

*На правах рукописи*

**ГРИГОРЬЕВА Евгения Александровна**

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

Специальность 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Чебоксары – 2024

Работа выполнена на кафедре медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова»

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор **Сергеева Валентина Ефремовна**

**Официальные оппоненты:** **Григорьева Юлия Владимировна**, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры гистологии и эмбриологии

**Ельчанинов Андрей Владимирович**, доктор медицинских наук, доцент, «Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына» Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», заведующий лабораторией роста и развития

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Ярославль

Защита состоится «25» декабря 2024 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета 24.2.434.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» по адресу: г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38, учебный корпус №3, зал заседаний Ученого совета, кабинет 301.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова по адресу: 428034, Чувашская Республика, г. Чебоксары, ул. Университетская, д. 38 и на сайте [www.chuvsu.ru](http://www.chuvsu.ru).

Автореферат разослан «24» октября 2024 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.2.434.01  
доктор биологических наук, доцент

Наталья Николаевна Голубцова

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Печень – паренхиматозный орган, задействованный во многих процессах: кроветворение во внутриутробном периоде; белковый, углеводный, жировой обмена; детоксикация; метаболизм лекарственных веществ, регулирование объема крови и многое другое (Trefts E. et al., 2017). При этом повреждения печени на ранних этапах сложно диагностируемы, так как не проявляют себя в биохимических анализах крови (Лазебник Л. Б. и др., 2021). Однако на микроскопическом уровне изменения уже могут наблюдаться. В связи с этим немаловажным является установление уровня NOAEL (no observed adverse effect level), подразумевающего под собой самую высокую дозу, при которой не наблюдаются клинических проявлений, но могут быть найдены изменения на уровне физиологической адаптации (Dorato M. N., 2005; Гордова В. С. и др., 2021).

Печень состоит из стромы и паренхимы, образованной печеночными дольками. Основными компонентами печеночных долек являются гепатоциты. Кроме гепатоцитов в состав дольки входят клетки Купфера, звездчатые клетки, pit-клетки, эндотелиоциты, а также центральная вена, междольковая вена, артерия и желчный проток (Гунин А. Г., 2019). В печени также встречаются тучные клетки, эозинофилы, гистиоциты, фибробласты, лимфоциты, в том числе и плазмоциты (Юкина Г. Ю. и др., 2021; Гунин А. Г., 2019; Huang S. et al., 2022; Xu L. et al., 2022). Каждый из них является важным, незаменимым компонентом органа, необходимым для реализации его функционального потенциала. Более того, печень – единственный орган, способный к регенерации до исходных размеров (Ельчанинов А. В., Фатхудинов Т. Х., 2023) путем репаративной регенерации, которая активизируется при резекции или повреждении (Блинкова Н. Б. и др., 2017). Следовательно, установление факторов, способных вызывать повреждения в органе на микроскопическом уровне, позволит предупреждать развитие заболеваний на этапе первичной профилактики.

Кремний (Si) – второй по распространенности на земном шаре химический элемент, существующий преимущественно в виде кремнезема и силикатов (на долю которых приходится около 27% массы элемента) и содержащийся во всех тканях и органах человеческого организма (Exley S. 1998; Гордова В. С. и др., 2022; Григорьева Е. А. и др., 2022; Егорова Н. А. и др., 2022), в связи с чем он вызывает интерес у многих ученых. Вопрос о его биологической роли в живых организмах до сих пор остается открытым.

Кремний нашел широкое применение в промышленности; его используют при изготовлении стали, абразивов, кирпича, блоков транзисторов, солнечных батарей, выпрямителей, стекла, компьютерных чипов, лакокрасочных материалов и в других сферах (Martin K. R., 2007). Неорганические и органические соединения кремния используются в пищевой промышленности. Они часто применяются в качестве агента против слеживаяния, осветлителя в напитках, регулятора вязкости, противовспенивающего агента, формообразующего вещества в составе лекарственных препаратов и витаминов

(Martin K. R., 2006, 2007). Следовательно, диапазон применения соединений кремния с каждым годом растет, что становится причиной большего контакта человека с данным микроэлементом, о последствиях которого мало кто задумывается.

Считается, что используемые в промышленных областях химические формы кремния, как правило, не являются биодоступными (Сапожников С. П. и др., 2013; Гордова В. С. и др., 2021). Тем не менее коллоидная кремниевая кислота, силикагель и цеолиты, хотя и относительно нерастворимы в воде, могут увеличивать общую концентрацию в ней водорастворимого кремнезема (Martin K. R., 2013). В современном мире люди ежедневно подвергаются воздействию диоксида кремния в составе пищевых продуктов, а также других соединений кремния, поступающих с водой, которые обладают способностью к абсорбции и биодоступности (Abulikemu A. et al., 2022). Особенно остро данный вопрос должен подниматься на территориях страны, относящихся к так называемым «кремниевым» провинциям (Сусликов В. Л., 1978; Сапожников С. П., 2001; Вапиров В. В. и др., 2017), жители которых оказываются более подверженными воздействию высоких доз кремния. Однако возможные последствия длительного влияния кремния на организм недостаточно изучены.

С 1 марта 2021 г. вступил в силу новый нормативный документ СанПиН 2.1.3685-21, в котором требования к предельно допустимой концентрации кремния в воде были изменены. Согласно действующему документу гигиенический норматив для кремния зависит от жесткости воды и составляет 25 мг/л при жесткости воды до 2,5 мг-экв/л и 20 мг/л при жесткости воды более 2,5 мг-экв/л (Рахманин Ю. А. и др., 2021). В то же время данных об изучении влияния кремния, поступающего в предельно допустимых дозах в течение длительного времени, не было обнаружено.

Учитывая, что по системе воротной вены от непарных органов брюшной полости кровь, насыщенная различными веществами, в том числе макро- и микроэлементами, переносится в печень (Kubes P. et al., 2018; Abdel-Misih S. R. et al., 2019; Davies S. P. et al., 2020), важно изучить изменения микроскопической структуры данного органа, так как именно печень будет одним из первых барьеров на их пути. В связи с этим **актуальность** изучения изменений в микроскопическом строении печени в условиях длительного поступления кремния с питьевой водой в предельно допустимых концентрациях не вызывает сомнений.

### **Степень разработанности**

Несмотря на имеющиеся исследования, моделирующие воздействие различных соединений кремния на организм человека, вопрос о безопасности соединений кремния до сих пор остается не до конца изученным, что также подтверждается обзором литературы. Существующие публикации преимущественно касаются изучения потенциально негативного воздействия наноразмерных форм кремния при поступлении их в токсических дозах внутривенным (Yu Y. et al., 2017; Tassinari R. et al., 2021), внутрибрюшным (Mahmoud A. M. et al., 2019), пероральным (Sadek S. A. et al., 2016; Azouz R. A., Korany R. M. S., 2021; Badawy M. M. et al., 2023) способами, а также через

дыхательные пути (Sun M. et al., 2021; Li J. et al., 2022; Liang Q. et al., 2023). При этом наночастицы кремния, независимо от способа их поступления, обнаруживались в печени (Liang Q. et al., 2023). Вместе с тем следует помнить, что одним из основных источников кремния является питьевая вода (Гордова В. С. и др., 2013). Несмотря на это, должного внимания к водорастворимым формам кремния в настоящий момент не уделяется. Ранее изучено воздействие девятиводного метасиликата натрия, поступающего с питьевой водой, на организм лабораторных крыс в течение длительного времени. Было выявлено негативное влияние водорастворимого кремния на состояние лимфоидных органов лабораторных крыс, таких как тимус, селезенка и подслизистые агрегированные лимфоидные узелки (Гордова В. С., 2014; Гордова В. С. и др., 2021). В то же время данных по изучению морфологического строения печени на фоне воздействия водорастворимых форм кремния при его пероральном поступлении не было найдено.

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

**Задачи исследования:**

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

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

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

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

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

**Научная новизна**

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

эксперимента в печени крыс возрастает площадь центральной вены, междольковых сосудов и желчного протока.

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

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

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

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

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

Данная работа носит экспериментальный характер. Полученные результаты о реактивных и адаптационных изменениях в печени в ответ на

поступление с питьевой водой кремния могут представлять интерес для врачей-специалистов: профпатологов, диетологов, гастроэнтерологов, патологоанатомов, фармакологов, а также могут быть использованы в образовательном процессе при чтении лекций, проведении практических и лабораторных занятий на кафедрах общей и клинической морфологии, гигиены, фармакологии, гастроэнтерологии, при написании учебных пособий и рекомендаций на соответствующих кафедрах.

### **Методология и методы исследования**

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

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

### **Научные положения, выносимые на защиту**

1. Поступление кремния в концентрации, соответствующей предельно допустимой (20 мг/л), в течение двух месяцев приводит к развитию воспалительного процесса в печени с нарушением ее гистологической структуры преимущественно за счет стромального компонента (увеличение числа эозинофилов в области портальных зон; возрастание количества тучных клеток, макрофагов; усиление люминесценции биогенных аминов в содержащих их структурах; увеличение диаметра синусоидных капилляров). Со стороны паренхимы происходит активизация процессов белкового синтеза (гипертрофия гепатоцитов, усиление оптической плотности РНК в их цитоплазме).

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

**Степень достоверности и апробация результатов научных исследований.** Достоверность полученных результатов в ходе исследования была обеспечена подбором адекватных общегистологических, флуоресцентных,

иммуногистохимических методов, а также последующей статистической обработкой. Результаты, представленные в диссертационной работе, доложены на региональных, всероссийских и международных научных мероприятиях.

**Соответствие паспорту специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология (медицинские науки): изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также регуляции этих процессов (п. 10); исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды (п. 14).

**Реализация и внедрение результатов работы.** Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова» и кафедры терапии и семейной медицины ГАУ ДПО «Институт усовершенствования врачей» Минздрава Чувашии, а также используются при чтении лекций в школах здоровья БУ «Больница скорой медицинской помощи» Минздрава Чувашии и БУ «Красночетайская районная больница» Минздрава Чувашии.

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

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы из 302 наименований, включает в себя 177 страниц машинописного текста, 37 рисунков, 18 таблиц.

## II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** представлены актуальность данного исследования, степень разработанности проблемы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, научные положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов научных исследований.

В **первой главе** проведен обзор литературы, который включает в себя сведения о морфофункциональной характеристике печени; об изучаемом микроэлементе – кремнии, его применении, способах поступления, распределения в организме; затрагиваются вопросы о его биодоступности, о некоторых патологических процессах, причиной которых он может быть.

**Вторая глава** посвящена материалу и методам исследования. Объектом исследования выступала печень лабораторных нелинейных белых крыс-самцов ( $n = 80$ ). На начало эксперимента все животные были одного возраста ( $60 \pm 2$  дня) и примерно одной массы тела ( $112,3 \pm 7,77$  грамма), содержались в обычных условиях вивария при естественном освещении. Уход за всеми животными осуществлялся в соответствии с рекомендованными правилами и нормами (Западнюк И. П. и др., 1983; ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»). Предметом исследования явилось изучение влияния кремния на морфологическую структуру печени лабораторных животных при поступлении его в концентрации 20 мг/л с питьевой водой, соответствующей стандартам.

Схема эксперимента была следующей: контрольная группа животных ( $n = 40$ ) получала питьевую воду, соответствующую стандартам; опытная группа ( $n = 40$ ) получала ту же самую воду, но с добавлением девятиводного метасиликата натрия с доведением общей концентрации кремния до 20 мг/л. В среднем каждое животное получало кремния 0,8–1,2 мг/кг. Животные обеспечивались свободным доступом к питьевой воде. Девятиводный метасиликат натрия для насыщения питьевой воды кремнием выбран в связи с его водорастворимостью, а также уже имеющимся опытом его использования другими исследователями (Сапожников С. П., 2001; Дьячкова И. М., 2011; Гордова В. С., 2014). Массовая концентрация растворенных форм кремния в экспериментальной воде определялась с помощью спектрометра эмиссионного с индуктивно связанной плазмой 5110 ICP-OES, а жесткость воды – с помощью тест-полосок индикаторных для анализа воды Биосенсор-Аква-5 (Производитель ООО «Биосенсор АН»). Так, массовая концентрация растворенных форм кремния в воде контрольной группы составила 10,491 мг/дм<sup>3</sup>, в воде опытной группы – 20,002 мг/дм<sup>3</sup>, при жесткости воды 3,2 мг-экв./л в обоих случаях.

Эксперименты проводились в течение двух и девяти месяцев. Животных взвешивали двукратно на электронных весах ISA SF-400: в день начала и в день окончания эксперимента. Через два месяца путем дислокации шейных позвонков было выведено из эксперимента 40 животных (контрольные – 20 штук; опытные – 20 штук), через девять месяцев – остальные (контрольные – 20

штук; опытные – 20 штук). Забор печени крыс проводили в одно и то же время суток, примерно с 15 до 17 часов, чтобы избежать разброса данных по содержанию биогенных аминов, связанных с суточными колебаниями (Сергеева В. Е., 1992; Смирнова Т. Л. и др., 2009; Стручко Г. Ю., 2000). Взвешивание печени проводили на торсионных весах ВТ-500. Часть извлеченной печени замораживали в криостате для дальнейшего приготовления свежемороженых срезов, остальную фиксировали в 10% нейтральном формалине для последующей заливки в парафин и приготовления парафиновых срезов толщиной 5  $\mu\text{m}$ . Далее депарафинированные срезы подвергались гистологическому и иммуногистохимическому окрашиванию.

В диссертационной работе использовались следующие специальные методы:

1. Гистологические: а) окраска гематоксилином и эозином (Коржевский Д. Э., Гиляров А. В., 2010); б) окраска толуидиновым синим по Унна (Ромейс Б., 1953); в) окраска по Ван-Гизону (Меркулов Г. А., 1969); г) окраска метиловым зеленым-пиронином по методу Браше (Пирс Э., 1962); д) окраска по методу Фельгена (Пирс Э., 1962).

2. Иммуногистохимические и иммунофлуоресцентные: а) выявление Iba-1-, CD68-позитивных клеток (использовали иммуногистохимический метод и непрямой иммунофлуоресцентный метод с применением специфических антител (АТ): первичные (кроличьи АТ против белка Iba-1 (1:500, Wako, Япония) и мышьиные АТ против белка CD68 (1:500, Abcam, Великобритания); вторичные (биотинилированные АТ (1:500, goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG, Vector Laboratories, США) и АТ с флуоресцентной меткой (1:500, goat anti-rabbit IgG (H+L) Alexa 594, goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa 488, Thermo Fischer Scientific, КНР) (Мавликеев М. О. и др., 2020; Гусельникова В. В. и др., 2022); б) выявление DAPI-позитивных ядер (инкубация с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (Dianova, Гамбург, Германия) в течение 30 минут при комнатной температуре в темноте) (Szczepiek A. J. et al., 2020).

3. Люминесцентно-гистохимические: а) метод Кросса, Эвана, Роста для выявления гистамина (основан на появлении флуоресцирующих производных имидазолэтиламина в тканях печени в результате реакции между гистамином и парами ортофталевого альдегида) (Cross S. A. et al., 1971); б) метод Фалька – Хилларпа для выявления серотонина и катехоловых аминов (основан на реакции моноаминов с формальдегидом, в результате которой образуются флуоресцирующие соединения) (Крохина Е. М., 1969).

4. Цитоспектрофлуориметрические и цитоспектрофотометрические: а) измерение интенсивности люминесценции (у. е.) с помощью люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-4 с установленной дополнительной насадкой ФМЭЛ-1А и выходным напряжением 900 В при использовании светофильтра № 7 (с длиной волны 515 нм для гистамина), № 6 и № 8 (с длиной волны 480 нм для катехоловых аминов и с длиной волны 525 нм для серотонина) (Карнаухов В. Н., 1978); б) определение оптической плотности ДНК в ядре гепатоцитов и РНК в ядре и цитоплазме гепатоцитов с использованием микроскопа МИКМЕД-5 и ФМЭЛ-1А (насадка

фотометрическая люминесцентная) на зеленом (500 нм) монохроматичном светофильтре (Ув. Об.  $\times 900$ , зонд – 0,5) (Ильина Л. Ю. и др., 2021).

5. Морфометрический анализ: а) с помощью программы AmScore версии x64 4.11.18421.202110202 по изображениям, полученным с использованием микроскопа МИКМЕД-6 и цифрового фотоаппарата AmScore (MU1000) при увеличении объектива  $\times 40$ ,  $\times 100$  после предварительной геометрической калибровки по оцифрованной с тем же увеличением шкале объект-микрометра, измерялись: площади поперечного сечения (ППС) центральных вен, междольковых артерий и вен, междольковых желчных протоков, CD68- и Iba-позитивных клеток (Ув. Об.  $\times 40$ ); ППС гепатоцитов, ядер гепатоцитов, эозинофилов, тучных клеток, диаметр синусоидных капилляров (Ув. Об.  $\times 100$ ). На тех же микрофотографиях с полей зрения подсчитывали количество одно- и двуядерных гепатоцитов, а также их ядер; количество тучных клеток, макрофагов; количество эозинофилов на микрофотографиях со случайных полей зрения и в области портальных зон; б) с помощью программы ImageJ замеряли площади DAPI-позитивных ядер, а также Iba-1- и CD68-позитивных клеток для последующего замера интенсивности флуоресценции (Абдрахимова Й. Р., Абдрахимов Ф. А., 2019); в) коэффициент формы (КФ) и индекс контура ядра (ИК) определяли по формулам:  $K\Phi = 4 \times \pi \times S_{я}/P_{я}^2$ , а индекс контура, отражающий рельеф его поверхности, – по формуле  $ИК = P_{я} / \sqrt{S_{я}}$ , где  $S_{я}$  – площадь клетки,  $P_{я}$  – периметр клетки. При этом круг имеет коэффициент формы, который равняется 1, и индекс контура 3,54 (Smitha T. et al., 2011); г) для описания качественных изменений тучных клеток использовался метод их разделения по степени дегрануляции, а также метахроматичности (Ильина Л. Ю. и др., 2020).

Статистическая обработка полученных цифровых данных проводилась с помощью программ Microsoft Office Excel, Statistica 10. Все полученные в ходе измерения выборки проверяли на нормальность распределения с использованием критериев Шапиро – Уилка и Колмогорова – Смирнова. В случае нормального распределения изучаемого признака данные представляли, как среднюю арифметическую со стандартной ошибкой среднего значения, в виде  $M \pm m$ . Статистическую значимость отличий определяли с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. При ненормальном распределении выборок – данные представлялись как медиана ( $Me$ ) и интерквартильный размах ( $L25$ ;  $U75$ ). В этом случае для определения статистической значимости использовали U-критерий Манна–Уитни. Различия во всех случаях считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ . В целях определения взаимосвязи между изменениями изучаемых структур рассчитывался коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Площади поперечного сечения одноядерных и двуядерных гепатоцитов, их ядер, тучных клеток печени контрольной и опытной групп распределяли по методу сигмальных отклонений. Площади макрофагов распределяли автоматически с помощью гистограммы в программе Statistica-10. Для оценки значимости различий между измеряемыми структурами (площадь гепатоцитов, ядер гепатоцитов, тучных клеток и макрофагов) печени крыс контрольной и опытной групп, распределенных по методу сигмальных отклонений и с помощью гистограммы, применялся критерий хи-квадрат Пирсона

(Медик В. А., 2000). Для выявления взаимосвязи и упорядочения выборок в сравнительно однородные группы (кластеры) использовался кластерный анализ (Медик В. А. и др., 2000; Лобанова Е. Е. и др., 2015). Факторный анализ применялся для выявления внутренних причин (факторов), формирующих определенный процесс в изучаемом органе, на основании имеющейся информации (Дубровская Л. И. и др., 2011).

В **третьей главе** представлены результаты собственного исследования.

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

Для сравнения количественных показателей печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, была проведена морфометрия микрофотографий с полей зрения, полученных с помощью микроскопа МИКМЕД-6 и цифровой фотокамеры AmScore (MU1000) при увеличении объектива  $\times 40$ ,  $\times 100$  (рисунок 1).

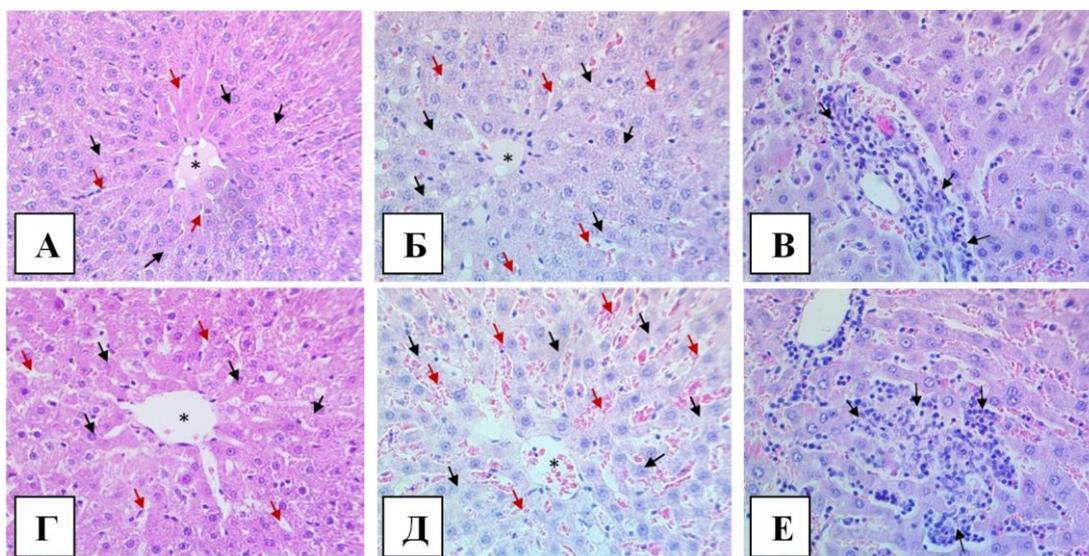


Рисунок 1 – Микропрепарат печени крыс контрольной (А, Б) и опытной (В, Г, Д, Е) групп через два (А, Г) и девять (Б, В, Д, Е) месяцев эксперимента. Окраска гематоксилином и эозином.

Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 40. Цифровая камера AmScore (MU1000): А, Б, Г, Д – визуализируются печеночные пластинки (указаны черными стрелками), располагающиеся вокруг центральной вены (отмечены звездочками). Синусоидные капилляры (указаны красными стрелками) в печени крыс опытной группы на обоих сроках эксперимента расширены; В – полиморфно-клеточная инфильтрация области порталных зон в печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев; Е – отдельные скопления клеток воспалительного инфильтрата в печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев

В печени крыс, находившихся в эксперименте девять месяцев, в отличие от печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух месяцев, заметны явно выраженные возрастные изменения, которые характеризуются уменьшением количества одноядерных и двуядерных гепатоцитов в поле зрения, увеличением площади гепатоцитов, цитоплазмы гепатоцитов, ядер гепатоцитов печени (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнение микроморфологических характеристик печени лабораторных крыс (Si 20 мг/л). Микроскоп МИКМЕД-6. Объектив  $\times 40$ ,  $\times 100$ . Цифровая камера AmScore (MU1000)

Параметр	Срок эксперимента			
	2 месяца		9 месяцев	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
Общее увеличение $\times 1000$				
Количество гепатоцитов в поле зрения, шт.	37,88 $\pm$ 1,60	34,60 $\pm$ 1,25	23,76 $\pm$ 0,94	21,92 $\pm$ 0,74
Количество ядер гепатоцитов в поле зрения, шт.	25,63 $\pm$ 1,18	25,80 $\pm$ 1,39	13,90 $\pm$ 0,87	14,31 $\pm$ 0,66
Количество двуядерных гепатоцитов в поле зрения, шт.	3,50 $\pm$ 0,68	3,00 $\pm$ 0,55	1,62 $\pm$ 0,33	1,69 $\pm$ 0,20
Доля двуядерных клеток от общего числа гепатоцитов в поле зрения, %	9,16 $\pm$ 1,29	8,73 $\pm$ 0,93	7,12 $\pm$ 1,14	8,27 $\pm$ 0,93
ППС одноядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	219,52 $\pm$ 4,30	<b>255,07<math>\pm</math>7,80*</b>	458,76 $\pm$ 12,85	456,21 $\pm$ 12,11
ППС цитоплазмы одноядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	176,11 $\pm$ 3,91	<b>215,06<math>\pm</math>7,35*</b>	370,49 $\pm$ 11,50	395,33 $\pm$ 12,84
ППС ядер одноядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	40,83 $\pm$ 0,83	38,34 $\pm$ 1,01	74,75 $\pm$ 1,46	72,98 $\pm$ 1,20
ЯЦО в одноядерных гепатоцитах	0,25 $\pm$ 0,01	<b>0,20<math>\pm</math>0,01*</b>	0,22 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
ППС двуядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	326,21 $\pm$ 16,63	300,40 $\pm$ 27,93	464,63 $\pm$ 34,09	559,55 $\pm$ 56,24
ППС цитоплазмы двуядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	252,30 $\pm$ 13,68	247,36 $\pm$ 26,48	349,60 $\pm$ 29,05	441,44 $\pm$ 48,48
ППС ядер двуядерных гепатоцитов, мкм <sup>2</sup>	36,96 $\pm$ 1,50	<b>26,52<math>\pm</math>1,18*</b>	57,51 $\pm$ 2,99	59,06 $\pm$ 3,86
ЯЦО в двуядерных гепатоцитах	0,29 $\pm$ 0,01	<b>0,23<math>\pm</math>0,02*</b>	0,34 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,03
Диаметр синусоидных капилляров, мкм	4,36 $\pm$ 0,11	<b>5,85<math>\pm</math>0,19*</b>	6,99 $\pm$ 0,11	<b>9,77<math>\pm</math>0,11*</b>
Общее увеличение $\times 400$				
ППС центральной вены, мкм <sup>2</sup>	2970,43 $\pm$ 259,90	3287,71 $\pm$ 633,20	1588,84 $\pm$ 91,43	<b>2994,51<math>\pm</math>312,10*</b>
ППС междольковой вены, мкм <sup>2</sup>	1018,67 $\pm$ 119,96	1214,26 $\pm$ 93,47	824,08 $\pm$ 87,12	<b>1398,98<math>\pm</math>104,94*</b>
ППС междольковой артерии, мкм <sup>2</sup>	78,26 $\pm$ 11,26	77,79 $\pm$ 14,25	38,30 $\pm$ 4,27	<b>94,71<math>\pm</math>11,85*</b>
ППС междолькового желчного протока, мкм <sup>2</sup>	55,93 $\pm$ 5,48	54,01 $\pm$ 9,77	35,72 $\pm$ 6,18	<b>73,69<math>\pm</math>5,73*</b>

*Примечание.* \* – статистически значимые различия средних величин,  $p < 0,05$ ; ЯЦО – ядерно-цитоплазматическое отношение; ППС – площадь поперечного сечения.

Через два месяца эксперимента с поступлением кремния у крыс опытной группы в сравнении с контрольной выявлено: увеличение площади поперечного

сечения (ППС) одноядерных гепатоцитов в 1,16 раза, ППС их цитоплазмы – в 1,22 раза, уменьшение ЯЦО – в 0,8 раза; уменьшение ППС ядер двуядерных гепатоцитов – в 0,72 раза, ЯЦО – в 0,79 раза; увеличение диаметра синусоидных капилляров – в 1,34 раза. Через девять месяцев обнаружены статистически значимые изменения диаметра синусоидных капилляров в 1,39 раза, ППС центральной вены – в 1,88 раза, ППС междольковой вены – в 1,69 раза, ППС междольковой артерии – в 2,47 раза и ППС междолькового желчного протока – в 2,06 раза.

Проведено распределение ППС одноядерных гепатоцитов с помощью метода сигмальных отклонений с последующим их представлением в виде гистограмм (рисунок 2, рисунок 3).

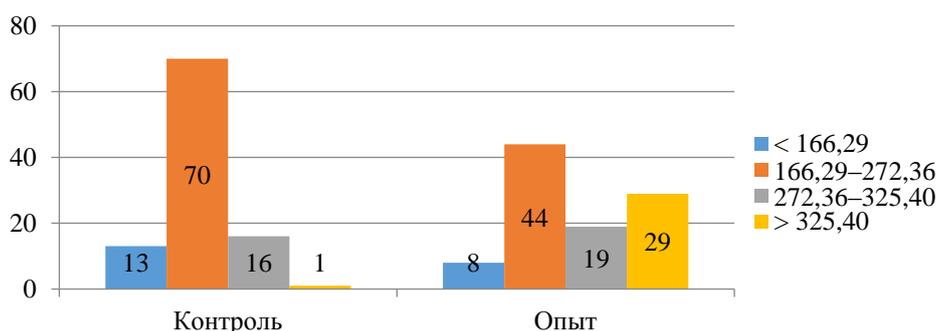


Рисунок 2 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, %

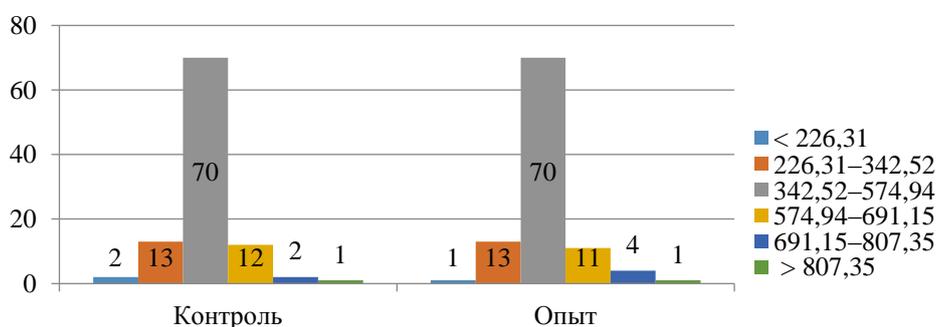


Рисунок 3 – Гистограмма распределения площади поперечного сечения одноядерных гепатоцитов печени крыс, находившихся в эксперименте с поступлением кремния с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение девяти месяцев, %

По данным рисунка 2, в печени крыс опытной группы, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л в течение двух месяцев, отмечаются статистически значимое уменьшение доли одноядерных гепатоцитов с ППС 166,29–272,36 мкм<sup>2</sup> на 26% ( $p = 0,001$ ); увеличение доли одноядерных гепатоцитов, имеющих ППС > 325,40 мкм<sup>2</sup> на 28% ( $p = 0,001$ ). Через девять месяцев эксперимента (рисунок 3) статистически значимых изменений в распределении ППС одноядерных гепатоцитов не наблюдается.

Касательно площади двуядерных гепатоцитов через два месяца эксперимента в печени крыс опытной группы фиксируется увеличение доли клеток с ППС < 248,17 мкм<sup>2</sup> на 14 % ( $p = 0,013$ ) на фоне снижения доли клеток с ППС > 248,17

мкм<sup>2</sup>; через девять месяцев среди двуядерных гепатоцитов обнаруживается появление доли клеток с площадью поперечного сечения  $> 700,85$  мкм<sup>2</sup> ( $p = 0,001$ ).

Распределение ППС ядер одноядерных гепатоцитов печени крыс с помощью метода сигмальных отклонений не выявило статистически значимых изменений между контрольной и опытной группами на обоих сроках эксперимента. ППС ядер двуядерных гепатоцитов в печени крыс опытной группы через два месяца эксперимента несколько изменяется за счет увеличения доли ядер с площадью  $< 26,86$  мкм<sup>2</sup> на 38% ( $p = 0,001$ ) и уменьшения доли ядер с площадью  $26,86$ – $47,05$  мкм<sup>2</sup> на 21% ( $p = 0,002$ ); через девять месяцев обнаруживается увеличение доли ядер двуядерных гепатоцитов с ППС  $26,47$ – $41,99$  мкм<sup>2</sup> на 19% ( $p = 0,001$ ).

Данные корреляционного анализа выявили уменьшение силы связи между ППС гепатоцита / ППС ядра в одноядерных гепатоцитах в печени крыс опытной группы через девять месяцев эксперимента ( $r_s = 0,29$ ;  $p < 0,05$ ) в сравнении с контрольной группой ( $r_s = 0,54$ ;  $p < 0,05$ ). Через два месяца эксперимента явно значимых изменений корреляции между ППС гепатоцита / ППС ядра одноядерных гепатоцитов обнаружено не было, как и между ППС гепатоцита / ППС ядра двуядерных гепатоцитов на обоих сроках эксперимента.

В то же время в печени крыс опытных групп, получавших кремний с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, отмечалось повышение медианы оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов в 1,7 ( $p = 0,001$ ) и 1,13 ( $p = 0,001$ ) раза соответственно, а также увеличение медианы оптической плотности РНК в цитоплазме гепатоцитов в 1,29 и 1,33 раза через два и девять месяцев соответственно ( $p = 0,001$ ). В ядрах гепатоцитов печени крыс опытной группы через девять месяцев от начала эксперимента медиана оптической плотности РНК статистически значимо увеличивалась в 1,54 раза в сравнении с контрольной ( $p = 0,001$ ).

Измерение коэффициента формы и индекса контура ядра гепатоцитов по методу, предложенному Smitha T. с соавторами (2011), выявило, что ядра гепатоцитов печени крыс опытной группы, получавшей кремний с питьевой водой в течение девяти месяцев, с ППС  $< 47,52$  мкм<sup>2</sup> имели деформированные контуры, что, вероятно, свидетельствовало о том, что данные клетки находились в состоянии апоптоза.

Морфометрия препаратов печени, окрашенных DAPI, с помощью программы ImageJ выявила уменьшение площади ядер гепатоцитов в печени крыс опытных групп на 11% ( $p = 0,001$ ) и 4% ( $p = 0,585$ ) через два и девять месяцев соответственно.

Оценивали количественные характеристики эозинофилов (Ув.  $\times 1000$ ), тучных клеток (ТК) (Ув.  $\times 1000$ ) и макрофагов печени (Ув.  $\times 400$ ). Обнаруживалось увеличение количества эозинофилов в области портальных зон; их число через два месяца эксперимента по сравнению с контролем возрастало в 1,24 раза ( $p = 0,04$ ), а через девять месяцев – в 3,17 раза ( $p = 0,001$ ).

Подсчитывали среднее количество ТК в поле зрения, измеряли площадь ТК, а также определяли их тинкториальные свойства. Количество ТК увеличивалось через два месяца на 11% ( $p = 0,492$ ) и уменьшалось через девять месяцев на 22% ( $p = 0,206$ ). Средняя площадь ТК возрастала в 1,30 раза

( $p = 0,002$ ) и 1,19 раза ( $p = 0,001$ ) через два и девять месяцев соответственно. В том числе увеличивалась и доля больших ТК, которые обнаруживались при распределении площадей ТК по методу сигмальных отклонений. Вместе с тем изменялись и тинкториальные свойства ТК: через два месяца от начала эксперимента в печени крыс контрольной и опытной групп доля ортохромных ТК составила 63 и 25%, метахроматичных – 37 и 75% соответственно; через девять месяцев в печени крыс контрольной и опытной групп доля ортохромных ТК составила 7 и 39%, метахроматичных – 93 и 61% соответственно. Доля ТК с дегрануляцией через два месяца эксперимента увеличивалась на 25% ( $p = 0,001$ ), а через девять месяцев – снижалась на 50% ( $p = 0,001$ ).

При изучении гистологических препаратов печени, обработанных иммуногистохимическим методом для выявления CD68-позитивных клеток при помощи моноклональных антител, через два месяца в опытной группе в сравнении с контрольной обнаружены визуальные изменения в виде увеличения количества клеток на микрофотографию (рисунок 4А, 4Б). В то же время можно заметить, что размеры макрофагов через девять месяцев становились больше, что, вероятно, связано с их возрастными особенностями, а также усилением окислительных процессов (рисунок 4В). Однако воздействие водорастворимого кремния в течение девяти месяцев приводит к визуальному уменьшению размеров макрофагов (рисунок 4Г).

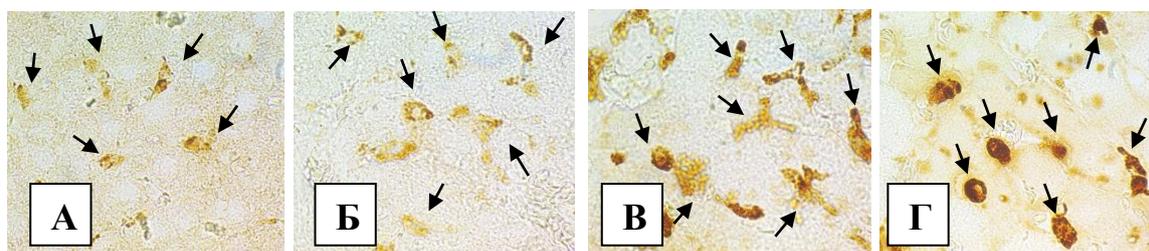


Рисунок 4 – CD68-позитивные клетки печени крыс контрольной (А, В) и опытной (Б, Г) групп через два (А, Б) и девять (В, Г) месяцев эксперимента. Иммуногистохимическое выявление CD68-позитивных клеток при помощи моноклональных антител. Микроскоп МИКМЕД-6. Об. 100. Цифровая камера AmScope (MU1000).  
CD68-позитивные клетки указаны стрелкой

Морфометрия CD68-позитивных макрофагов печени крыс, находившихся в эксперименте в течение двух и девяти месяцев, позволила подтвердить наблюдаемые визуально изменения: через два месяца в опытной группе в сравнении с контрольной количество клеток увеличивалось в 1,32 раза ( $p = 0,01$ ) в поле зрения; медиана площади клеток практически не изменялась ( $p = 0,63$ ), однако отмечалось небольшое увеличение доли макрофагов очень больших размеров ( $> 55,67 \text{ мкм}^2$ ); медиана периметра клеток уменьшалась в 0,95 раза ( $p = 0,10$ ); медиана площади, занимаемой CD68-позитивными макрофагами, относительно площади микрофотографии увеличивалась в 1,23 раза ( $p = 0,01$ ). Через девять месяцев эксперимента выявлено уменьшение медианы площади и периметра CD68-позитивных клеток печени крыс опытной группы в 0,51 и 0,63 раза соответственно ( $p = 0,001$ ). Распределение CD68-позитивных макрофагов печени по размерам на малые, средние, большие и очень большие выявило

статистически значимое увеличение доли макрофагов малого ( $5,74\text{--}27,71\text{ мкм}^2$ ), среднего ( $27,71\text{--}49,68\text{ мкм}^2$ ) размера и уменьшение доли очень больших ( $> 71,65\text{ мкм}^2$ ) по размеру клеток в печени крыс опытной группы ( $p = 0,001$ ). Количество CD68-позитивных клеток в печени крыс контрольной и опытной групп в поле зрения было сопоставимым.

Iba-1-позитивные клетки печени крыс опытной группы через два месяца эксперимента увеличиваются в количестве в 1,29 раза ( $p = 0,02$ ), медиана их площади уменьшалась в 0,87 раза ( $p = 0,001$ ), а медиана периметра клеток – в 0,96 раза ( $p = 0,08$ ). Медиана площади, занимаемой Iba-1-позитивными макрофагами, относительно площади микрофотографии с поля зрения увеличивалась в 1,16 раза ( $p = 0,38$ ).

В печени крыс опытной группы через два месяца эксперимента наблюдалось увеличение интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах в 1,23 раза ( $p = 0,001$ ), в люминесцирующих гранулярных клетках (ЛГК) – в 1,09 раза ( $p = 0,003$ ), а также в их микроокружении – в 1,22 раза ( $p = 0,001$ ). Через девять месяцев в гепатоцитах печени крыс опытной группы сохранялась подобная тенденция с увеличением интенсивности люминесценции гистамина в 1,04 раза ( $p = 0,001$ ). В то же время выявлялось снижение интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК в 0,96 раза ( $p = 0,031$ ). Данные изменения, возможно, связаны с компенсаторным увеличением количества тучных клеток в печени крыс опытной группы за счет молодой ортохромной популяции.

Обнаруживалось статистически значимое возрастание интенсивности люминесценции серотонина (СТ) и катехоловых аминов (КА) в изучаемых структурах (гепатоцитах, оболочках центральных вен, ЛГК и их микроокружении) печени крыс опытных групп на обоих сроках эксперимента (таблица 2).

Таблица 2 – Интенсивность люминесценции серотонина и катехоловых аминов в структурах печени лабораторных крыс, у. е.

Изучаемая структура	Срок эксперимента							
	2 месяца				9 месяцев			
	Контроль		Опыт		Контроль		Опыт	
	СТ	КА	СТ	КА	СТ	КА	СТ	КА
Оболочки центральных вен	0,17± 0,002	0,06± 0,001	0,21± 0,003*	0,07± 0,001*	0,73± 0,013	0,20± 0,001	0,81± 0,018*	0,24± 0,003*
Гепатоциты	0,35± 0,008	0,09± 0,001	0,45± 0,007*	0,10± 0,001*	1,06± 0,013	0,24± 0,002	1,24± 0,020*	0,28± 0,003*
ЛГК	0,79± 0,021	0,15± 0,002	1,17± 0,022*	0,20± 0,002*	2,71± 1,081	0,46± 0,013	3,55± 0,085*	0,52± 0,009*
Микроокружение ЛГК	0,52± 0,016	0,11± 0,002	0,81± 0,007*	0,16± 0,001*	1,02± 0,044	0,26± 0,007	1,75± 0,046*	0,37± 0,008*

*Примечание.* \* – статистически значимые различия средних величин,  $p = 0,001$ .

В целях обнаружения взаимосвязи между изучаемыми параметрами печени внутри экспериментальных групп проведены кластерный и факторный анализы. Кластерный анализ позволил выявить связи между площадью CD68-позитивных макрофагов, интенсивностью люминесценции серотонина в ЛГК и интенсивностью люминесценции гистамина в микроокружении ЛГК в печени

крыс контрольной группы через два месяца эксперимента, а также между площадью Iba-1-позитивных клеток и интенсивностью люминесценции гистамина в гепатоцитах. У крыс опытной группы формировался кластер, состоящий из ЯЦО одноядерных гепатоцитов, площади Iba-1-позитивных клеток и интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах, а также площади CD68-позитивных макрофагов и интенсивности люминесценции гистамина в ЛГК. Учитывая, что основными источниками биогенных аминов являются люминесцирующие их клетки, а также то, что CD68-позитивные макрофаги являются M1-поляризованными, то есть реализующими цитотоксичность, можно предположить их участие в развитии воспаления. Кроме того, в печени крыс опытной группы обнаруживались следующие кластеры: площадь цитоплазмы одноядерных гепатоцитов, интенсивность люминесценции серотонина в гепатоцитах, площадь одноядерных гепатоцитов, площадь тучных клеток; интенсивность люминесценции в оболочках центральных вен, диаметр синусоидных капилляров и площадь ядра в одноядерных гепатоцитах. При этом эти кластеры были соединены между собой на коротком расстоянии (Евклидово расстояние  $< 0,005$ ). Через девять месяцев в печени крыс контрольной группы площадь CD68-позитивных клеток объединяется в один кластер с интенсивностью люминесценции гистамина в оболочках центральных вен, а также образует связь с другим кластером, содержащим интенсивность люминесценции серотонина в оболочках центральных вен и интенсивность люминесценции катехоловых аминов в ЛГК, на коротком расстоянии (Евклидово расстояние  $< 0,005$ ). В печени крыс опытной группы площадь CD68-позитивных клеток объединяется с интенсивностью люминесценции серотонина и катехоловых аминов в ЛГК. Интересно отметить сохраняющуюся связь между диаметром синусоидных капилляров и люминесцирующими гистаминсодержащими структурами (оболочками центральных вен и люминесцирующими гранулярными клетками), что подтверждает участие гистамина в регуляции тонуса сосудов.

Факторный анализ с применением вращения факторов «Варимакс исходных» позволил выявить второй фактор в печени крыс опытных групп, получавших кремний с питьевой водой в течение двух и девяти месяцев, который отсутствовал у крыс соответствующих контрольных групп. Так, через два месяца эксперимента второй фактор объединил восемь параметров: площадь центральных вен, площадь междольковых сосудов и желчного протока, площадь тучных клеток, интенсивность люминесценции серотонина и гистамина в ЛГК, а также диаметр синусоидных капилляров ( $r < 0,05$ ). Через девять месяцев второй фактор включил площади всех замеренных сосудов (центральной вены, междольковых артерии, вены и желчного протока) ( $r < 0,05$ ).

**Четвертая глава** диссертации содержит сопоставление полученных результатов исследования с данными литературы.

### **III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

**Заключение** диссертационного исследования подчеркивает значимость работы и резюмирует все основные выводы.

Исследование микроскопического строения печени через два месяца от начала эксперимента выявило изменения, характерные для воспалительного процесса: увеличение количества Iba-1- и CD68-позитивных клеток, ТК печени на случайных полях зрения, эозинофилов в области портальных зон; уменьшение площади Iba-1-позитивных клеток за счет рекрутизации моноцитов, циркулирующих в крови; увеличение площади ТК, а также изменение их тинкториальных свойств с преобладанием среди них метакроматичных дегранулирующих клеток. Обнаруженные изменения были сопряжены с увеличением интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах, ЛГК и их микроокружении, интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в гепатоцитах, оболочках центральных вен, ЛГК и их микроокружении, а также увеличением диаметра синусоидных капилляров и ППС одноядерных гепатоцитов печени, уменьшением ЯЦО и ППС ядра в одно- и двуядерных гепатоцитах. Изменения в гепатоцитах печени, наряду с установленным повышением медианы оптической плотности ДНК в ядрах гепатоцитов и РНК в цитоплазме гепатоцитов, свидетельствуют об активации процессов регенерационной гипертрофии печени, которая носит компенсаторный характер.

В условиях продления эксперимента до девяти месяцев количество эозинофилов в области портальных зон возрастает, число CD68-позитивных макрофагов становится сопоставимым, а число ТК уменьшается. При этом отмечается уменьшение средней площади макрофагов и увеличение площади ТК, однако среди последних преобладают клетки, содержащие несulfатированный гепарин, имеющие голубую ортохромную окраску, а также плотно расположенные гранулы в цитоплазме. Поступление водорастворимого кремния приводит к увеличению ППС сосудов, диаметра синусоидных капилляров, а также к повышению интенсивности люминесценции гистамина в гепатоцитах печени на фоне статистически значимого снижения его люминесценции в ЛГК. Кроме того, выявлено увеличение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов в структурах печени (гепатоцитах, оболочках центральных вен, ЛГК и их микроокружении). Наряду со снижением люминесценции гистамина в ЛГК, увеличением количества эозинофилов в области портальных зон и увеличением доли ортохромных недегранулирующих ТК в печени крыс опытной группы отмечается переход острой фазы воспалительного процесса в хроническую, о чем также свидетельствует снижение средней массы тела крыс.

Установленное повышение интенсивности люминесценции серотонина и катехоловых аминов, которые, по данным литературы, являются митогенами, а также выявленное повышение оптической плотности РНК в ядрах гепатоцитов и их цитоплазме через девять месяцев эксперимента свидетельствуют об активации процессов репаративной регенерации в печени крыс в условиях сохраняющегося воспаления, индуцированного поступлением с питьевой водой кремния в концентрации 20 мг/л.

Настоящее исследование показало, что водорастворимый кремний, поступающий с питьевой водой в предельно допустимой концентрации

(20 мг/л), способен оказывать как прямое повреждающее воздействие на печень, так и опосредованное – через клетки иммунной системы с развитием асептического воспалительного процесса.

### **Выводы:**

1. В печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в концентрации 20 мг/л, через два месяца эксперимента наблюдается увеличение средней площади поперченного сечения одноядерных гепатоцитов на 16%, уменьшение средней площади поперченного сечения ядер двуядерных гепатоцитов на 29%, уменьшение ядерно-цитоплазматического отношения в одно- и двуядерных гепатоцитах на 20 и 21% соответственно; через девять месяцев – возрастают площади поперченного сечения центральных вен на 88%, междольковых сосудов (вен – на 70%, артерий – на 147%) и желчного протока – на 106%. На обоих сроках эксперимента отмечается увеличение диаметра синусоидных капилляров (через два месяца – на 34%, через девять месяцев – на 39%).

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

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

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

5. В печени крыс, получавших водорастворимый кремний, кластерный анализ установил связи между макрофагами и люминесцирующими гистаминсодержащими структурами печени через два месяца и с люминесцирующими структурами, содержащими катехоловые амины и серотонин, через девять месяцев (Евклидово расстояние  $< 0,05$ ); факторный анализ обнаружил второй фактор, отсутствующий в контрольных группах и объединяющий морфометрические параметры сосудов печени, тучных клеток и содержащие гистамин клетки через два месяца, а также площадь центральной вены, междольковых сосудов и желчного протока – через девять месяцев ( $r > 0,7$ ).

### **Практические рекомендации**

1. Диссертационная работа проведена на лабораторных крысах и относится к доклиническим исследованиям. Полученные в ходе исследования изменения в микроморфологии, количественной характеристике клеток иммунной системы

(эозинофилов, тучных клеток, CD68-позитивных клеток), биоаминном статусе печени крыс, получавших кремний с питьевой водой в предельно допустимой концентрации (20 мг/л) в течение двух и девяти месяцев, могут быть приняты во внимание при определении безопасности лекарственных препаратов, биологически активных добавок, содержащих соединения кремния.

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

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

### **Основные положения диссертационного исследования отражены в следующих публикациях автора:**

*Статьи, опубликованные в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации*

1. **Григорьева, Е. А.** Влияние наночастиц кремния и водорастворимых силикатов на печень (сравнение результатов собственных исследований с литературными данными) / **Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева** // Acta Medica Eurasica. – 2022. – № 4. – С. 108–120 (0,81 / 0,48 п. л.).

2. Изменение гистаминового статуса внутренних органов лабораторных животных в зависимости от концентрации кремния в питьевой воде / **В. С. Гордова, Е. А. Григорьева, В. Е. Сергеева** [и др.] // Acta Medica Eurasica. – 2023. – № 1. – С. 83–92 (0,62 / 0,18 п. л.).

3. Комплексная оценка морфологических изменений в печени кроликов при воздействии водорастворимого кремния в течение трех месяцев / **Е. А. Григорьева, В. С. Дедикина, Р. Д. Михайкин** [и др.] // Acta Medica Eurasica. – 2023. – № 3. – С. 84–93 (0,62 / 0,31 п. л.).

4. Возможные причины изменения содержания серотонина в печени крыс в условиях хронического поступления кремния с питьевой водой / **Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, А. Т. Смородченко** // Acta Medica Eurasica. – 2023. – № 4. – С. 69–80 (0,75 / 0,37 п. л.).

5. Изменения в печени джунгарских хомяков в условиях трехмесячного поступления водорастворимого кремния в различной концентрации / **Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева** [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2024. – № 1. – С. 97–106. (0,62 / 0,31 п. л.).

*Статьи, опубликованные в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования*

6. Реакция Iba-1<sup>+</sup> и CD68<sup>+</sup> макрофагов печени лабораторных крыс на двухмесячное поступление водорастворимого кремния / **Е. А. Григорьева, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева,**

А. Т. Смородченко // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2024. – № 1. – С. 40–48 (0,56 / 0,33 п. л).

7. Авидин-позитивные тучные клетки печени при воздействии водорастворимого кремния в течение девяти месяцев / **Е. А. Григорьева**, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2024. – Т. 27, № 2. – С. 157–160 (0,25 / 0,13 п. л.).

### *Публикации в других изданиях*

8. **Григорьева, Е. А.** Морфологические особенности печени при воздействии водорастворимого соединения кремния / **Е. А. Григорьева** // Медицинский академический журнал. – 2016. – № 4. – С. 71–72 (0,12 п. л.).

9. **Григорьева, Е. А.** Реакция тучных клеток печени крыс на длительное поступление водорастворимого соединения кремния / **Е. А. Григорьева** // Сборник тезисов XII Международной (XXI Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – М., 2017. – С. 147 (0,06 п. л.).

10. Особенности реакции макрофагов печени на действие водорастворимого соединения кремния в эксперименте / В. С. Гордова, **Е. А. Григорьева**, В. Е. Сергеева, А. Т. Смородченко // Медицинская иммунология. – 2017. – № 9. – С. 23–24 (0,12 / 0,04 п. л.).

11. Эозинофилы как возможные регуляторы уровня гистамина в печени крыс / С. С. Смирнова, **Е. А. Григорьева**, В. А. Голенкова [и др.] // Морфология в теории и практике: Материалы Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, посв. 95-летию со дня рождения доктора медицинских наук, профессора Дины Семёновны Гордон (Чебоксары, 22 ноября 2017 г.). – Вып. 3. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2017. – С. 221–223 (0,18 / 0,06 п. л.).

12. **Григорьева, Е. А.** Реакция иммунокомпетентных клеток печени на длительное воздействие соединений кремния / **Е. А. Григорьева** // Материалы IV Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Медико-биологические, клинические и социальные вопросы здоровья и патологии человека». – Иваново, 2018. – С. 6–7 (0,12 / 0,04 п. л.).

13. **Григорьева, Е. А.** Количественная оценка реакции иммунокомпетентных клеток печени на поступление кремния с питьевой водой в эксперименте / **Е. А. Григорьева**, В. Е. Сергеева // Морфология. – 2018. – Т. 153, № 3. – С. 83 (0,06 / 0,04 п. л.).

14. Макрофаги лимфоидных органов в экспериментах с длительным поступлением кремния с питьевой водой / В. С. Гордова, **Е. А. Григорьева**, А. И. Прохорова [и др.] // Морфология. – 2018. – Т. 153, № 3. – С. 79 (0,06 / 0,01 п. л.).

15. Гистаминсодержащие клетки лимфоидных органов лабораторных грызунов в эксперименте / В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, А. И. Коршунова [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – Т. 25, № 3. – С. 107–115 (0,56 / 0,06 п. л.).

16. Участие нейромедиаторных биогенных аминов в процессах, затрагивающих герминативные центры лимфоидных узелков тонкой кишки / В. Е. Сергеева, В. С. Гордова, А. И. Коршунова [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 255 (0,06 / 0,01 п. л.).

17. Effect of water-soluble silicon compound on properties of macrophages in red pulp of rat spleen / V. Gordova, V. Sergeeva, **E. Grigorijeva**, A. Smorodchenko // FASEB Journal. – 2019. – Vol. 33, № S1. – doi: 10.1096/fasebj.2019.33.1\_supplement.611.3 (0,06 / 0,01 п. л.).

18. Исследование морфологических изменений легких, печени и почек при длительном влиянии водорастворимого соединения кремния, поступающего с водой различной жесткости / В. С. Гордова, **Е. А. Григорьева**, А. И. Коршунова [и др.] // Аллергология и иммунология. – 2019. – Т. 20, № 1. – С. 38 (0,06 / 0,01 п. л.).

19. **Григорьева, Е. А.** Морфологическая характеристика структур печени при поступлении кремния с питьевой водой в различные сроки эксперимента / **Е. А. Григорьева**, А. И. Коршунова // Актуальные проблемы биомедицины – 2020: сб. тезисов XXVI Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием, Санкт-Петербург, 26–27 марта 2020 г. / отв. ред. Т. Д. Власов. – СПб.: РИЦ ПСПбГМУ, 2020. – С. 368–369 (0,12 / 0,06 п. л.).

20. Морфологическая адаптация селезенки на разных сроках поступления в организм водорастворимой соли кремния / В. С. Гордова, **Е. А. Григорьева**, А. А. Хлупина [и др.] // Морфология. – 2020. – Т. 157, № 2-3. – С. 60–61 (0,12 / 0,02 п. л.).
21. Серотониновый статус печени крыс при поступлении кремния с питьевой водой / **Е. А. Григорьева**, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, Д. О. Иванов // Вопросы морфологии XXI века. Выпуск 6: сб. науч. тр. Всерос. науч. конф. «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей» / под ред. И. А. Одинцовой, С. В. Костюкевича. – СПб.: ДЕАН, 2021. – С. 88–90 (0,18 / 0,06 п. л.).
22. The influence of silicon consumption with drinking water on morphological changes in the lungs of rodents / V. Gordova, **E. Grigoreva**, V. Sergeeva, A. Smorodchenko // FASEB Journal. – 2021. – Vol. 35, № S1. – doi: 10.1096/fasebj.2021.35.S1.01634 (0,06 / 0,01 п. л.).
23. Реакция CD68-позитивных клеток печени и селезенки крыс на поступление кремния с питьевой водой / **Е. А. Григорьева**, В. С. Гордова, В. Е. Сергеева, А. Т. Смородченко // Acta Medica Eurasica. – 2021. – № 2. – С. 34–43. – doi: 10.47026/2413-4864-2021-2-34-43 (0,62 / 0,31 п. л.).
24. Inflammaging: the silicates definitely accelerate involution of thymus / **E. Grigoreva**, V. Gordova, V. Efimova, V. Sergeeva // Virchows Archiv. The European Journal of Pathology. – 2021. – Vol. 479, Sup. 1. – P. 320 (0,06 / 0,02 п. л.).
25. Inflammaging: the silicates seem to be the reason of this process in spleen / **E. Grigoreva**, V. Gordova, A. Khlupina, E. Reznik // Virchows Archiv. The European Journal of Pathology. – 2021. – Vol. 479, Sup. 1. – P. 163 (0,06 / 0,01 п. л.).
26. The rat lungs reaction to the silicon compound solved in water of different hardness / **E. Grigoreva**, V. Gordova, V. Sergeeva, A. Smorodchenko // Virchows Archiv. The European Journal of Pathology. – 2021. – Vol. 479, Sup. 1. – P. 173 (0,06 / 0,02 п. л.).
27. **Григорьева, Е. А.** Влияние водорастворимого кремния на биоаминный статус печени лабораторных крыс // **Е. А. Григорьева**, Д. О. Иванов, В. Е. Сергеева / Медицинская наука и практика: Междисциплинарный диалог: сб. ст. Междунар. науч.-практ. конф., посв. 55-летию Чуваш. гос. ун-та им. И.Н. Ульянова (Чебоксары, 8–9 апреля 2022 г.) / под ред. В. Н. Диомидовой, С. И. Павловой. – Чебоксары: Изд-во Чуваш. ун-та, 2022. – С. 229–232 (0,25 / 0,12 п. л.).
28. Experimental silicon intake with drinking water affects the serotonin supply in the digestive tract of laboratory rats / V. Gordova, **E. Grigoreva**, A. Smorodchenko, V. Sergeeva // FASEB Journal. – 2022. – Vol. 35, № S1. – doi: 10.1096/fasebj.2022.36.S1.0R773 (0,06 / 0,01 п. л.).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТ	– антитела
КА	– катехоловые амины
ЛГК	– люминесцирующие гранулярные клетки
ППС	– площадь поперечного сечения
СТ	– серотонин
ТК	– тучные клетки
ЯЦО	– ядерно-цитоплазматическое отношение
CD	– кластер дифференцировки
Ipa-1	– кальций-связывающий пептид
NOAEL	– максимальная доза, не вызывающая обнаруживаемого вредного воздействия
S	– площадь

**ГРИГОРЬЕВА Евгения Александровна**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

Подписано в печать 18.10.2024. Формат 60×84 1/16. Печ. л. 1,25.  
Бумага офсетная. Печать офсетная. Тираж 100 экз. Заказ № 1205.

Отпечатано в типографии ФГБОУ ВО «ЧГУ им. И.Н. Ульянова»  
428015 Чебоксары, Московский просп., 15