

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТИОАЦЕТАМИДА

Е. И. Лебедева



Витебский государственный медицинский университет, Витебск, Беларусь

Введение. Анализ литературы показал, что ангиогенез играет ключевую роль в прогрессировании фиброза печени. Однако имеющиеся научные сообщения о морфологических изменениях сосудистой системы печени недостаточны и противоречивы.

Цель работы – исследование морфологических изменений сосудистой системы печени крыс под воздействием тиацетамида.

Материал и методы. Фиброз и цирроз печени у крыс Wistar индуцировали тиацетамидом в дозе 200 мг/кг веса животного в течение 17 недель. Для исследования морфологических изменений использовали классический и иммуногистохимический методы окраски гистологических препаратов. Микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа OLYMPUS BX51 и программ анализа изображений ImageScope Color и cellSens Standard.

Результаты. Внутривенное введение животным раствора тиацетамида приводит к плавному нарастанию прогрессии патологических изменений и позволяет отследить все стадии развития цирроза и морфологическую перестройку сосудистой системы печени. На протяжении всего эксперимента происходили интенсивная капилляризация синусоидов паренхимы, неоангиогенез в портальных трактах и соединительнотканых септах, который проявлялся формированием множества венул и мелких вен; увеличение площади междольковых вен, местами достигших гигантских размеров.

Выявлены три морфологических фенотипа CD34-позитивных клеток: в междольковых артериях, междольковых, центральных и поддольковых венах данные клетки имели вытянутую форму и палочковидное темноокрашенное ядро; при трансформации фиброза печени в цирроз в синусоидах (ближе к периферии отдельных ложных узелков) отмечались CD34-позитивные клетки вытянутой формы со светлыми округло-вытянутыми ядрами; в соединительной ткани около печеночных триад, в соединительнотканых септах среди клеток инфильтрата и между резко увеличенным количеством желчных протоков наблюдались клетки округлой формы с темноокрашенными ядрами.

Выводы. Установленные сложные фенотипические изменения синусоидальных эндотелиальных клеток доказывают тесную связь фиброгенеза с неоангиогенезом и, вероятно, они играют ведущую роль в развитии фиброза и перестройке венозной системы портальной вены.

Ключевые слова: крысы Wistar, сосудистая система печени, тиацетамид, фиброгенез, антитела к CD31, антитела к CD34.

Для цитирования: Лебедева, Е. И. Морфологические изменения сосудистой системы печени крыс под воздействием тиацетамида / Е. И. Лебедева // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2021. Т. 19, № 3. С. 285-293. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-3-285-293>.

Введение

Фиброз является наиболее частым осложнением хронических заболеваний печени и представляет собой серьезную проблему для здравоохранения во всем мире. Клинические наблюдения и данные, полученные экспериментально, свидетельствуют о том, что ангиогенез играет ведущую роль в прогрессировании фиброза печени [1, 2, 3].

При развитии фиброза происходит капилляризация синусоидов печени, которая сопровождается потерей фенестр высокоспециализированными синусоидальными эндотелиальными клетками (LSEC). Это ведет к образованию новой капиллярной сети и к изменениям функции микроциркуляции печени [4, 5, 6, 7]. Одна из функций LSEC – поддержание звездчатых клеток/клеток Ито в состоянии покоя, которая теряется при капилляризации. В настоящее время звездчатые клетки печени принято считать основным источником внеклеточного матрикса во время фиброза [3, 7, 8]. По мнению ряда исследователей, ключевыми регуляторами фенотипа LSEC при развитии и прогрессировании

фиброза печени являются vegf (сосудистый эндотелиальный фактор роста) и ang (ангиогенин). Предпочтительным подходом в остановке патологического ангиогенеза признана блокада пути VEGF. Однако клиническое использование этого метода все еще ограничено из-за отсутствия надежных биомаркеров, побочных эффектов и приобретенной лекарственной устойчивости [9, 10, 11, 12].

Анализ литературы показал, что имеющиеся научные сообщения о морфологических изменениях сосудистой системы печени недостаточны и противоречивы. По-видимому, это связано с органоспецифическими особенностями кровеносных сосудов печени и методологическими подходами [13, 14, 15].

Таким образом, проведение фундаментальных исследований в данном направлении представляет интерес для понимания молекулярных механизмов ангиогенеза при фиброгенезе печени, поиска биомаркеров, а также для разработки новых, патогенетически обоснованных методов лечения.

Цель работы – исследование морфологических изменений сосудистой системы печени крыс под воздействием тиацетамида.

Материал и методы

В эксперименте использовали 117 половозрелых крыс-самцов Wistar весом от 190-210 г, прошедших карантинный режим вивария и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Фиброз и цирроз печени у животных индуцировали свежеприготовленным раствором тиацетамида (ТАА), который вводили в желудок с помощью зонда в дозе 200 мг/кг массы тела животного 2 раза в неделю за 3 часа до кормления в течение 17 недель. Согласно литературным данным, ТАА вызывает поражение печени у крыс с гистологическими характеристиками, аналогичными таковым у людей с фиброзом и циррозом печени. Несмотря на то, что ТАА используют как гепатотоксин, молекулярный механизм ТАА-индуцированного фиброза и цирроза печени изучен не до конца [16, 17]. Исследуемых крыс рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой (m0 – контрольная; m1 – длительность воздействия тиацетамидом 3 недели; m2 – длительность воздействия тиацетамидом 5 недель; m3 – длительность воздействия тиацетамидом 7 недель; m4 – длительность воздействия тиацетамидом 9 недель; m5 – длительность воздействия тиацетамидом 11 недель; m6 – длительность воздействия тиацетамидом 13 недель; m7 – длительность воздействия тиацетамидом 15 недель; m8 – длительность воздействия тиацетамидом 17 недель). Опытных крыс выводили из эксперимента через 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 и 17 недель, интактных – по окончании эксперимента. В ходе эксперимента погибли 9 животных. Эксперимент проводился в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директивой Совета ЕЭС от 24.11.1986 и рекомендациями FELASA Working Group Report (1994-1996).

Морфологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследования

Для проведения морфологического исследования образцы печени помещали в 10% раствор нейтрального формалина на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 часов. После чего проводили гистологическую обработку фиксированного материала по стандартной методике с последующей заливкой в парафин, изготовлением гистологических срезов и их окраской гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – методом Маллори. Степень фиброза оценивали с использованием полуколичественной шкалы K. G. Ishak [18].

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах непрямым иммунопероксидазным методом с использованием моноклонального мышинового антитела к CD31 (номер в каталоге E-AB-70173, разведение 1:500, Elabscience) и поликлонального мышинового антитела к CD34 (номер в каталоге E-AB-60105,

разведение 1:100, Elabscience) в соответствии с инструкцией производителя. Срезы докрашивали гематоксилином. Для объективной интерпретации результатов с каждой исследуемой серии (группы животных) получали положительный и отрицательный контроль.

Морфометрический анализ данных проводили с использованием компьютерных программ анализа изображений ImageScope Color и cellSens Standard. Определяли площадь экспрессии маркеров CD31 и CD34 в процентах к площади изображения без учета степени экспрессии маркеров. Измерения осуществлялись с помощью микрофотосъемки случайных полей зрения на гистологических препаратах цифровой камерой OLYMPUS XC30 на базе микроскопа OLYMPUS BX51.

Статистические методы исследований

Результаты исследования обрабатывали с помощью программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft, IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel. В выборках по каждой неделе эксперимента определяли нормальность частотного распределения каждого признака по критерию Шапиро-Уилка. В соответствии с результатами этого анализа в дальнейшем применяли параметрические или непараметрические методы статистической обработки данных. О достоверности различий изучаемых в группах признаков с нормальным частотным распределением судили по t-критерию Стьюдента, выполняя дисперсионный анализ – по критерию Шеффе. В выборке при отличии частотного распределения признака от нормального использовали U-критерий Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Изучение значимости влияния недели эксперимента (стадии фиброза) на исследуемые признаки проводили с помощью параметрического двухфакторного дисперсионного анализа.

Результаты и обсуждение

Морфологические изменения печени и сосудистого русла

В настоящее время объем знаний о патологических изменениях сосудистой сети печени при фиброгенезе остается недостаточным [19]. В данном исследовании оценивались морфологические изменения сосудов при ТАА-индуцированном фиброгенезе печени крыс в восьми временных точках.

При микроскопическом изучении печени у интактных крыс в центре классической дольки четко визуализировались центральная вена, а по периферии – печёночные триады с междольковой артерией, междольковой веной и одним-двумя междольковыми желчными протоками. Лимфатические сосуды на срезах печени практически не визуализировались.

На начальном этапе эксперимента (три недели) определялись очаговые поражения гепатоцитов в виде вакуольной дистрофии с плазмоллизом и кариолизом, развитием перинуклеарного отека и очагового некробиоза (рис. 1). В сосудах выявлялись агрегация тромбоцитов и

сладж-феномен эритроцитов. Синусоидные капилляры были расширены, визуализировались пространства Диссе. Степень фиброза по шкале K. G. Ishak соответствовала F1.

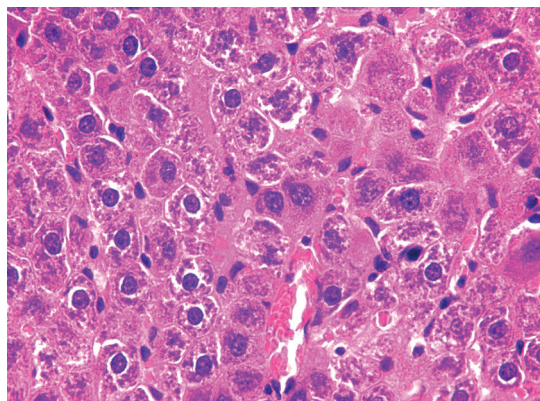


Рисунок 1. – Печень опытной крысы через 3 недели эксперимента. На микрофотографии вокруг ядер гепатоцитов четко визуализируется светлый ободок (перинуклеарный отек). Окраска гематоксилином и эозином. $\times 600$

Figure 1. – Liver of an experimental rat after 3 weeks of the experiment. On the micrograph, a light rim (perinuclear edema) is clearly visualized around the nuclei of hepatocytes. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 600$

На пятой-седьмой неделях эксперимента на гистологических препаратах печени опытных крыс отмечали прогрессирование токсического поражения печени в виде обширных полей вакуольной дистрофии с ярко выраженными процессами плазмолизиса и кариолизиса, нарастание отека паренхимы. В большинстве полей зрения наблюдалось расширение междольковых вен (рис. 2). Сосуды были заполнены эритроцитарными массами и аморфным содержимым. Степень фиброза по шкале K. G. Ishak соответствовала F3/F4.

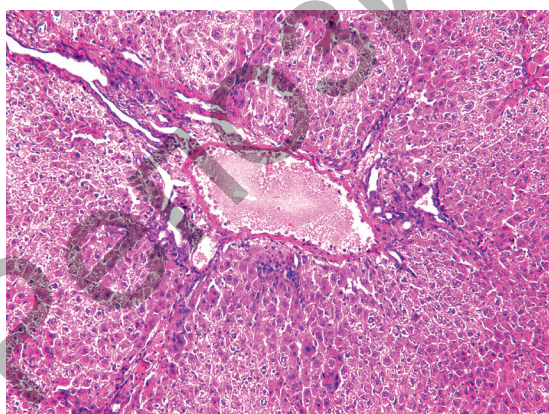


Рисунок 2. – Печень опытной крысы через 5 недель эксперимента. В центре микрофотографии расположена огромная междольковая вена.

Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Figure 2. – Liver of an experimental rat after 5 weeks of the experiment. In the center of the micrograph is a huge interlobular vein. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 200$

На фоне дальнейшей интоксикации животных (9-11 недель эксперимента) была отмечена стабилизация прогрессирования дистрофических процессов без развития выраженных зон некроза на месте полей с выраженной вакуольной дистрофией и некробиозом гепатоцитов. При этом отмечено значительное прогрессирование процессов организации, которые проявлялись в обширном разрастании соединительной ткани вокруг портальных трактов, местами формированием толстых септ по периферии долек с уменьшением их площади. Важно отметить формирование единичных ложных печёночных долек вблизи портальных трактов к девятой неделе, и выявление их в других местах гистологических препаратов к 11-й неделе. Таким образом, к данному сроку наблюдалась трансформация фиброза печени в цирроз, а степень фиброза по шкале K. G. Ishak соответствовала F4/F5.

Значительные изменения выявлены в сосудистом русле печени. Отмечали выраженный неоангиогенез в портальных трактах и соединительнотканых септах, что проявлялось в виде формирования множества мелких кровеносных сосудов венозного типа: венул и мелких вен (рис. 3). Схожие результаты получены и другими исследователями при моделировании фиброза печени у лабораторных животных [19, 20]. Наряду с формированием новых сосудов отмечено увеличение площади имеющихся междольковых вен. Эндотелиальный слой в венозных сосудах зачастую имел вид вертикальных клеток с неровной апикальной поверхностью. Данный процесс можно характеризовать как компенсацию затруднения кровотока в системе воротной вены ввиду прогрессирования отека и механической компрессии вен за счет цирроза. В изучаемых гистологических срезах отчетливо визуализировались лимфатические сосуды крупного диаметра, что явно указывает на развитие лимфостаза на фоне прогрессирующих застойных процессов.

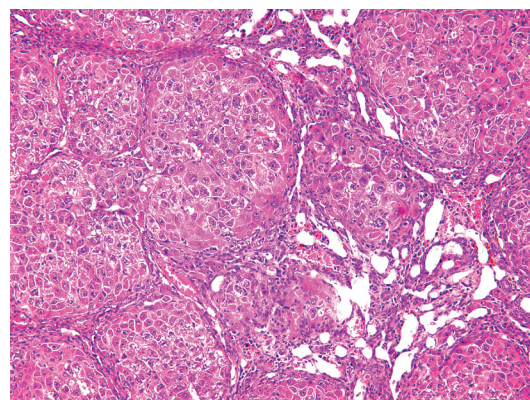


Рисунок 3. – Печень опытной крысы через 11 недель эксперимента. Выраженный неоангиогенез в соединительнотканых септах. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 200$

Figure 3. – Liver of an experimental rat after 11 weeks of the experiment. Expressed neoangiogenesis in connective tissue septa. Staining with hematoxylin and eosin. $\times 200$

На следующем этапе эксперимента (13-15 недель) гистологическое исследование печени крыс позволило установить тотальное поражение паренхимы в виде замещения соединительной тканью участков вакуольной дистрофии. На данном этапе отмечали выраженный цирроз с формированием многочисленных ложных долек. В дольках зачастую не выявлялись центральные вены. Междольковые вены в большинстве случаев приобретали гигантский размер и неправильную форму с формированием множества лакун (рис. 4).

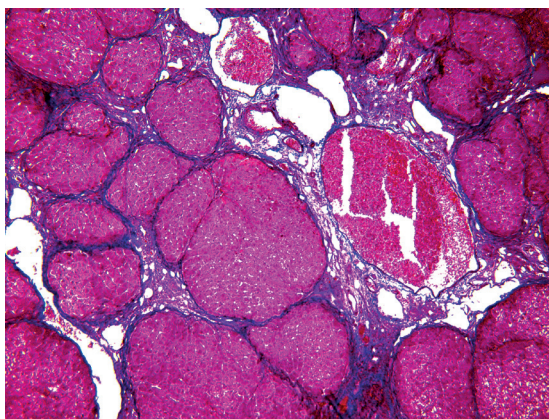


Рисунок 4. – Печень опытной крысы через 15 недель эксперимента. Гигантские вены в портальном тракте и соединительнотканых септах.

Окраска по методу Маллори. ×100

Figure 4. – Liver of an experimental rat after 15 weeks of the experiment. Giant veins in the portal tract and connective tissue septa. Mallory staining. ×100

К концу эксперимента (17 недель) в печени животных наблюдался тотальный цирроз с обширными полями соединительной ткани, ограничивающей дольки широкими поясами, содержащими внутри себя вновь образованные вены (рис. 5).

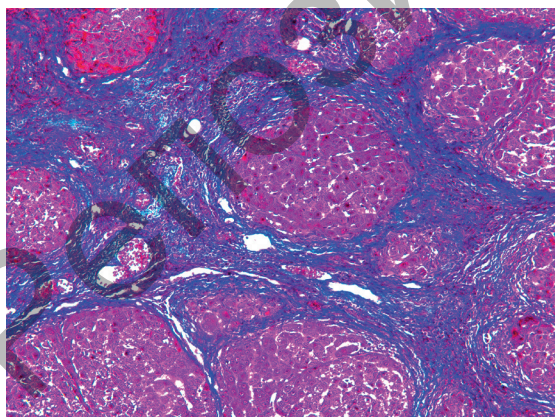


Рисунок 5. – Печень опытной крысы через 17 недель эксперимента. Широкие поля соединительной ткани, окружающие полностью сформированные ложные узелки. Окраска по методу Маллори. ×200

Figure 5. – Liver of an experimental rat after 17 weeks of the experiment. Wide fields of connective tissue surrounding fully formed false nodules. Mallory staining. ×200

Следует отметить, что центральные вены обнаруживались крайне редко. Наряду с вновь образованными сосудами в соединительнотканых септах имелись гигантские междольковые вены, что, очевидно, указывает на перестройку венозной системы портальной вены и, вероятно, на формирование коллатералей и шунтов, перенаправляющих венозную кровь в обход печёночных долек. На гистологических препаратах увеличилась как количество выявляемых лимфатических сосудов, так и их диаметр, что указывает на участие лимфатической системы в общей компенсации цирротической патологии.

Особенности экспрессии эндотелиальных маркеров CD34 и CD31 в сосудистом русле печени

В печени intactных и всех опытных крыс эндотелиальные клетки междольковых артерий, междольковых, центральных и поддольковых вен экспрессировали маркеры CD34 и CD31.

В синусоидных капиллярах печени intactных животных CD34-позитивные клетки не отмечались, а маркер CD31 проявлял зональность (рис. 6). В центральной и перипортальной зонах визуализировались CD31-позитивные клетки с более интенсивной окраской, а в промежуточной зоне имелось снижение экспрессии местами с полным отсутствием иммуногистохимической реакции.

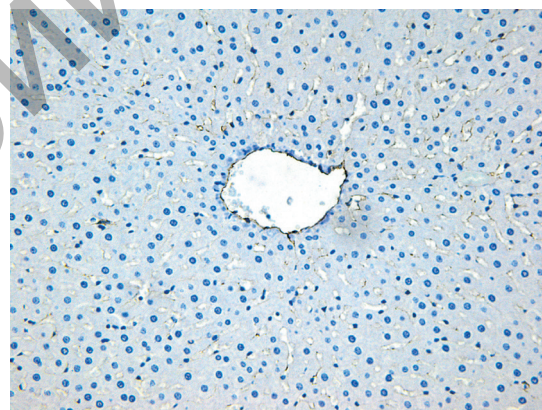


Рисунок 6. – Печень крысы контрольной группы. CD31-позитивные эндотелиоциты окрашены в коричневый цвет. Иммуногистохимическое окрашивание на CD31. ×400

Figure 6. – Liver of the rat of the control group. CD31-positive endothelial cells are brown. Immunohistochemical staining for CD31. ×400

Прогрессирование фиброгенеза с трансформацией в цирроз выявило достоверное увеличение площади CD31-позитивных клеток в синусоидных капиллярах печени крыс (рис. 7). Эндотелиальные синусоидальные клетки претерпевают морфологические и функциональные изменения [21]. К концу эксперимента в большинстве ложных узелков синусоиды имели вид выраженной густой сети (рис. 8). При этом отмечались узелки, в отдельных зонах которых CD31-позитивные клетки не выявлялись. Важно отметить, что на всех изученных гистологических препаратах CD31-позитивные клетки имелись только в стенке кровеносных сосудов.

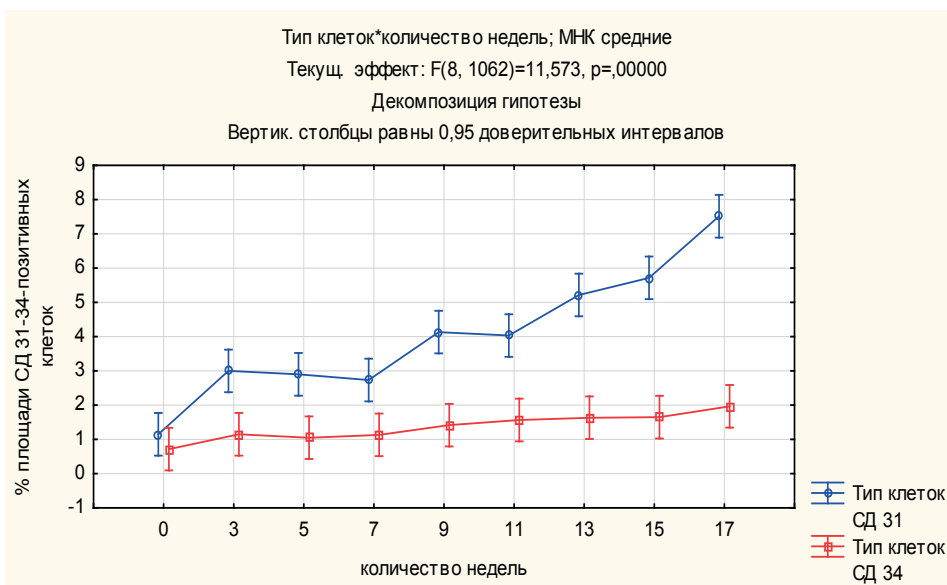


Рисунок 7. – Динамика изменений площади CD31- и CD34-позитивных клеток

Figure 7. – Dynamics of changes in the area of CD31- and CD34-positive cells

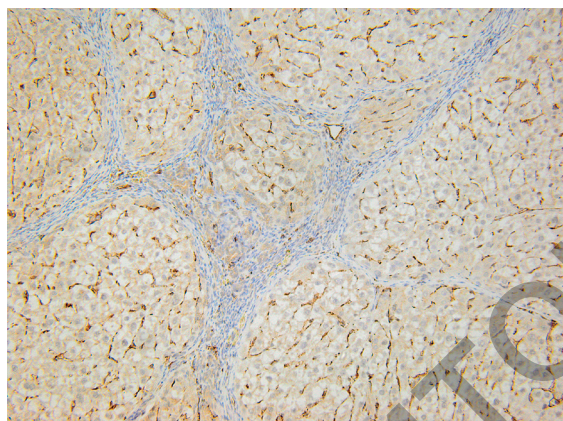


Рисунок 8. – Печень опытной крысы через 15 недель эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание на CD31. ×200

Figure 8. – Liver of an experimental rat after 15 weeks of the experiment. Immunohistochemical staining for CD31. ×200

Выявленные сложные фенотипические изменения синусоидальных эндотелиальных клеток доказывают тесную связь фиброгенеза с неогенезом, и вероятно, они играют ведущую роль в развитии фиброза и перестройке венозной системы портальной вены.

К концу эксперимента увеличилось и количество площади CD34-позитивных клеток в печени крыс (рис. 7). В междольковых артериях, междольковых, центральных и поддольковых венах данные клетки имели вытянутую форму и палочковидное темноокрашенное ядро. На начальных сроках эксперимента маркер CD34 в синусоидных капиллярах не выявлялся (рис. 9). Через одиннадцать недель эксперимента в синусоидах, ближе к периферии отдельных ложных узелков, отмечались CD34-позитивные клетки вытянутой формы. Следует отметить, что эти

клетки имели округло-вытянутые ядра и более светлую окраску по сравнению с CD34-позитивными клетками вен и артерий. Они контактировали друг с другом с образованием цепочек. При этом центра ложного узелка цепочки из клеток не достигали (рис. 10). Возможно, это клетки, дифференцирующиеся в синусоидальные эндотелиоциты и/или гепатоциты и/или другие клетки печени. В настоящем исследовании не использовалось двойное иммуногистохимическое окрашивание и констатировать факт

того, что выявленные клетки одновременно экспрессируют CD31 и CD34, не представляется возможным.

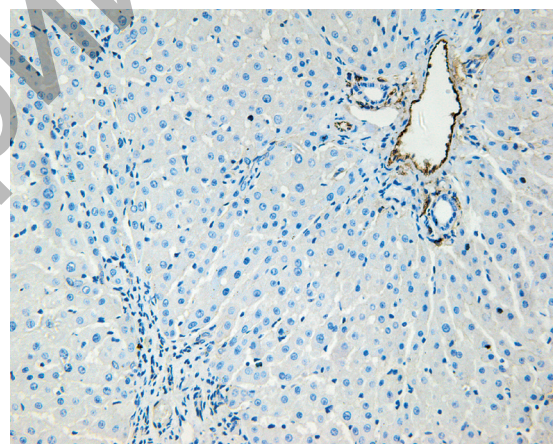


Рисунок 9. – Печень крысы через 5 недель эксперимента. Отсутствие CD34-позитивных клеток в синусоидных капиллярах. Иммуногистохимическое окрашивание на CD34. ×400

Figure 9. – Rat liver after 5 weeks of the experiment. Absence of CD34-positive cells in sinusoidal capillaries. Immunohistochemical staining for CD34. ×400

К середине эксперимента в соединительной ткани около печёночных триад, в соединительнотканых септах среди клеток инфильтрата и между резко увеличенным количеством желчных протоков (дуктулярная или протоковая реакция) выявлялись островки CD34-позитивных клеток округлой формы с темноокрашенными ядрами (рис. 11). На отдельных препаратах эти клетки формировали тяжи, локализовались изолированно друг от друга, а местами формировали розетки с просветом внутри. Визуально

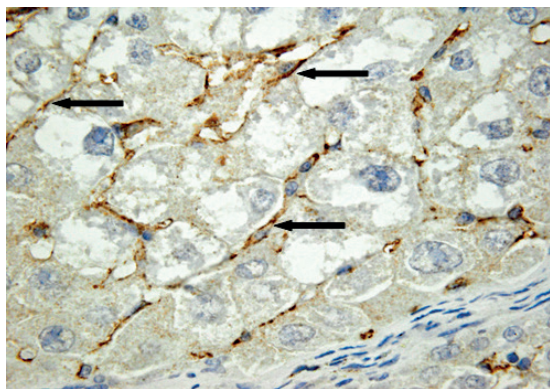


Рисунок 10. – Печень крысы через 17 недель эксперимента. Стрелкой показаны CD34-позитивные клетки в синусоидах печени. Иммуногистохимическое окрашивание на CD34. $\times 1000$

Figure 10. – Rat liver after 17 weeks of the experiment. Arrow shows CD34-positive cells in liver sinusoids. Immunohistochemical staining for CD34. $\times 1000$

число CD34-позитивных клеток увеличивалось пропорционально выраженности инфильтрации.

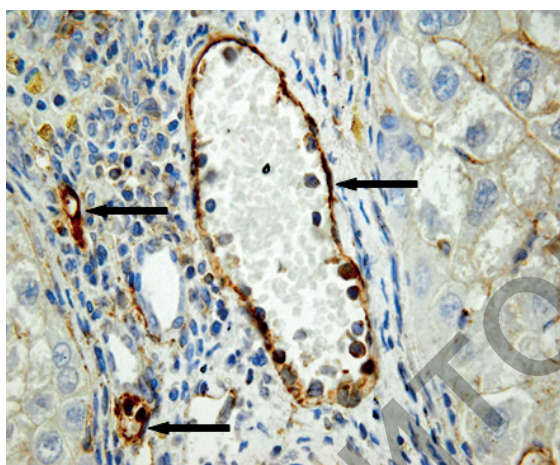


Рисунок 11. – Печень крысы через 17 недель эксперимента. Стрелкой показаны CD34-позитивные клетки.

Иммуногистохимическое окрашивание на CD34. $\times 1000$
Figure 11. – Rat liver after 17 weeks of the experiment. Arrow shows CD34-positive cells. Immunohistochemical staining for CD34. $\times 1000$

Так как CD34 – это маркер эндотелиальных и кроветворных стволовых клеток, можно предположить, что клетки в соединительнотканых септах и около печёночных триад, экспрессирующие на своей поверхности маркер CD34, могут быть мигрирующими клетками из костного мозга, принимающими участие в неоангиогенезе и/или других процессах.

Часто в широких септах соединительной ткани отмечались регенеративные узелки из гепа-

тоцитов. Возможно, островки из CD34-позитивных клеток представляют собой клетки, дифференцирующиеся в гепатоциты, мобилизованные в печень из циркулирующей крови.

Нельзя исключать факт того, что CD34-позитивные клетки, выявляемые между желчными протоками, могут представлять популяцию дифференцирующихся клеток в овальные клетки печени. Согласно литературным данным, источник происхождения клеток пролиферирующих протоков до сих пор не установлен [22].

В соединительнотканых септах наряду с кровеносными сосудами, которые характеризуются четкой экспрессией эндотелиальных маркеров CD34 и CD31, часто отмечались сосуды с прерывистой экспрессией маркеров. Следует отметить, что расширенные и деформированные лимфатические сосуды не экспрессировали маркеры CD34 и CD31.

Для печени характерен уникальный фенотипический профиль клеток. Отсутствие специфических иммуногистохимических маркеров для клеток осложняет интерпретацию полученных результатов.

Выводы

1. Установлены выраженные изменения со стороны сосудистой системы: происходила интенсивная капилляризация синусоидов паренхимы, прогрессирующий неоангиогенез в портальных трактах и соединительнотканых септах, который проявлялся формированием множества венул и мелких вен; увеличение площади междольковых вен, местами достигших гигантских размеров.

2. В печени интактных и всех опытных крыс эндотелиальные клетки междольковых артерий, междольковых, центральных и поддольковых вен экспрессировали маркеры CD34 и CD31. В синусоидах капиллярах печени интактных животных CD34-позитивные клетки не отмечались, а маркер CD31 проявлял зональность.

3. Выявлены три морфологических фенотипа CD34-позитивных клеток: в междольковых артериях, междольковых, центральных и поддольковых венах данные клетки имели вытянутую форму и палочковидное темноокрашенное ядро; при трансформации фиброза печени в цирроз в синусоидах (ближе к периферии) отдельных ложных узелков отмечались CD34-позитивные клетки вытянутой формы со светлыми округло-вытянутыми ядрами; в соединительной ткани около печёночных триад, в соединительнотканых септах среди клеток инфильтрата и между резко увеличенным количеством желчных протоков (дуктулярная или протоковая реакция) выявлялись клетки округлой формы с темноокрашенными ядрами.

Литература

1. The roles and mechanisms of lncRNAs in liver fibrosis / Z. He [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, № 4. – P. 1482. – doi: 10.3390/ijms21041482.
2. Roehlen, N. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives / N. Roehlen, E. Crouch, T. F. Baumert // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 875. – doi: 10.3390/cells9040875.
3. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis / P. An [et al.] // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 2362. – doi: 10.1038/s41467-020-16092-0.
4. Ramirez-Pedraza, M. Interplay between macrophages and angiogenesis: A double-edged sword in liver disease / M. Ramirez-Pedraza, M. Fernandez // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 2882. – doi: 10.3389/fimmu.2019.02882.
5. The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration / E. Lafoz [et al.] // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, № 4. – P. 929. – doi: 10.3390/cells9040929.
6. Neuropilin-1 aggravates liver cirrhosis by promoting angiogenesis via VEGFR2-dependent PI3K/Akt pathway in hepatic sinusoidal endothelial cells / L. Wang [et al.] // *BioMedicine*. – 2019. – Vol. 43. – P. 525-536. – doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.050.
7. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice / J. L. Duan [et al.] // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 68, № 2. – P. 677-690. – doi: 10.1002/hep.29834.
8. Hou, W. Role of Metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis / W. Hou, W. K. Syn // *Front Cell Dev. Biol.* – 2018. – Vol. 6. – P. 150. – doi: 10.3389/fcell.2018.00150.
9. Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases / Y. Ni [et al.] // *World J. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 23, № 43. – P. 7666-7677. – doi: 10.3748/wjg.v23.i43.7666.
10. Curcumol attenuates liver sinusoidal endothelial cell angiogenesis via regulating Glis-PROX1-HIF-1 α in liver fibrosis / X. Yan [et al.] // *Cell Prolif.* – 2020. – Vol. 53, № 3. – P. e12762. – doi: 10.1111/cpr.12762.
11. Garbuzenko, D. V. Antiangiogenic therapy for portal hypertension in liver cirrhosis: Current progress and perspectives / D. V. Garbuzenko, N. O. Arefyev, E. L. Kazachkov // *World J. Gastroenterol.* – 2018. – Vol. 24, № 33. – P. 3738-3748. – doi: 10.3748/wjg.v24.i33.3738.
12. Carmeliet, P. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis / P. Carmeliet, R. K. Jain // *Nature*. – 2011. – Vol. 473, № 7347. – P. 298-307. – doi: 10.1038/nature10144.
13. Garbuzenko, D. V. Mechanisms of adaptation of the hepatic vasculature to the deteriorating conditions of blood circulation in liver cirrhosis / D. V. Garbuzenko, N. O. Arefyev, D. V. Belov // *World J. Hepatol.* – 2016. – Vol. 8, № 16. – P. 665-672. – doi: 10.4254/wjh.v8.i16.665.
14. Kasprzak, A. Role of endoglin (CD105) in the progression of hepatocellular carcinoma and anti-angiogenic therapy / A. Kasprzak, A. Adamek // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, № 12. – P. 3887. – doi: 10.3390/ijms19123887.
15. Lee, T. Y. Modulation of HIF-1 α and STAT3 signaling contributes to anti-angiogenic effect of YC-1 in mice with liver fibrosis / T. Y. Lee, Y. L. Leu, C. K. Wen // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, № 49. – P. 86206-86216. – doi: 10.18632/oncotarget.21039.
16. Mechanistic roles of microRNAs in hepatocarcinogenesis: A study of thioacetamide with multiple doses and time-points of rats / H. Dweep [et al.] // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7, № 1. – Art. 3054. – doi: 10.1038/s41598-017-02798-7.
17. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation / M. D. Muthiah [et al.] // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 15446. – doi: 10.1038/s41598-019-51189-7.
18. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial / J. E. Everhart [et al.] // *Hepatology*. – 2010. – Vol. 51, № 2. – P. 585-94. – doi: 10.1002/hep.23315.
19. Quantitative analysis of hepatic macro- and microvascular alterations during cirrhogenesis in the rat / G. Peeters [et al.] // *J. Anat.* – 2018. – Vol. 232, № 3. – P. 485-496. – doi: 10.1111/joa.12760.
20. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis / E. Vanheule [et al.] // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2008. – Vol. 89, № 6. – P. 419-432. – doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00608.x.
21. Hammoutene, A. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease / A. Hammoutene, P. E. Rautou // *J. Hepatol.* – 2019. – Vol. 70, № 6. – P. 1278-1291. – doi: 10.1016/j.jhep.2019.02.012.
22. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances / K. Sato [et al.] // *Hepatology*. – 2019. – Vol. 69, № 1. – P. 420-430. – doi: 10.1002/hep.30150.

References

1. He Z, Yang D, Fan X, Zhang M, Li Y, Gu X. The roles and mechanisms of lncRNAs in liver fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(4):1482. doi: 10.3390/ijms21041482.
2. Roehlen N, Crouch E, Baumert TF. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells*. 2020;9(4):875. doi: 10.3390/cells9040875.
3. An P, Wei LL, Zhao S, Sverdlov DY, Vaid KA, Miyamoto M, Kuramitsu K, Lai M, Popov YV. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2362. doi: 10.1038/s41467-020-16092-0.
4. Ramirez-Pedraza M, Fernandez M. Interplay between macrophages and angiogenesis: A double-edged sword in liver disease. *Front. Immunol.* 2019;10:2882. doi: 10.3389/fimmu.2019.02882.
5. Lafoz E, Ruat M, Anton A, Oncins A, Hernandez-Gea V. The endothelium as a driver of liver fibrosis and regeneration. *Cells*. 2020;9(4):929. doi: 10.3390/cells9040929.
6. Wang L, Feng Y, Xie X, Wu H, Nan Su X, Qi J, Xin W, Gao L, Zhang Y, Shah V H, Zhu Q. Neuropilin-1 aggravates liver cirrhosis by promoting angiogenesis via VEGFR2-dependent PI3K/Akt pathway in hepatic sinusoidal endothelial cells. *BioMedicine*. 2019;43:525-536. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.050.
7. Duan JL, Ruan B, Yan XC, Liang L, Song P, Yang ZY, Liu Y, Dou KF, Han H, Wang L. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice. *Hepatology*. 2018;68(2):677-690. doi: 10.1002/hep.29834.
8. Hou W, Syn WK. Role of Metabolism in hepatic stellate cell activation and fibrogenesis. *Front Cell Dev. Biol.* 2018;6:150. doi: 10.3389/fcell.2018.00150.
9. Ni Y, Li JM, Liu MK, Zhang TT, Wang DP, Zhou WH, Hu LZ, Lv WL. Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. *World J. Gastroenterol.* 2017;23(43):7666-7677. doi: 10.3748/wjg.v23.i43.7666.
10. Yan X, Wang Z, Kai J, Wang F, Jia Y, Wang S, Tan S, Shen X, Chen A, Shao J, Zhang F, Zhang Z, Zheng S. Curcumol

- attenuates liver sinusoidal endothelial cell angiogenesis via regulating Glis-PROX1-HIF-1 α in liver fibrosis. *Cell Prolif.* 2020;53(3):e12762. doi: 10.1111/cpr.12762.
11. Garbuzenko DV, Arefyev NO, Kazachkov EL. Antiangiogenic therapy for portal hypertension in liver cirrhosis: Current progress and perspectives. *World J. Gastroenterol.* 2018;24(33):3738-3748. doi: 10.3748/wjg.v24.i33.3738.
 12. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 2011;473(7347):298-307. doi: 10.1038/nature10144.
 13. Garbuzenko DV, Arefyev NO, Belov DV. Mechanisms of adaptation of the hepatic vasculature to the deteriorating conditions of blood circulation in liver cirrhosis. *World J. Hepatol.* 2016;8(16):665-72. doi: 10.4254/wjh.v8.i16.665.
 14. Kasprzak A, Adamek A. Role of endoglin (CD105) in the progression of hepatocellular carcinoma and anti-angiogenic therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(12):3887. doi: 10.3390/ijms19123887.
 15. Lee TY, Leu YL, Wen C-K. Modulation of HIF-1 α and STAT3 signaling contributes to anti-angiogenic effect of YC-1 in mice with liver fibrosis. *Oncotarget.* 2017;8(49):86206-86216. doi: 10.18632/oncotarget.21039.
 16. Dweep H, Morikawa Y, Gong B, Yan J, Liu Z, Chen T, Bisgin H, Zou W, Hong H, Shi T, Gong P, Castro C, Uehara T, Wang Y, Tong W. Mechanistic roles of microRNAs in hepatocarcinogenesis: A study of thioacetamide with multiple doses and time-points of rats. *Sci. Rep.* 2017;7(1):3054. doi: 10.1038/s41598-017-02798-7.
 17. Muthiah MD, Huang DQ, Zhou L, Jumat NH, Choolani M, Chan JKY, Wee A, Lim S Gee, Dan Y-Y. A murine model demonstrating reversal of structural and functional correlates of cirrhosis with progenitor cell transplantation. *Sci. Rep.* 2019;9(1):15446. doi: 10.1038/s41598-019-51189-7.
 18. Everhart JE, Wright EC, Goodman ZD, Dienstag JL, Hoefs JC, Kleiner DE, Ghany MG, Mills AS, Nash SR, Govindarajan S, Rogers TE, Greenson JK, Brunt EM, Bonkovsky HL, Morishima C, Litman H J, Trial Group HC. Prognostic value of Ishak fibrosis stage: findings from the hepatitis C antiviral long-term treatment against cirrhosis trial. *Hepatology.* 2010;51(2):585-594. doi: 10.1002/hep.23315.
 19. Peeters G, Debbaut C, Friebe A, Cornillie P, De Vos WH, Favere K, Elst IV, Vandecasteele T, Johann T, Hoorebeke LV, Monbaliu D, Drasdo D, Hoehme S, Laleman W, Segers P. Quantitative analysis of hepatic macro- and microvascular alterations during cirrhogenesis in the rat. *J. Anat.* 2018;232(3):485-496. doi: 10.1111/joa.12760.
 20. Vanheule E, Geerts AM, Van Huisse J, Schelfhout D, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int. J. Exp. Pathol.* 2008;89(6):419-432. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00608.x.
 21. Hammoutene A, Rautou PE. Role of liver sinusoidal endothelial cells in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* 2019;70(6):1278-1291. doi: 10.1016/j.jhep.2019.02.012.
 22. Sato K, Marziani M, Meng F, Francis H, Glaser S, Alpini G. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances. *Hepatology.* 2019;69(1):420-430. doi: 10.1002/hep.30150.

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER VASCULAR SYSTEM OF RATS UNDER THE INFLUENCE OF THIOACETAMIDE

E. I. Lebedeva

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Background. Angiogenesis plays a key role in the progression of liver fibrosis. However, the available data on morphological changes in the liver vascular system are insufficient and contradictory.

Objective. The aim of the work is to study the morphological changes in the liver vascular system of rats under the influence of thioacetamide.

Material and methods. Fibrosis and cirrhosis of the liver in Wistar rats were induced with thioacetamide given at a dose of 200 mg/kg of animal weight for 17 weeks. To study morphological changes, we used classical and immunohistochemical staining methods. Microscopic analysis was performed using OLYMPUS BX51 microscope and image analysis software ImageScope Color and cellSens Standard.

Results. The introduction of a solution of thioacetamide through the stomach leads to a gradual increase in the progression of pathological changes. In addition, it permits to track all stages of cirrhosis development and morphological restructuring of the liver vascular system. Throughout the experiment there was intensive capillarization of the parenchyma sinusoids and neoangiogenesis in the portal tracts and connective tissue septa manifested by the formation of many venules and small veins. We also observed an increase in the area of interlobular veins, which in some places had reached gigantic proportions.

Three morphological phenotypes of CD34-positive cells were revealed. In the interlobular arteries as well as interlobular, central and sublobular veins, these cells had an elongated shape and a rod-shaped dark-colored nucleus. During the transformation of liver fibrosis into cirrhosis CD34-positive cells of an elongated shape with light rounded-elongated nuclei were observed in the sinusoids closer to the periphery of individual false nodules. Rounded cells with dark-colored nuclei were present in the connective tissue near the hepatic triads, in the connective tissue septa among the cells of the infiltrate and between the sharply increased number of bile ducts.

Conclusions. The established complex phenotypic changes in sinusoidal endothelial cells prove a close connection between fibrogenesis and neoangiogenesis. They probably play a leading role in the development of fibrosis and restructuring of the venous system of the portal vein.

Keywords: Wistar rats, liver vascular system, thioacetamide, fibrogenesis, antibodies to CD31, antibodies to CD34.

For citation: Lebedeva EI. Morphological changes in the liver vascular system of rats under the influence of thioacetamide. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2021;19(3):285-293. <https://doi.org/10.25298/2221-8785-2021-19-3-285-293>.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The author declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» на 2016-2020 гг., задание 2.89.

Financing. The work was carried out within the framework of the State Program of Scientific Research "Fundamental and Applied Sciences-Medicine" for 2016-2020, task 2.89.

Соответствие принципам этики. Протокол эксперимента на крысах одобрен на заседании комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный имени Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019).

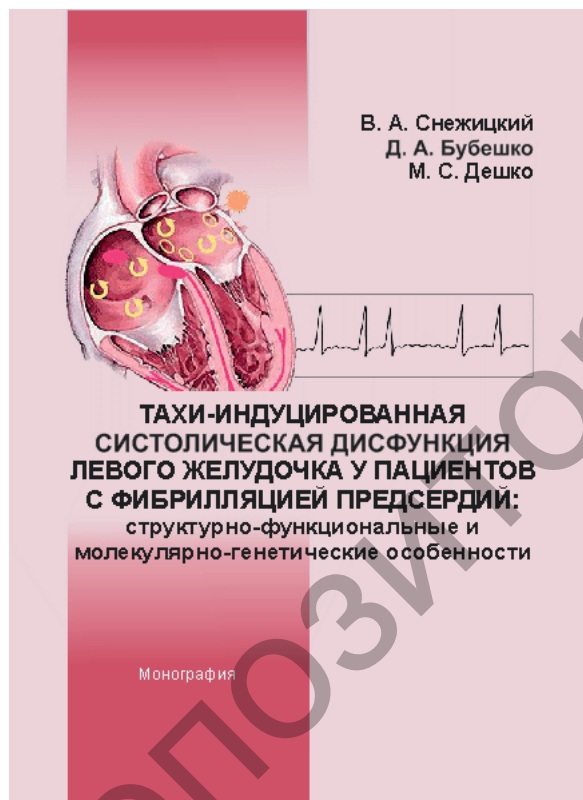
Conformity with the principles of ethics. The protocol of the experiment on rats was approved at a meeting of the commission on bioethics and humane treatment of laboratory animals at the educational institution "Vitebsk State Medical University" (protocol № 6 from 03.01.2019).

Об авторе/About the author

Лебедева Елена Ивановна/Lebedeva Elena, e-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-1309-4248

Поступила / Received: 06.04.2021

Принята к публикации / Accepted for publication: 20.05.2021



Снежицкий, В. А. Тахи-индуцированная систолическая дисфункция левого желудочка у пациентов с фибрилляцией предсердий: структурно-функциональные и молекулярно-генетические особенности : монография / В. А. Снежицкий, Д. А. Бубешко, М. С. Дешко – Гродно : ГрГМУ, 2021. – 124 с. ISBN 978-985-595-579-6.

В монографии приведены сведения, касающиеся развития тахи-индуцированной систолической дисфункции левого желудочка у пациентов с фибрилляцией предсердий. Приведены современные литературные данные по этиологии, патогенезу, диагностике, прогнозу фибрилляции предсердий и ее осложнений. Изложены результаты комплексного клиничко-инструментального и молекулярно-генетического обследования пациентов с фибрилляцией предсердий на фоне ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии в сочетании с тахи-индуцированной систолической дисфункцией левого желудочка и без нее. Приведены собственные результаты исследований молекулярно-генетических полиморфизмов генов цитокинов и генов, кодирующих компоненты ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Оценена взаимосвязь полиморфных вариантов генов с уровнем биомаркеров в плазме крови, развитием и клиническим течением фибрилляции предсердий. Описан новый метод оценки риска развития тахи-индуцированной систолической дисфункции у пациентов с фибрилляцией предсердий.

Рекомендуется для врачей-кардиологов, терапевтов, врачей общей практики и студентов медицинских вузов.