC, Chen CH. Serum levels of interleukin-10 and interleukin-12 predict early, spontaneous hepatitis B virus antigen seroconversion. *Gastroenterol.* 2010;138:165-72.
93. Abel M, Sene D, Pol S. Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2006;44:1607-16.
94. Xia SH, Xiang XH, Xu W. Roles of BN52021 in platelet-activating factor pathway in inflammatory MS1 cells. *World J Gastroenterol.* 2013;19(25):3969-79.
95. A review on platelet activating factor inhibitors: could a new class of potent metal-based anti-inflammatory drugs induce anticancer properties? Papakonstantinou V, Lagorati N, Tsilibary E, Demopoulos C, Philippopoulos A. *Bioinorg Chem Appl.* 2017; 2017: 6947034. Doi : 10.1155/2017/6947034.
96. Evaluation of Hepatic Fibrosis: A Review from the Society of Abdominal Radiology Disease Focus Panel. Horowitz JM, Venkatesh SK, Ehman RL, Jhaveri K, Kamath P, Ohliger MA. *Abdom Radiol (NY).* 2017; 42(8):2037-53. doi: 10.1007/s00261-017-1211-7.
97. Brenner DA. Reversibility of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2013;9:737-9.

98. Атаман ОВ, редактор. Патолофізіологія : підручник : в 2 т. Т.2. Патолофізіологія органів і систем /. Вінниця : Нова Книга; 2016:448.
99. Владимиров ЮА. Свободнорадикальное окисление липидов и физические свойства липидного слоя биологических мембран. Биофиз. 1987; 5:830-44.
100. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 11-26. doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
101. The effects of antioxidants on gene expression following gamma-radiation (GR) and proton radiation (PR) in mice in vivo. Finnberg N, Wambi C, Kennedy AR, El-Deiry WS. *Cell Cycle.* 2013;12(14).
102. Сирота ТВ, Захарченко МВ, Кондрашова МН. Активность цитоплазматической Супероксиддисмутазы - чувствительный показатель состояния антиоксидантной системы печени и мозга крыс. *Биомед хим.* 2014;60(1):63-71.
103. Сравнительное изучение стресс-индуцированных свободнорадикальных реакций в легочной ткани, печени и сердце у разновозрастных белых крыс. Чумакова АС, Нестеров ЮВ, Курьянова ЕВ, Трясучев АВ. *Фундам иссл.* 2014;12 (3):537-41.
104. Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Ann Rev Pathol.* 2011;28:425-56.
105. Beyond fibrosis: stellate cells as liver stem cells. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Schumacher E, Häussinger D. *Z Gastroenterol.* 2015;53(12):1425-31. doi: 10.1055/s-0035-1566895.
106. Черешнев ВА, Литвицкий ПФ, Цыган ВН. Клиническая патофизиология: курс лекций. СПб.: СпецЛит; 2012. 432 с.
107. Tacke F, Weiskirchen R. Update on hepatic stellate cells: pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;6:67-80.

108. Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol.* 2014;20:7260-76. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7260.
109. Fausther M, Lavoie EG, Dranoff JA. Contribution of Myofibroblasts of Different Origins to Liver Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1:225-30. doi: 10.1007/s40139-013-0020-0.
110. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017 Nov 1; 121: 27–42. doi: 10.1016/j.addr.2017.05.007.
111. Review article: the efficacy of biomarkers in chronic fibroproliferative diseases – early diagnosis and prognosis, with liver fibrosis as an exemplar. Karsdal MA, Krarup H, Sand JM, Manon-Jensen T, Genovese F. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;40:233-49.
112. Morphogens and hepatic stellate cell fate regulation in chronic liver disease. Tsukamoto H, Zhu N-L, Wang J, Asahina K, Machida K. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(Suppl 2): 94-8. doi:10.1111/j.1440-1746.2011.07022.x.
113. Wu L, Mao Ch, Ming X. Modulation of Bcl-x Alternative Splicing Induces Apoptosis of Human Hepatic Stellate Cells. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 7478650. doi: 10.1155/2016/7478650.
114. TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. Gong D, Shi W, Yi S-J, Chen H, Groffen J, Heisterkamp N. *BMC Immunology.* 2012;13, article no. 31 doi: 10.1186/1471-2172-13-31.
115. Antifibrotic Effects of the Dual CCR2/CCR5 Antagonist Cenicriviroc in Animal Models of Liver and Kidney Fibrosis. Lefebvre E, Moyle G, Reshef R, Richman LP, Thompson M. *PLoS One.* 2016;11(6): e0158156. doi: 10.1371/journal.pone.0158156.
116. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. Cerletti C, Tamburelli C, Gianfagna F, De Gaetano G. *Thrombosis research.* 2012;129:263-6.

117. Roderfeld M. Matrix metalloproteinase functions in hepatic injury and fibrosis. *Matrix Biology*. 2018. Aug;68-69:452-462. doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.011.

118. Matrix metalloproteinase-1 decorated polymersomes, a surface-active extracellular matrix therapeutic, potentiates collagen degradation and attenuates early liver fibrosis. Geervliet E., Moreno S., Baiamonte L., Booiijink R., Boye S., Wang P., Voit B., Lederer A., Appelhans D., Bansa R. *Journal of Controlled Release*. 2021; 332:594-607.

119. Impact of NKT Cells and LFA-1 on Liver Regeneration under Subseptic Conditions. Jörger AK, Liu L, Fehlner K, Weisser T, Cheng Z, Lu M. *PLoS One*. 2016 Dec 15;11(12):e0168001. doi: 10.1371/journal.pone.0168001.

120. Quan TE, Cowper SE, Bucala R. The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep*. 2006;8:145-50.

121. Discrimination of cirrhotic nodules, dysplastic lesions and hepatocellular carcinoma by their vibrational signature. Peng Ch, Kaščáková S, Chiappini F, Olaya N, Sandt Ch, Yousef I. *J Transl Med*. 2016; 14: 9. doi: 10.1186/s12967-016-0763-6.

122. Случай регреса фіброза печени у молодой пациентки. Перепелюк Н.Н., Четвериков С.Г., Роша Л.Г., Холодкова Е.Л. *Сучасна гастроентерологія*. 2015;2 (82):119-123.

123. Горчаг Д.М., Холодкова О.Л., Перепелюк М.М. Патогенез фіброзу печінки та можливості його корекції. *Journal of education, Health and Sport*. 2016; 6(10):586-600.

124. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Нескоромна Н.В. Трансформація хронічного гепатиту в цироз печінки – де «точка неповернення»? International scientific and practical conference “Prospects for the development of medicine in EU countries and Ukraine” : Abstract book (Wloclawek, Republic of Poland, December 21-22, 2018). Wloclawek: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2018:70-72.

125. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol.* 2014 May;60(5):1090-6. doi: 10.1016/j.jhep.2013.12.025.

126. Туманский В.А., Фень С.В. Дуктулярная реакция, или печеночный репаративный комплекс: иммуногистохимические особенности при циррозе печени у больных хроническим гепатитом. *Патология.* 2018;Т.15, 1(42):18-28.

127. Centrolobular ductular reaction correlates with fibrosis stage and fibrosis progression in non-alcoholic steatohepatitis. Zhao L., Westenhof M., Pai R.K. *Modern Pathology Advance online publication.* 2017;31(1):150-159.

128. Туманский В.А., Фень С.В., Туманская Л.М. Патоморфологический анализ неблагоприятных последствий неалкогольного и алкогольного стеатогепатита. *Морфология.* 2017;11(4):59-74.

129. Non-alcoholic fatty liver diseases – histological scoring systems: a large cohort single-center, evaluation study. Rastogi A., Shasthry S.M., Agarwal A., Bibari C., Jain P., Jindal A., Sarin S. *APMIS.* 2017;125(11):962-73. Doi: 10.1111/apm.12742.

130. Germani G, Hytioglou P, Fotiadu A. Assessment of fibrosis and cirrhosis in liver biopsies: an update. *Semin Liver Dis.* 2011;31:82-90.

131. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). Ying H.Z., Chen Q., Zhang W.Y., Zhang H.H., Ma Y., Zhang S.Z., Fang J., Yu C.H. *Mol Med Rep.* 2017;16:7879-7889.

132. TGF-beta in hepatic stellate cells activation and liver fibrogenesis—updated 2019. Dewidar B., Meyer C., Dooly S., Meindl-Beinker A.N. *Cells.* 2019;8:1419.

133. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation in NASH. Marcher A.B., Bendixen S.M., Terkelsen M.K., Hohmann S.S., Hansen M.H., Larsen B.D., Mandrup S., Dimke H., Detlefsen S., Ravenskjaer K. *Sci Rep.* 2019;9:2324.

134. Inflammation and fibrosis in chronic liver diseases including non-alcoholic fatty liver diseases and hepatitis C. Tanwar S., Rhodes F., Srivastava A., Trembling P.M., Rosenberg W.M. *World J Gastroenterol.* 2020;26:109-133.

135. Van der Heide D., Weiskirchen R., Bansal R., Therapeutic targeting of hepatic macrophages for the treatment of liver diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2852.

136. Kupffer cells in the liver. Dixon L.J., Barnes M., Tang H., Pritchard M.T., Nagy L.E. *Compr.physiol.* 2013; 3:785-797.

137. Johnson A, DiPietro LA. Apoptosis and angiogenesis: an evolving mechanism for fibrosis. *FASEB (The Federation of American Societies for Experimental Biology) J.* 2013;27:3893-901.

138. Immunomodulatory role of the extracellular matrix within the liver disease microenvironment. McQuitty C.E., Williams R., Chokshi S., Urbani L. *Front Immunol.* 2020;11:574276.

139. He W., Dai C. Key fibrogenic signaling. *Curr Pathobiol Rep.* 2015;3:183-192.

140. Lemos Q, Andrade ZA. Angiogenesis and experimental hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:611-4.

141. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. Baiocchini A., Montaldo C., Conigliaro A., Grimaldi A., Correani V., Mura F., Ciccocanti F., Rotiroti N., Brenna A., Montalbano M. *PLoS ONE.* 2016;11:e0151736.

142. Atorvastatin inhibits proliferation and apoptosis, but induces senescence in hepatic myofibroblasts and thereby attenuates hepatic fibrosis in rats. Klein S., Klösel J., Schierwagen R., Körner Ch., Granzow M., Huss S., Mazar I.G.R., Weber S., van den Ven P.F.M., Pieper-Fürst U., Fürst D.O., Nattermann J., Lammert F., Sauerbruch T., Trebicka J. *Lab Invest.* 2012 Oct;92(10):1440-50. doi: 10.1038/labinvest.2012.106.

143. Hannivoort RA, Hernandez-Gea V, Friedman SL. Genomics and proteomics in liver fibrosis and cirrhosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:1.

144. Ezhilarasan D., Sokal E., Najimi M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018 Jun;17(3):192-197. doi: 10.1016/j.hbpd.2018.04.003.

145. Fuzheng Huayu Recipe Ameliorates Liver Fibrosis by Restoring Balance between Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Hepatic Stellate Cells. Pan Q, Wang Y.Q, Li G.M, Duan X.Y, Fan JG. *Biomed Res Int*; 2015: 935903.

146. Novel roles of apoptotic caspases in tumor repopulation, epigenetic reprogramming, carcinogenesis, and beyond. Zhao R., Kaakati R., Lee A.K., Liu X., Li F., Li C.-Y. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37:227–236. doi: 10.1007/s10555-018-9736-y.

147. Sun G, Montell DJ. Q&A: Cellular near death experiences-what is anastasis?, *BMC Biol*. 2017;15: 92

148. To the edge of cell death and back. Gong Y.-N., Crawford J.C., Heckmann B.L., Green D.R. *FEBS J*.2019 Feb; 286(3): 430–440.

149. Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. Mishra A.P., Salehi B., Sharifi-Rad M., Pezzani R., Kobarfard F., Sharifi-Rad J., Nigam M. *Mol Diagn Ther*. 2018 Jun;22(3):281-295. doi: 10.1007/s40291-018-0329-9.

150. Peng Z., Xue B., Kurgan L., Uversk V.N. Resilience of death: intrinsic disorder in proteins involved in the programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2013 Sep; 20(9): 1257–1267. doi: 10.1038/cdd.2013.65.

151. Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes. Liu H, Wu X, Gang N, Wang Sh, Deng W, Zan. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(2): 3044-053.

152. Subramanian S., Cheng G. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit Rev Immunol.* 2012; 32(1): 23–63.
153. Saraiva M, Vieira P, O’Garra A. Biology and Therapeutic Potential of Interleukin-10. *J Exp Med* (2020) 217:1–19. 10.1084/jem.20190418.
154. Laplante P, Sirois I, Raymond MA. Caspase-3-mediated of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells secretion promotes fibrosis. *J Cell Death Differ.* 2010;17:291-303.
155. Morelli A.E., Larregina A.T. Concise Review: Mechanisms behind apoptotic cell-based therapies against transplant rejection and graft versus host disease. *Stem Cells.* 2016 May; 34(5): 1142–1150.
156. Kisseleva T, Cong M, Paik Y. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109:9448-53.
157. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. Poon I.K., Lucas Ch.D., Rossi A.G., Ravichandran K.S. *Nat Rev Immunol.* 2014 Mar; 14(3): 166–180.
158. Wang X.-Q., Song F., Liu Y.-K. Hypertrophic scar regression is linked to the occurrence of endothelial dysfunction. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0176681.
159. Dynamic biological changes in fibroblasts during hypertrophic scar formation and regression. Chun Q, Zhiyong W, Fei S, Xiqiao W. *Int Wound J.* 2016;13(2):257–62. doi: 10.1111/iwj.12283.
160. Targeted Apoptosis of Ductular Reactive Cells Reduces Hepatic Fibrosis in a Mouse Model of Cholestasis. Azad A.I., Krishnan A., Troop L., Li Y., Katsumi T., Pavelko K., Kostallari E., Guicciardi M.E., Gores G.J. *Hepatology.* 2020 Sep; 72(3): 1013–1028.doi: 10.1002/hep.31211.

161. Mungunsukh O., McCart E.A., Day R.M. Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. *Biomedicines*. 2014 Dec; 2(4): 301–326.

162. Protein engineered variants of hepatocyte growth factor/scatter factor promote proliferation of primary human hepatocytes and in rodent liver. Ross J., Gherardi E., Mallorqui-Fernandez E.N., Bocci M., Sobkowicz A., Rees M., Rowe A., Ellmerich S., Massie I., Soeda J., Selden C., Hodgson H. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):897-906. doi: 10.1053/j.gastro.2011.12.006.

163. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. Nakamura T., Sakai K., Nakamura T., Matsumoto K. *Gastroenterol Hepatol*. 2011 Jan;26 Suppl 1:188-202. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06549.x.

164. Mesenchymal Stem Cells Attenuates TGF- β 1-Induced EMT by Increasing HGF Expression in HK-2 Cells. Wei J.-J., Tang L., Chen L.-L., Xie Z.-H., Ren Y., Qi H.-G., Lou J.-Y., Weng G.-B., Zhang S.-W. *Iran J Public Health*. 2021 May;50(5):908-918. doi: 10.18502/ijph.v50i5.6108.

165. Huangqi decoction inhibits apoptosis and fibrosis, but promotes Kupffer cell activation in dimethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis. Cheng L, Gaoqiang W, Gaofeng C, Mu Y, Zhang L, Hu X. *BMC Complement Altern Med*. 2012;12:51.

166. Wang QL, Yuan L, Tao YY. Fuzheng Huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Ethnopharmacol*. 2012;27:631-40.

167. Liu C, Sun MY, Wang L. Effects of Yinchenhao Tang and related decoctions on DMN-induced cirrhosis fibrosis in rats. *Chin Med*. 2008;3:1.

168. Enhancement of hepatocyte differentiation from human embryonic stem cells by Chinese medicine Fuzhenghuayu. Chen J, Gao W, Zhou P, Ma X, Tschudy-Seney B, Liu Ch. *Sci Rep*. 2016; 6:18841.

169. Van Dievoet M.-A., Eeckhoudt S., Stephenne X. Primary Hemostasis in Chronic Liver Disease and Cirrhosis: What Did We Learn over the Past Decade? *Int J Mol Sci.* 2020 May 6;21(9):3294. doi: 10.3390/ijms21093294.

170. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis.* 2011;105:13-33.

171. Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis. *Blood.* 2011;118(5):1359-1369.

172. Jonnalagadda D., Izu L.T., Whiteheart S.V. Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood.* 2012 Dec 20; 120(26): 5209–5216.

173. Optimized Preparation Method of Platelet-Concentrated Plasma and Noncoagulating Platelet-Derived Factor Concentrates: Maximization of Platelet Concentration and Removal of Fibrinogen. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18(3):176-85.

174. Evidence for serotonin as a relevant inducer of liver regeneration after liver resection in humans. Starlinger P, Assinger A., Haegle S., Wanek D., Zikeli S., Schauer D., Birner P., Fleischmann E., Guenberger B., Brostjan C., Gruenberger T. *Hepatology.* 2014;60(1):257–266. doi: 10.1002/hep.26950.

175. The PDGFR receptor family. Chitu V, Caescu CI, Stanley ER, Lennartsson J, Rönstrand L, Heldin CH. In: *Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies*, edited by Wheeler DL and Yarden Y. Switzerland: Springer International, 2015, p. 373–538.

176. Platelet-rich plasma derived growth factors contribute to stem cell differentiation in musculoskeletal regeneration. Qian Y., Han Q., Chen W., Song J., Zhao X., Ouyang Yu., Yuan W., Fan C. *Front Chem.* 2017;5: 89.

177. Platelet-derived growth factor receptor- α is essential for cardiac fibroblast survival. Ivey M.J., Kuwabara J.T., Riggsbee K.L., Tallquist M.D. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2019 Aug 1; 317(2): H330–H344.

178. Inhibition of platelet-derived growth factor-AB signaling prevents electromechanical remodeling of adult atrial myocytes that contact myofibroblasts. Musa H., Kaur K., O'Connell R., Klos M., Guerrero-Serna G., Avula U.M., Herron T.J., Kalifa J., Anumonwo J.M., Jalife J. *Heart Rhythm*. 2013 Jul;10(7):1044-51. doi: 10.1016/j.hrthm.2013.03.014.

179. Takayama H, Miyake Y, Nouse K. Serum levels of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor as prognostic factors for patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(1):116-21. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06441.x.

180. Lesion Dynamics Under Varying Paracrine PDGF Signaling in Brain Tissue. Massey S.C., Hawkins-Daarud A., Gallaher J., Anderson A.R., Canoll P., Swanson K.R. *Bull Math Biol*. 2019 Jun;81(6):1645-1664. doi: 10.1007/s11538-019-00587-z.

181. Targeted therapies in liver fibrosis: combining the best parts of platelet-derived growth factor BB and interferon gamma. Van Dijk F, Olinga P, Poelstra K, Beljaars L. *Front Med*. 2015;2:1-13.

182. Bansal R, Prakash J, Post E. Novel engineered targeted interferon-gamma blocks hepatic fibrogenesis in mice. *Hepatol*. 2011;54:586-96.

183. Serum platelet-derived growth factor BB levels: A potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. Zhou J., Deng Y., Yan L., Zhao H., Wang G. *Int J Infect Dis*. 2016;49:94-9. doi: 10.1016/j.ijid.2016.06.004.

184. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. Gu Z, Noss EH, Hsu VW, Brenner MB. *J Cell Biol*. 2011;193:61-70.

185. Tripodi A, Mannucci M. Coagulopathy in chronic liver disease. *N Engl J Med*. 2011;365:147-56.

186. Jin R, Zhang L, Zhang Y. Does platelet-rich plasma enhance the survival of grafted fat? An update review. *Int J Clin Exp Med*. 2013;6:252-8.

187. Torrero J, Aroles F, Ferrer D. Treatment of knee chondropathy with platelet rich plasma. Preliminary results at 6 months of follow-up with only one injection. *J Biol Regul Homeostat Agents*.2012;26:715-85.

188. Platelet Interactions with Liver Sinusoidal Endothelial Cells and Hepatic Stellate Cells Lead to Hepatocyte Proliferation. Meyer J., Balaphas A., Fontana P., Morel Ph., Robson S.C., Sadoul K., Gonelle-Gispert C., Bühler L. *Cells*. 2020 May; 9(5): 1243.

189. Transforming Growth Factor Beta Family: Insight into the Role of Growth Factors in Regulation of Fracture Healing Biology and Potential Clinical Applications. Poniatowski Ł.A., Wojdasiewicz P., Gasik R, Szukiewicz D. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 137823. doi: 10.1155/2015/137823.

190. Hepatocyte regeneration after partial hepatectomy occurs even under severely thrombocytopenic conditions in the rat. Kuwashima Y, Aoki K, Kohyama K, Ishikawa T. *Jpn J Cancer Res*. 1990;81:607-12.

191. Platelets strongly induce hepatocyte proliferation with IGF-1 and HGF in vitro. Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Takahashi K. *J Surg Res*. 2008;145:279-86.

192. Bivalent role of intra-platelet serotonin in liver regeneration and tumor recurrence in humans. Padickakudy R., Pereyra D., Offensperger F., Jonas Ph., Oehlberger L., Schwarz Ch., Haegele S., Assinger A., Brostjan Ch., Gruenberger Th., Starlinger P. *J Hepatol*. 2017 Dec;67(6):1243-1252. doi: 10.1016/j.jhep.2017.08.009.

193. Serotonin transporter and serotonin receptors. Adnot S., Houssaini A., Abid S., Marcos E., Amsellem V. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;218:365-80. doi: 10.1007/978-3-642-38664-0_15.

194. Markers of liver regeneration—the role of growth factors and cytokines: a systematic review. Hoffmann K., Nagel A.J., Tanabe K., Fuchs J., Dehlke K., Ghamarnejad O., Lemekhova A., Mehrabi A. *BMC Surg*. 2020; 20: 31. doi: 10.1186/s12893-019-0664-8.

195. Serotonin, hematopoiesis and stem cells. Fouquet G., Coman T., Hermine O., Côté F. *Pharmacol Res.* 2019 Feb;140:67-74. doi: 10.1016/j.phrs.2018.08.005.
196. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017 Mar;34(3):599-610. doi: 10.1007/s12325-017-0478-y.
197. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. Raziyeva K., Kim Y., Zharkinbekov Zh., Kassymbek K., Jimi S., Saparov A. *Biomolecules.* 2021 May 8;11(5):700. doi: 10.3390/biom11050700.
198. Biologicals, platelet apoptosis and human diseases: an outlook. Thushara RM, Hemshekhar M, Basappa K, Kemparaju B. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;93: 149-58.
199. Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. De Pascale M.R., Sommese L., Casamassimi A., Napoli C. *Transfus Med Rev.* 2015;29:52.
200. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. Davis V.L., Abukabda A.B., Radio N.M., Witt-Enderby P. A., Clafshenkel W. P., Cairone J.V., Rutkowski J.L. *J Oral Implantol.* 2014;40: 500.
201. Facilitated recruitment of mesenchymal stromal cells by bone marrow concentrate and platelet rich plasma. Holmes H.L., Wilson B., Goerger J.P., Silverberg J.L., Cohen I., Zipfel W.R., Fortier L.A. *PLoS One.* 2018;13, e0194567.
202. Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. Kakudo N., Morimoto N., Kushida S., Ogawa T., Kusumoto K. *Med Mol Morphol.* 2014;47: 83.
203. Gelatin hydrogel impregnated with platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis and wound healing in murine model. Notodihardjo PV, Morimoto N, Kakudo N, Ogura T, Hara T, Matsui M. *J Artif Organs.* 2015;1:64-71.

204. Van der Meijden P.E.J., Heemskerk J.W.M. Platelet biology and functions: New concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* 2019;16:166–179. doi: 10.1038/s41569-018-0110-0.

205. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis. Koupenova M., Clancy L., Corkrey H. A., Freedman J. E. *Circ Res.* 2018, Jan 19; 122(2): 337–351. doi:0.1161/CIRCRESAHA.117.310795.

206. Rapidly in situ forming platelet-rich plasma gel enhances angiogenic responses and augments early wound healing after open abdomen. Zhou B, Ren J, Ding C, Wu Y, Hu D, Gu G. *Gastroenterol Res Pract.* 2013. 013: 926764.

207. Platelet-rich plasma accelerates skin wound healing by promoting re-epithelialization. Xu P., Wu Y., Zhou L., Yang Z., Zhang X., Hu X., Yang J., Wang M., Wang B., Luo G., He W., Cheng B. *Burns Trauma.* 2020 Aug 14;8:tkaa028. doi: 10.1093/burnst/tkaa028.

208. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. Amable RP, Bizon R, Carias V, Vinicius M, Teixeira T, Pacheco IC. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4(3): 67. doi: 10.1186/scrt218.

209. Anitua E, Pelacho B, Prado R. Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *J Control Release.* 2015;28:31-9.

210. Ramezanifard R., Kabiri M., Ahvaz H.H. Effects of platelet rich plasma and chondrocyte co-culture on MSC chondrogenesis, hypertrophy and pathological responses. *EXCLI J.* 2017 Jul 16;16:1031-1045. doi: 10.17179/excli2017-453.

211. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85:638-46.

212. Platelet-rich plasma plays an antibacterial, anti-inflammatory and cell proliferation-promoting role in an in vitro model for diabetic infected wounds. Li

T., Ma Y., Wang M., Wang T., Wei J., Ren R., He M., Wang G., Boey J., Armstrong D.G., Deng W., Chen B. *Infect Drug Resist.* 2019 Jan 29;12:297-309. doi: 10.2147/IDR.S186651.

213. Platelet-rich plasma for the treatment of diabetic foot ulcers: A meta-analysis. Del Pino-Sedeño T., Trujillo-Martín M.M., Andia I., Aragón-Sánchez J., Herrera-Ramos E., Barragán F.J.I., Serrano-Aguilar P. *Wound Repair Regen.* 2019 Mar;27(2):170-182. doi: 10.1111/wrr.12690.

214. Andia A., Atilano L., Maffulli N. Moving toward targeting the right phenotype with the right platelet-rich plasma (PRP) formulation for knee osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2021 Mar 29;13:1759720X211004336. doi: 10.1177 /1759720X211004336.

215. Regenerative Effect of Platelet Concentrates in Oral and Craniofacial Regeneration. Al-Hamed F.H., Mahri M., Al-Waeli H., Torres J., Badran Z., Tamimi F. *Front Cardiovasc Med.* 2019 Sep 3;6:126. doi: 10.3389/fcvm.2019.00126.

216. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin in Periodontal Regeneration: A Review. Mohan S.P., Jaishangar N., Devy S., Narayanan A., Cherian D., Madhavan S.S. *J Pharm Bioallied Sci.* 2019 May;11(Suppl 2):S126-S130. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_41_19.

217. Effects of platelet-poor plasma, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin on healing of extraction sockets with buccal dehiscence in dogs. Hatelyama I, Marukawa E, Takahashi Y, Omura K. *Tissue Eng.* 2014;20:874-82.

218. Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology.* 2015;10(3):126-35.

219. Kang J, Hur J, Kang JA. Activated platelet supernatant can augment the angiogenic potential of human peripheral blood stem cells mobilized from bone marrow by G-CSF. *J Mol Cell. Cardiol.* 2014;75:64-75.

220. Кулініченко В.Г., Мінталов В.Д., Чайковський Ю.Б. Дотримання етичних та законодавчих норм і вимог при виконанні наукових морфологічних досліджень: методичні рекомендації. Київ. 2007: НМАПО імені П.Л. Шупіка.

221. Карташова ОН, Блюгер АИ. Симуляция патологического процесса в печени. Рига: Звайгне 1975. 140 с.

222. Луцик БД, редактор. Клінічна лабораторна діагностика: навч. посіб. К.: ВСВ «Медицина»; 2011. 288 с.

223. Методики морфологічних досліджень: монографія / М.М. Багрій, В.А. Діброва, О.Г. Попадинець, І.М. Грищук : за ред. М.М. Багрія, В.А. Діброви. Вінниця : Нова книга, 2016. 238 с.

224. Гублер ЕВ, Генкин АА. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. Л.: Медицина; 1973. 141 с.

225. Герасимов А.Н. Медицинская статистика. М.: МИА; 2007. 480 с.

226. Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Ромак ОІ. Теоретичне та експериментальне обґрунтування можливостей патогенетичної терапії фіброзу печінки. Прикладні аспекти морфології, присвячена пам'яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П., : наук.-практ. конф. : Вінниця, 21-22 вересня 2017 року : тези доп. – Вінниця : ВНМУ ім.М.І.Пирогова, 2017:163.

227. Гастроэнтерология и гепатология : учебное пособие / Бацков С.С. и др. СПб.: Политехника сервис, 2014. 260 с.

228. Царегородцева Т.М., Серова Т.И. Цитокины в гастроэнтерологии. М.: «Анахарсис», 2003. 96 с.

229. Tanaka T., Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol. Res.* 2014;2(4):288-294.

230. Distinct role of interleukin-6 and tumor necrosis factor receptor-1 in oval cell-mediated liver regeneration and inflammation-associated

hepatocancerogenesis. Ji T., Li G., Chen J., Zhao J., Li X., Lin H. *Oncotarget*. 2016;7(41):66635-46/doi : 1018632/oncotarget.11365.

231. Морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017;4, 2(140):156-9.

232. Romak OI, Sadovska Yu, Goriuk I. Liver morpho-functional changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017; 7(3): 690-9.

233. Вплив чотирихлористого вуглецю на стан нирок при моделюванні експериментального гепатиту. Садовська ЮО, Горюк ІА, Терновий ДП, Смірнова КО, Ромак ОІ. Науково-практична конференція з міжнар. участю, присвячена 85-річчю з дня заснування Студентського наукового товариства ОНМедУ «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів)», 22-24 квітня 2015. Тези допов., Одеський медуніверситет. 2015:49.

234. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Цироз печінки – коли змінити антифіброзну парадигму на ангиогенну? (Огляд літератури та власних досліджень). *Одеський медичний журнал*. 2017; №6: 22-6.

235. Структурно-функціональні перетворення печінки за умов експериментального токсичного гепатиту та цирозу. Холодкова ОЛ, Ромак ОІ, Перепелюк ММ, Кожухаренко ТІ. Взаємодія лікаря загальної практики та лікаря-спеціаліста в лікуванні поліморбідного пацієнта : наук.-практ. конф. Одеса, 26 квітня 2017 року : тези доп. – Одеса : ОНМедУ, 2017:94-6.

236. Спосіб діагностики стадії токсичного гепатиту в експерименті. Холодкова ОЛ, Ромак ОІ, Кожухаренко ТІ. Пат. на корисну модель 123945 Україна, МПК G09B 23/28 (200601) Заявник та патентовласник Одес. нац. мед. ун-т. - № u 2017 10440 ; заявл. 30.10.2017 ; опубл. 12.03.2018, Бюл. № 5.

237. Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. *Deutscher Wissenschaftsherold*. 2016;2:56-9.

238. Збагачена тромбоцитами плазма, як шанс на одужання для хворого з цирозом печінки. Аппельханс ОЛ, Перепелюк ММ, Ромак ОІ, Полукарова ЛА. *Інтегративна антропологія*. 2017;1:22-25.

239. Influence of platelet-enriched plasma on the morpho-functional state of liver in rats with induced non-alcoholic steatohepatitis and dyslipidemia. Appelhans O., Maznichenko I., Kasatkin O., Abdulla Hussein, Biriuk M., Romak O. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020;10(6):455-464.

240. Морфологічна характеристика патологічних змін у печінці за умов корекції експериментального цирозу різними способами. Терновий ДП, Садовська ЮО, Горюк ІА, Смірнова ЄО, Ромак ОІ. Науково-практична конференція з міжнар. участю, присвячена 100-річчю з дня народження І.Г. Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів)», 27-28 квітня 2017. Тези допов., Одеський медуніверситет. 2017:24.

241. Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Ромак ОІ. Ефекти збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальній терапії цирозу печінки. Зб. тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні досягнення медичних досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя». Київ, 5-6 жовтня 2018:5-6.

242. Холодкова ОЛ, Ромак ОІ, Кожухаренко ТІ. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі. Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 347-2018.

243. Запорожан ВМ, Холодкова ОЛ, Юзвак ОМ., Нескоромна НВ, Ромак ОІ. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі. Пат. на корисну модель 101004 Україна, МПК А61Р 1/16 (2006.01) А61К

35/407 (2015.01) Заявник та патентовласник Одес. нац. мед. ун-т. - № и 2015 00473 ; заявл. 06.04.2015 ; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16.

244. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі. Запорожан ВМ, Холодкова ОЛ, Юзвак ОМ, Нескоромна НВ, Ромак ОІ. Пат. на винахід 111669 Україна, МПК G09B 23/28 (2006.01) Заявник та патентовласник Одес. нац. мед. ун-т. - № а 2015 00877 ; заявл. 06.04.2015 ; опубл. 25.05.2015, Бюл. № 10.

245. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. Araújo A.R., Rosso N., Bedogni G., Tiribelli C., Bellentani S. *Liver Int.* 2018 Feb;38 Suppl 1:47-51. doi: 10.1111/liv.13643.

246. Zhdanov VV, Dygai AM. Participation of Signaling Cascades in the Regulation of Erythropoiesis under Conditions of Cytostatic Treatment. *Bull Exp Biol & Med.* 2015;58:304-7.

247. Decreased Macrophage Autophagy Promotes Liver Injury and Inflammation from Alcohol. Ilyas Gh., Cingolani F., Zhao E., Tanaka K., Czaja M. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019, Jul; 43(7): 1403–1413.

248. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests: A review. Hoekstra LT, de Graaf W, Nibourg GA, Heger M, Bennink RJ, Stieger B, Van Gulik TE. *Ann Surg.* 2013;257:27-36.

249. Underwood JCE, Cross SS. *General and systematic pathology.* Elsevier Limited; 2014. 864 p.

250. The Roles of Immune Cells in the Pathogenesis of Fibrosis. Huang E., Peng N., Xiao F., Hu D., Wang X, Lu L. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 22;21(15):5203. doi: 10.3390/ijms21155203.

251. Шаповалова І.О. Стан системи інтерферону у хворих на хронічний токсичний гепатит, поєднаний з хронічним холециститом та ожирінням, при введенні «Нуклеїнату». *Суч гастроентерол.* 2011; 4(60):69-73.

252. Karin M., Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*. 2016;529(7586):307–315. doi: 10.1038/nature17039.
253. IL-1 β production through the NLRP3 inflammasome by hepatic macrophages links hepatitis C virus infection with liver inflammation and disease. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Daryl T, Lau Y, Doehle B. *PLoS Pathog*. 2013;9. doi: 10.1371/journal.ppat.1003330.
254. Molecular Mechanisms during Hepatitis B Infection and the Effects of the Virus Variability. Campos-Valdez M., Monroy-Ramírez H. C., Armendáriz-Borunda J., Sánchez-Orozco L. V. *Viruses*. 2021 Jun 18;13(6):1167. doi: 10.3390/v13061167.
255. Dzwonek J, Wilczynski GM. CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:175. doi: 10.3389/fncel.2015.00175.
256. Rosen HR. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2011;364:2429-38.
257. Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules. Tao Y., Wang M., Chen E., Tang H. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:4256352. doi: 10.1155/2017/4256352.
258. Asnaashari S, Amjad E, Sokouti B. A comprehensive investigation on liver regeneration: a meta-analysis and systems biology approach. *Clin Exp Hepatol*. 2021 Jun;7(2):183-190. doi: 10.5114/ceh.2021.107564.
259. Горай М.А., Гаджула Н.Г. Імунологічні аспекти розвитку хронічної механічної травми слизової оболонки порожнини рота. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2015; 25:206-209.
260. Kassah WT. Unresolved issues and controversies surrounding the management of colorectal cancer liver metastasis. *World J Surg Oncol*. 2015;13:61. doi: 10.1186/s12957-014-0420-6.

261. Казмирчук ВЕ, Ковальчук ЛВ, Мальцев ДВ. Клиническая иммунология и алергология с возрастными особенностями. К. : ВСИ «Медицина»; 2012. 520 с.

262. Carotid intimal medial thickness in rotating night shift is related to IL1 β /IL6 axis. Rizza S., Longo S., Piciucchi G., Romanello D., Mavilio M., Montagna M., Coppeta L., Martelli E., Magrini A., Federici M. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2020 Sep 24;30(10):1826-1832. doi: 10.1016/j.numecd.2020.05.028.

263. Non-alcoholic fatty liver disease; a full-bodied epidemic. Tushuizen M.E., Holleboom A.G., Koot B.G., Blokzijl H., van Mil S. W. C., Koek G.H. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2020 Feb 27;164:D4096.

ДОДАТОК А1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи
Івано-Франківського національного
медичного університету
проф. І.П. Вакалюк
_____ 2021 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки.
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 - 1) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
 - 2) Romak OI, Sadovska Yu, Goriuk I. Liver morpho-functional changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. Journal of Education, Health and Sport. 2017; 7(3): 690-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Івано-Франківського національного медичного університету.
5. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес (у матеріали лекцій та практичних занять) та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** 2021 навчальний рік.

Відповідальний за впровадження:

завідувач кафедри патологічної фізіології
Івано-Франківського національного
медичного університету
Заслужений діяч науки і техніки України,
доктор медичних наук, професор

Л.М. Заяць

ДОДАТОК А2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної
 роботи Харківського національного
 медичного університету
 д.мед.н. професор В. Д. Марковський



«24» 01 2021

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки».
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 1) Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. Deutscher Wissenschaftsherold. 2016;2:56-9.
 2) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфо-функціональний стан печінки шурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра загальної та клінічної патофізіології імені Д. О. Альперна Харківського національного медичного університету.
5. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес (у матеріали лекцій та практичних занять) кафедри.
6. **Термін впровадження:** 2019 навчальний рік.
7. **Зауваження та пропозиції.** Не виносилися.

Відповідальний за впровадження:

Професор кафедри загальної та клінічної
 патофізіології імені Д.О. Альперна
 Харківського національного
 медичного університету,
 доктор медичних наук, професор

 О. М. Шевченко

ДОДАТОК АЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Університетської клініки
Одеського національного
медичного університету
проф. Т.М. Муратова

«16»

04

2021

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки».
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 - 1) Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. Deutscher Wissenschaftsherold. 2016;2:56-9.
 - 2) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфофункціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.
5. **Форми впровадження:** введено у науково-дослідницьку роботу відділення.
6. **Термін впровадження:** 2018-2019.

Завідувач патолого-анатомічного відділення
Університетської клініки ОНМедУ



Т.О. Савенко

ДОДАТОК А4

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
Тернопільського національного
медичного університету
імені І.Я. Горбачевського,
професор А.Г. Шулгай

«26»



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки».
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 - 1) Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. Deutscher Wissenschaftsherold. 2016;2:56-9.
 - 2) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфофункціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Тернопільського національного медичного університету ім. І.Я. Горбачевського.
5. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес (у матеріали лекцій та практичних занять) та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** 2018-2019 навчальний рік.

Завідувач кафедри патологічної фізіології
Тернопільського національного
медичного університету
імені І.Я. Горбачевського,
доктор медичних наук, професор

Денефіль О.В.

ДОДАТОК А5



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Ректор Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова, акад. НАМНУ,
д.мед.н., проф. В.М. Мороз
« 31 » 05 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки».
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 - 1) Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. Deutscher Wissenschaftsherold. 2016;2:56-9.
 - 2) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.
5. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес (у матеріали лекцій та практичних занять) та наукову роботу кафедри.
6. **Результати впровадження:** застосування результатів дисертаційної роботи Ромака О.І. дозволить розширити наукові знання в навчальному процесі у студентів та удосконалити науково-методичні підходи з експериментального вивчення методів корекції хронічних захворювань печінки.
7. **Термін впровадження:** 2021-2022 навчальний рік.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає.

Розглянуто та затверджено на засіданні кафедри патологічної фізіології Вінницького національного медичного університету ім.М.І. Пирогова, протокол № 20 від 28.05 2021 р.

Відповідальний за впровадження

завідувач кафедри патологічної фізіології

Вінницького національного медичного

університету ім. М. І. Пирогова, д.мед.н., професор

Н.А. Рикало

ДОДАТОК А6



«ЗАТВЕДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
 Запорізького державного медичного
 університету,
 професор Візір Вадим Анатолійович

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали кандидатської дисертації «Патогенетичні механізми регенерації тканини печінки за умов корекції експериментально індукованого хронічного гепатиту та цирозу печінки».
2. **Установа-розробник, автор:** Одеський національний медичний університет, асистент кафедри загальної та військової хірургії Ромак Олег Ігорович.
3. **Джерело інформації:** наукові роботи у фахових виданнях:
 - 1) Kholodkova OL, Romak OI. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. Deutscher Wissenschaftsherold. 2016;2:56-9.
 - 2) Холодкова ОЛ, Перепелюк ММ, Горчаг ДМ, Ромак ОІ. Морфо-функціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4, 2(140):156-9.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної фізіології з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медичного університету.
5. **Форми впровадження:** введено у навчальний процес (у матеріали лекцій та практичних занять) та наукову роботу кафедри.
6. **Термін впровадження:** 2020/2021 навчальний рік (обговорено на засіданні кафедри 22.02.2021 р., протокол № 10).

Завідувач кафедри патологічної фізіології
 з курсом нормальної фізіології
 Запорізького державного медичного університету,
 доктор медичних наук, професор

О.В. Ганчева

ДОДАТОК Б

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Kholodkova O.L., Romak O.I. Experimental grounds of using platelet-rich plasma to stimulate the liver regeneration in case of chronic hepatitis. *Deutscher Wissenschaftsherold*. 2016. N2. P.56-59 (Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував статтю до друку).
2. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Горчаг Д.М., Ромак О.І. Морфофункціональний стан печінки щурів в динаміці моделювання токсичного гепатиту. *Вісник проблем біології і медицини*. 2017. Вип.4, Т.2(140). С.156-159 (Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, брав участь у сформулюванні висновків, підготував статтю до друку).
3. Romak O.I., Sadovska Yu., Goriuk I. Liver morpho-functional changes and proinflammatory cytokines in experimental animals in case of cirrhosis. *Journal of Education, Health and Sport*. 2017. N7(3). P. 690-699 (Здобувач приймав участь у наборі матеріалу та описанні отриманих результатів, підготував статтю до друку).
4. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Цироз печінки – коли змінити антифіброзну парадигму на ангиогенну? (Огляд літератури та власних досліджень). *Одеський медичний журнал*. 2017. №6. С.22-26 (Здобувач провів літературний пошук, підготував статтю до друку).
5. Апфельханс О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І., Полукарова Л.А. Збагачена тромбоцитами плазма, як шанс на одужання для хворого з цирозом печінки. *Інтегративна антропологія*. 2019. №1. С.22-25 (Здобувач здійснив літературний пошук, брав участь в обговоренні результатів).

6. Influence of platelet-enriched plasma on the morpho-functional state of liver in rats with induced non-alcoholic steatohepatitis and dyslipidemia / O. Appelhans, I. Maznichenko, O. Kasatkin, Hussein Abdulla, M Biriuk., O. Romak. *Journal of Education, Health and Sport*. 2020. N10(6). P.455-464 (*Здобувач брав участь у проведенні експерименту, підготував тези до друку*).

7. Вплив чотирихлористого вуглецю на стан нирок при моделюванні експериментального гепатиту / Ю.О. Садовська, І.А. Горюк, Д.П. Терновий, К.О. Смірнова, О.І. Ромак. Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів) : наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Одеса, 22-24 квітн. 2015 р. Одеса, 2015. С.49. (*Здобувач брав участь у наборі матеріалу, підготував тези до друку*).

8. Морфологічна характеристика патологічних змін у печінці за умов корекції експериментального цирозу різними способами / Д.П. Терновий, Ю.О. Садовська, І.А. Горюк, Є.О. Смірнова, О.І. Ромак. Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини (для молодих вчених та студентів) : наук-практ. конф. з міжнар. уч., м. Одеса, 27-28 квітн. 2017 р. Одеса, 2017. С.24. (*Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, узагальнив результати, підготував тези до друку*).

9. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Теоретичне та експериментальне обґрунтування можливостей патогенетичної терапії фіброзу печінки. Прикладні аспекти морфології, присвячена пам'яті професорів-морфологів Терентьєва Г.В., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П. : наук.-практ. конф., м. Вінниця, 21-22 вересн. 2017 р. Вінниця, 2017. С.163. (*Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку*).

10. Холодкова О.Л., Ромак О.І., Перепелюк М.М., Кожухаренко Т.І. Структурно-функціональні перетворення печінки за умов експериментального токсичного гепатиту та цирозу. Взаємодія лікаря загальної практики та лікаря-спеціаліста в лікуванні поліморбідного пацієнта : наук.-практ. конф., м. Одеса, 26 квітн. 2017 р. Одеса, 2017. С.94-96. *(Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку).*

11. Холодкова О.Л., Перепелюк М.М., Ромак О.І. Ефекти збагаченої тромбоцитами плазми при експериментальній терапії цирозу печінки. Актуальні досягнення медичних досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя : зб. тез наук. робіт уч. міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 5-6 жовтн. 2018 р. Київ, 2018. С.5-6. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, здійснив мікроскопічне дослідження органів, підготував тези до друку).*

12. Холодкова О.Л., Ромак О.І., Кожухаренко Т.І. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі : інформ. лист (№ 347-2018). Київ, 2018. 6 с. *(Здобувач здійснив мікроскопічне дослідження органів, приймав участь в опрацюванні результатів).*

13. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі: пат. 101004 Україна: МПК А61Р 1/16, А61К 35/407. № 201500473; заявл. 06.04.2015; опубл. 25.08.2015, Бюл. № 16. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

14. Спосіб відтворення тканини печінки в експерименті при цирозі: пат. 111669 Україна: МПК G09В 23/28. №201500877; заявл. 06.04.2015; опубл. 25.05.2015, Бюл. № 10. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

15. Спосіб діагностики стадії токсичного гепатиту в експерименті: пат. 123945 Україна: МПК G09B 23/28. №201710440; заявл. 30.10.2017; опубл. 12.03.2018, Бюл. № 5. 4 с. *(Здобувач виконав експериментальне дослідження, провів мікроскопічне дослідження органів).*

ДОДАТОК В

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

- Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 85-річчю з дня заснування Студентського наукового товариства ОНМедУ «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 2015);
- Науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 100-річчю з дня народження І.Г.Герцена «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини» (Одеса, 2017);
- Науково-практична конференція «Взаємодія лікаря загальної практики та лікаря-спеціаліста в лікуванні поліморбідного пацієнта» (Одеса, 2017);
- Науково-практична конференція «Прикладні аспекти морфології», присвячена пам'яті професорів-морфологів Терентьєва В.Г., Роменського О.Ю., Когана Б.Й., Шапаренка П.П., Жученка С.П. (Вінниця, 2017);
- Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні досягнення медичних досліджень в Україні та країнах ближнього зарубіжжя» (Київ, 2018).