

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*



Якименко Владислав Андреевич

**Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного  
локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой  
кислоты**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
доктор медицинских наук  
Демяшкин Григорий Александрович

Москва – 2024

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	17
1.1. Введение .....	17
1.2. Методы лучевой терапии и виды ионизирующего излучения, применяемые при некоторых злокачественных новообразованиях органов брюшной полости ..	18
1.3. Облучение электронами.....	20
1.4. Молекулярные механизмы лучевого повреждения .....	21
1.5. Воздействие ионизирующего излучения на печень: острое радиационно-индуцированное поражение печени.....	25
1.6. Радиационно-индуцированный фиброз печени.....	29
1.7. Радиопротекторные свойства амифостина .....	31
1.8. Аскорбиновая кислота .....	34
1.9. Заключение по литературному обзору.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	37
2.1. Дизайн эксперимента .....	37
2.2. Методы исследования .....	42
2.2.1. Биохимический и иммуноферментный анализы крови.....	44
2.2.2. Иммуноферментный анализ гомогената печени .....	45
2.2.3. Молекулярно-генетическое исследование .....	45
2.2.4. Гистологическое исследование .....	46
2.2.5. Морфометрическое исследование .....	48
2.2.6. Гистохимическое исследование .....	48
2.2.7. Иммуногистохимическое исследование .....	48
2.2.8. Исследование фрагментации ДНК и гибели клеток.....	49
2.2.9. Мультиплексная иммунофлуоресцентная микроскопия.....	50
2.2.10. Статистические методы .....	51
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	52
3.1. Макроскопическая оценка .....	52

3.2. Биохимический анализ крови .....	53
3.3. Оценка маркеров редокс-системы .....	54
3.4. Гистологическое исследование и морфометрический анализ .....	55
3.5. Иммуногистохимическая оценка пролиферации клеток печени .....	62
3.6. Гибель клеток печени .....	65
3.6.1. Иммуногистохимическая оценка апоптотической гибели .....	65
3.6.2. TUNEL-исследование .....	68
3.6.3. Молекулярно-генетический анализ регуляторов жизненного цикла клеток печени .....	73
3.7. Анализ воспалительной реакции .....	75
3.8. Гистохимическое исследование .....	81
3.9. Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование на выявление маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени .....	86
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	92
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	106
ВЫВОДЫ .....	107
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	113

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Лучевой гепатит развивается как при непосредственном облучении злокачественных новообразований печени, так и органов брюшной полости. Кроме того, радиационно-индуцированное поражение печени может возникнуть в условии действия радиации на организм человека вследствие техногенных катастроф. Использование методов лучевой терапии при лечении онкологических пациентов регламентируется стандартами оказания медицинской помощи и клиническими рекомендациями, однако меры профилактики и лечения острого и хронического лучевого гепатита еще нуждаются в уточнении [IAEA Safety Standards; Series No. GSR, Part 3, General Safety Requirements; 2015].

В некоторых исследованиях продемонстрировано изменение гистоархитектоники печени при использовании X- или  $\gamma$ -облучения. Воздействие  $\gamma$ -излучения в дозе 30 Гр в 5 – 10 % случаев приводит к поражению всей печени, при увеличении дозы до 43 Гр в 50 % случаев. Однократное X-облучение уже в дозе 8 Гр приводит к морфологическим изменениям печени, таким как: отек, кровоизлияние и застой в синусоидных гемокапиллярах. В тоже время, описано, что однократное общее  $\gamma$ -облучение даже в низкой дозе (4 Гр) вызывало повреждения печени на клеточном и субклеточном уровнях, приводящее к разрывам ДНК и деструкции митохондрий, и как следствие – к апоптозу гепатоцитов [23]. Эффективной дозой при радиотерапии гепатоцеллюлярного рака считается доза выше 60 Гр, однако она увеличивает риск летальности до 76 % из-за наступления печеночной недостаточности.

Печень является одним из наиболее чувствительных к радиации органов, и ее повреждение сопровождается каскадом молекулярных реакций, таких как разрывы ДНК, прежде всего, в гепатоцитах, окислительный стресс и воспаление [58]. Эти процессы активируют механизмы репарации ДНК, апоптоза и клеточной сенесценции, в которых ключевую роль играют такие маркеры, как каспазы, p53 и

др. Воздействие электронов на ключевые регуляторные механизмы пролиферации, дифференцировки и апоптоза гепатоцитов и других структурных компонентов печени остаются малоизученными. В связи с чем необходимо проведение комплексного морфофункционального анализа изменений паренхимы печени с выявлением степени сенсibilизации гепатоцитов и других структур печени к бета-излучению.

В настоящее время существующие методы профилактики лучевого гепатита не обладают в должной мере радиопротективным свойством на гепатоциты, что нуждается в дальнейших исследованиях в том числе экспериментальных [27].

Большинство антиоксидантов, таких как аминофостин, аскорбиновая кислота, мельдоний, этилметилгидроксипиридина сукцинат активируют восстановительные реакции, мобилизуя маркеры эндогенной защиты, связывают активные формы кислорода, как на локальном, так и на системном уровнях [Campsci I., et al., 2023]. Однако, ряд авторов не исключает их радиопротекторное действие, направленное не только на подавление оксидативного стресса, но и на репарацию ДНК клеток в условиях радиационно-индуцированного гепатита [16].

В качестве одного из препаратов, снижающего степень выраженности морфофункциональных изменений структур печени после облучения электронами, можно рассмотреть аскорбиновую кислоту. Ее выбор обусловлен рядом преимуществ – высокой антиоксидантной активностью, большой терапевтической широтой и минимальными побочными эффектами [17].

Таким образом, дефицит данных о морфологических и молекулярно-биологических изменениях гепатоцитов и структур печени в условиях раннего и позднего лучевого гепатита, индуцированного воздействием электронами, а также о мобилизации компенсаторно-приспособительных механизмов введением аскорбиновой кислоты актуализирует проведение данного исследования.

## Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день существует большое количество исследований, посвященных молекулярным механизмам воздействия X- и гамма-излучения на печень – одним из наиболее радиочувствительным органов. Данные виды излучения обладают высокой степенью цитотоксичности, особенно в отношении здоровых тканей, попадающих в зону облучения при проведении лучевой терапии. Лучевое повреждение печени сопровождается снижением метаболических и детоксикационных функций, вплоть до развития выраженной печеночной недостаточности, приводящие к снижению качества жизни онкологических пациентов. При лучевой терапии злокачественных новообразований печени или соседних органов в зону ионизирующего излучения, как правило, попадает и нормальная ткань, что требует проведения комплексного анализа степени выраженности радиационно-индуцированного повреждения.

В тоже время малоизученными остается качественно-количественные изменения структур печени при воздействии бета-облучения, являющегося одним из перспективных методов современной лучевой терапии, ввиду его низкой проникающей способности и обладающие меньшим повреждающим действием на окружающие здоровые ткани [13]. Поэтому его можно использовать как альтернативу, в том числе при интраоперационном облучении опухолей печени и органов верхнего этажа брюшной полости.

До сих пор ведется активный поиск субстратов, которые могли бы предотвращать развитие печеночных осложнений у онкологических пациентов при радиотерапии. Одним из немногих рекомендованных лекарственных препаратов с доказанной эффективностью в отношении лучевых повреждений является амифостин, однако он вызывает ряд побочных действий. Это еще более актуализирует разработку средств-аналогов для радиопротекции печени. Так, аскорбиновая кислота уже была ранее апробирована в некоторых органных моделях в исследованиях *in vivo*. В тоже время отсутствуют комплексные исследования, доказывающие эффективность этого субстрата в печени.

Таким образом, актуально проведение комплексного анализа морфологических и молекулярно-биологических изменений структур печени после воздействия электронами и введения аскорбиновой кислоты: оценки пролиферации, дифференцировки и апоптоза гепатоцитов, степени выраженности степени воспалительной реакции, активации эндогенной редокс-системы, а также поиск предикторов фиброза.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы – выявление морфофункциональных особенностей структур печени после воздействия электронами и предлучевого введения аскорбиновой кислоты.

Задачи исследования:

1. Провести морфологический и морфометрический анализ печени после фракционного локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр (СОД 30 Гр) и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.
2. Провести биохимический анализ сыворотки крови на содержание аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы и общего билирубина после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.
3. Провести иммуноферментный анализ гомогената печени на уровни малонового диальдегида (MDA) и супероксиддисмутазы (SOD) после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.
4. Оценить уровни экспрессии факторов пролиферации (Ki-67) и гибели (caspase 3, TUNEL-методом) гепатоцитов, а также генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

5. Оценить системный и местный уровень концентрации провоспалительных (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительного (ИЛ-10) цитокинов после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

6. Оценить степень фиброза печени в разные временные точки после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

7. Оценить коэкспрессию  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в клетках Ито в качестве маркеров-предикторов раннего радиационно-индуцированного фиброза печени после фракционного локального облучения электронами СОД 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина.

### **Научная новизна**

В рамках исследования определены структурные и функциональные изменения структур печени после воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, с оценкой этапов жизненного цикла гепатоцитов, анализом системной и локальной воспалительной реакции и степени фиброзирования, а также при предлучевом введении аскорбиновой кислоты, на протяжении трёх месяцев.

Впервые на основании проведенного морфологического анализа определены степень постлучевых повреждений гепатоцитов, диапазон токсических эффектов, их адаптационная способность после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр, согласно разработанной шкале морфологических изменений печени, которые характеризуются баллонной дистрофией большинства гепатоцитов, фокальной атрофии 1/3 – 2/3 части печеночных долек, частичному некрозу (менее 50% окружности большинства портальных трактов), клеточной воспалительной инфильтрацией 1/3 – 2/3 части портальных трактов, расширению

и застойным явлениям в синусоидных гемокапиллярах, преимущественно на ранних сроках эксперимента.

Впервые показано, что в ответ на локальное облучения печени электронами в СОД 30 Гр происходит повышение уровней интерлейкина-1, интерлейкина-6 и интерлейкина-10 как в системном кровотоке, так и в ткани печени, при этом высокие концентрации цитокинов сохраняются локально в течение длительного периода времени, что приводит к активации фиброза и усилению печеночной недостаточности, проявляющейся повышением уровней аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и общего билирубина.

Впервые показано, что локальное воздействие электронами на структуры печени в режиме фракционирования в СОД 30 Гр сопровождается повышением уровня малонового диальдегида и понижением концентрации супероксиддисмутазы, преимущественно на ранних сроках эксперимента.

Впервые, выявлено уменьшение количества пролиферирующих (Ki-67↓) при одновременном увеличении доли апоптотических (каспаза 3↑) гепатоцитов, сопровождающееся повышением уровней экспрессии генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* на ранних сроках после локального облучения электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр с последующим частичным восстановлением этих параметров к третьему месяцу эксперимента.

Впервые, доказано, что локальное воздействие электронов в СОД 30 Гр приводит к резкому увеличению количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК, показанное TUNEL-методом в ранний период и полное восстановление TUNEL-сигналинга через два месяца.

Впервые показано, что локальное облучение электронами печени в режиме фракционирования (СОД 30 Гр) характеризуется повышением концентрации ключевых участников иммунной реакции – цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , ИЛ-10) на системном уровне – транзиторно, а на местном – на протяжении всего времени наблюдения.

Впервые, установлены маркеры-предикторы для раннего выявления в печени отсроченных осложнений лучевой терапии, таких как радиационно-индуцированный фиброз: коэкспрессия  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  указывает на активацию механизма фиброобразования. Выявлены функциональные особенности клеток Ито и других непаренхиматозных клеток.

Впервые доказаны радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты в отношении структур печени, прежде всего – гепатоцитов, обеспечивающее поддержание локального внутрипеченочного гомеостаза (при сравнении с фармакологическими эффектами амифостина) за счет ее антиоксидантной активности, проявляющейся балансом редокс-системы и субнормальных уровней маркеров этапов жизненного цикла гепатоцитов, снижением степени воспалительной реакции и фиброобразования.

Полученные данные открывают новые перспективы в понимании патогенетических механизмов лучевого гепатита, которые будут способствовать совершенствованию диагностики, подходов к лечению и профилактики данных морфологических изменений.

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

Научная ценность и теоретическая значимость настоящей диссертационного исследования проявляется в получении новых и дополнении существующих данных о морфологических и молекулярно-биологических нарушениях структур печени, а также изменения биохимических параметров после фракционного локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр. Воздействие электронами во фракционном режиме СОД 30 Гр приводит к изменению уровней пролиферации и апоптоза гепатоцитов в сторону гибели этих клеток, увеличению TUNEL-позитивных клеток.

Влияние электронов сопровождается меньшей площадью поражения структур печени, относительным сохранением морфологического и функционального статуса гепатоцитов на малой площади среза и умеренным увеличением провоспалительных цитокинов в ткани печени.

По результатам иммуноферментного, биохимического, гистологического и иммуногистохимического исследований подтверждено радиопротекторное свойство аскорбиновой кислоты, которое проявляется в восстановлении пролиферативно-апоптотического баланса гепатоцитов, снижении степени воспалительной реакции и возрождении маркеров естественной антиоксидантной защиты.

Коэкспрессию  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в клетках Ито можно рассматривать в качестве маркеров-предикторов раннего радиационно-индуцированного фиброза печени.

По результатам проведенной научно-прикладной работы предложена шкала морфологических изменений печени, которую можно использовать при диагностике гепатитов различной этиологии.

Практический вклад работы отражается в предоставлении новых ценных данных об изменениях в структуре и функциях печени после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр с предварительным интраперитонеальным введением аскорбиновой кислоты, которые могут быть использованы для определения оптимальных доз электронотерапии в области клеточной биологии, патологической анатомии, радиобиологии и онкологии. Эти результаты также могут способствовать разработке методов профилактики постлучевых осложнений органов брюшной полости. Дополнительно, полученные результаты настоящего исследования могут быть использованы в клинических рекомендациях для врачей-патологоанатомов, врачей-радиотерапевтов, онкологов и врачей других смежных специальностей.

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлены структурные и функциональные изменения структур печени,

раскрыты механизмы регуляции местного внутрипеченочного гомеостаза в условиях радиационно-индуцированного поражения, вызванного локальным воздействием электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр и влияния аскорбиновой кислоты.

### **Методология и методы исследования**

В ходе выполнения диссертационной работа использованы гистологический, гистохимический, молекулярно-биологический, молекулярно-генетический и статистические методы исследования. Работу проводили на экспериментальных животных – крысах породы Вистар (n=180), которых локально облучали электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр и вводили аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг/кг (препарат сравнения – амифостин в дозе 150 мг/кг) перед каждой фракцией.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Локальное облучение электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр приводит к развитию радиационно-индуцированного поражения печени (баллонная дистрофия гепатоцитов, фокальная атрофия и некроз печеночных долек, воспалительная реакция, расширение и застой в синусоидных гемокапиллярах) вплоть до печеночной недостаточности. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает степень выраженности воздействия электронами на структуры печени.

2. Локальное воздействие электронами на печень в режиме фракционирования в суммарной дозе 30 Гр характеризуется угнетением эндогенной редокс-системы (дисбаланс MDA и SOD) и фрагментацией ДНК (установлено TUNEL-методом) с нарушением регуляции жизненного цикла

гепатоцитов (каспаза-3↑, *Bax*↑, *Bcl-2*↑, *Ki-67*↓). Напротив, аскорбиновая кислота активирует маркеры эндогенной антиоксидантной системы и снижает степень повреждения ДНК, поддерживая пролиферативно-апоптотический баланс.

3. Локальное облучение печени электронами индуцирует как системное, так и местное повышение концентрации цитокинов ИЛ-1b, ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , ИЛ-10, при этом, последнее сохраняется в течение длительного времени, усиливает коэкспрессию  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$ , приводящей к радиационно-индуцированного фиброзу печени. Антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты нивелируют воспалительные и фибротические процессы, обусловленные воздействием  $\beta$ -излучения.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой из животных – самцов крыс аутбредного стока породы Вистар (вес  $220 \pm 20$  грамм; возраст 9–10 недель;  $n=180$ ).

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну.

Полученные в результате подсчёта данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows (IBM Analytics, США). Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SD). Для оценки

нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. При сравнении исследуемых групп при распределении, отличном от нормального, применяли критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Парные сравнения проводили при помощи U-теста Манна-Уитни. Значение  $p \leq 0,05$  считали статистически значимым.

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на: VII Международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради жизни» (г. Москва, 2024 г.); XVIII Международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков «СОВА-2024» (г. Иваново, 2024 г.).

Апробация работы состоялась 29 октября 2024 (протокол №12) на заседании межкафедральной конференции Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно выполнил все этапы диссертационного исследования: постановка цели и задач, подбор методов, получение, анализ и статистическая обработка результатов, формулирование основных положений и выводов, теоретической и практической значимости, включая новизну полученных результатов. Также им собственноручно произведен отбор и проанализирована научная литература в сфере выбранной темы, разработан дизайн исследования, сформирована база данных и цифровой архив изображений, выполнена обработка полученных данных с использованием современных методов клеточной биологии. В ходе реализации научной работы диссертант лично выполнял гистологическое, морфометрическое, гистохимическое (трихромом по Массону),

иммуногистохимическое (на маркеры Ki67, Caspase 3, TUNEL-метод) исследования, мультиплексную иммунофлуоресцентную микроскопию (на Alpha-Smooth Muscle Actin, TGF-beta), иммуноферментный анализ (на малоновый диальдегид, супероксиддисмутазу, ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF- $\alpha$ ), проводил статистический анализ полученных результатов. Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

### **Внедрение результатов диссертации в практику**

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения (использования) новой технологии б/н от 11.09.2024 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки / научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Акт о внедрении №494 от 11.09.2024 г.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация на тему «Структурно-функциональная характеристика печени после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 10, 13, 14 паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология: пункту 10. Изучение

закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов; пункту 13. Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели; пункту 14. Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды.

### **Публикации по теме диссертации**

По результатам исследования автором опубликовано 7 работ, в том числе 4 научных статьи в изданиях из RSCI и в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в изданиях, индексируемых в международных базах (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация написана объемом 131 страница машинописного текста, построена по традиционному плану – состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов с последующим их обсуждением, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Таблиц – 6, рисунков – 42. Характеристика списка литературы: всего – 179 источников, отечественных – 20, зарубежных – 159.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Введение

На современном этапе большое количество онкологических пациентов со злокачественными новообразованиями (ЗНО) подвергаются воздействию ионизирующего излучения – лучевой терапии. Радиотерапия может быть, как методом выбора при лечении некоторых опухолей [7, 8], так и являться его компонентом в качестве дополнительного адъювантного, неоадъювантного и / или паллиативного воздействия.

Однако, применение методов общего облучения (всего тела), дистанционной и / или интраоперационной лучевой терапии в подавляющем большинстве случаев связано не только с гибелью атипических клеток, но и повреждением здоровых тканей паратуморальной области, попадающих в зону облучения. Так, проведение лучевой терапии по поводу злокачественных новообразований органов брюшной полости приводит к повреждению здоровых гепатоцитов, что, в некоторых случаях, связано с развитием радиационно-индуцированного поражения печени (РИПП) и хронической печеночной недостаточности. Принято делить РИПП на два типа – классические (при отсутствии сопутствующих заболеваний печени) и неклассические (при наличии сопутствующих заболеваний печени с нарушением ее функции). Клинические проявления неспецифичны, что осложняет проведение своевременной диагностики и коррекции осложнения, и могут проявляться общей слабостью, утомляемостью, увеличением окружности живота, болью в абдоминальной области, гепатомегалией, асцитом (без желтухи), а также изолированным увеличением уровня щелочной фосфатазы [132].

По данным некоторых авторов, признаки классической РИПП обычно развиваются в течение 4 – 8 недель после облучения, однако диапазон варьирует от 2 недель до 7 месяцев и более [132]. Ранее предполагалось, что доза ионизирующего излучения 30 Гр является пограничной для здоровых людей и не вызывает развития РИПП, однако те же авторы признают, что эти данные не

являются точными, так как изначально сниженная функция печени (например, при ее злокачественном поражении) снижает толерантность органа к лучевому воздействию.

В более позднем исследовании информация была дополнена новыми данными: авторы заявляют, что развитие классического РИПП обычно происходит в течение 4-х месяцев после облучения, а сопутствующие заболевания печени, такие как вирусный гепатит или цирроз печени, связаны не только со снижением толерантности к облучению, но и с мимикрией признаков РИПП («неклассическая» форма) [110].

Позднее, авторы провели крупный анализ когорты пациентов, прошедших лечение гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), и пришли к заключению, что в 24,7% случаев происходит развитие РИПП в течение 22 месяцев после лучевой терапии [47]. Кроме того, существуют данные о развитии РИПП в 5 – 10 % случаев при воздействии облучения уже в дозах 30 – 35 Гр, а при облучении 43 Гр – в 50 % случаев, в то время как оптимальной контролирующей дозой при лечении объемных новообразований является 50 – 70 Гр и более [9; 73]. Единичные исследования демонстрировали развитие РИПП даже при проведении неoadьювантной химиорадиотерапии по поводу рака пищевода, трансплантации гематопозитических клеток и / или костного мозга [135].

## **1.2. Методы лучевой терапии и виды ионизирующего излучения, применяемые при некоторых злокачественных новообразованиях органов брюшной полости**

В настоящее время существует множество классификаций и нозологий методов и видов лучевой терапии. По определению ВОЗ, ионизирующее излучение (ИИ) – это вид энергии, высвобождаемой атомами в форме электромагнитных волн или частиц [4]. По виду частиц, ИИ принято делить на  $\alpha$ -излучение (ядра атомов

гелия: 2 протона + 2 нейтрона),  $\beta$ -излучение (электроны, протоны), фотоны, X- и  $\gamma$ -волновое излучение. Данные виды излучения перечислены в порядке возрастания их проникающей способности. В лечении ЗНО наиболее часто используются волновые виды ИИ, энергия которых способна разрушать высокопролиферирующие атипичные клетки в соответствии с законом Бергонье-Трибондо.

В клинической практике, подбор вида ИИ, дозы и режима облучения, а также способа воздействия определяется на основании множества факторов: размера опухоли, ее операбельности, локализации, степени дифференцировки, морфологии, структуры, метастазирования и др. Кроме того, учитываются данные пациента, такие как возраст, пол, образ жизни, факторы риска развития заболеваний и осложнений, сопутствующие заболевания и др. На основании всех перечисленных данных врач устанавливает цели и задачи лучевого воздействия: моно- или комплексная (в сочетании с хирургическим лечением / химиотерапией), адьювантная, неадьювантная, паллиативная терапия.

Исходя из вышеперечисленного, становится ясным, что выбор дозы, режима и вида радиотерапии варьирует в широком диапазоне. Например, при забрюшинных неорганных саркомах рекомендуется проведение конформной лучевой терапии по методике IMRT (лучевой терапии с модуляцией интенсивности) в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе (СОД) 45-50 Гр, что является оправданным ввиду высокого риска рецидивирования опухоли и низкой частоты метастазирования. При этом лечении органы брюшной полости являются «органами риска» лучевого поражения [5].

При лечении гепатоцеллюлярного рака лучевая терапия не является методом выбора, однако применяется в тех случаях, когда другие варианты локо-регионарного воздействия или хирургическое вмешательство не способны увеличить выживаемость пациента и регрессию опухоли. К методам радиотерапии ГЦК относятся: конформное облучение 3D-CRT, IMRT и стереотаксическое облучение (SBRT) под контролем визуализации (IGRT). При этом суммарные дозы

при сохранной функции печени варьируют от 30 до 50 Гр [9]. Помимо этого, назначение дистанционной лучевой терапии возможно для лечения хронической боли при ЗНО ободочной кишки с целью устранения симптомов заболевания [6]. Кроме того, конформное облучение 3D-CRT и IMRT являются рекомендуемыми методами лучевой терапии в рамках адъювантного послеоперационного лечения рака билиарного тракта в дозах от 45 Гр и более [10]. Таким образом, в современных клинических рекомендациях по лечению ЗНО печени и органов верхнего этажа брюшной полости доза суммарного облучения составляет от 30 до 60 Гр при фракционировании дозы в течение 5 дней.

### 1.3. Облучение электронами

Одним из перспективных и малоизученных видов ионизирующего излучения являются электроны ( $\beta$ -частицы), которые обладают относительно низкой массой. Ввиду низкой ионизирующей способности (по сравнению с  $\alpha$ -частицами) поток электронов способен проникать на расстояние около 2 – 3 см в биологической ткани [11]. По результатам недавних дозиметрических исследований было определено, что оптимальной энергией для стандартных линейных ускорителей электронов является диапазон 4 – 6 MeV, однако некоторые модифицированные клинические акселераторы позволяют увеличить данные значения более 20 MeV (для FLASH-облучения при  $>40$  Гр/с), что однако ограничивает проникающую способность, а при лечении ЗНО позволяет облучать лишь поверхностные новообразования [53; 171]. В последнее время появляются исследования, посвященные оценке эффективности VHEE-облучения (энергия 100 – 250 MeV), данные о безопасности которого противоречивы и немногочисленны. Тем не менее, даже применение пучков электронов с энергией 100 MeV демонстрировало значительное снижение негативного влияния облучения на здоровые «органы риска» по сравнению со стандартными методами терапии фотонами [177].

Данные факты свидетельствуют о потенциальной возможности снижения токсичности ионизирующего излучения в отношении здоровых тканей паратуморальной области посредством замещения применяемых на сегодняшний день видов ИИ на электронотерапию.

Важным аспектом облучения электронами является сохранение относительной безопасности для здоровых клеток при высокой эффективности в отношении новообразований, что было доказано в недавних крупных исследованиях, посвященных сравнению электронов и других видах ИИ в рамках интраоперационной лучевой терапии (IORT) в режимах FLASH и VHEE [38; 85].

#### **1.4. Молекулярные механизмы лучевого повреждения**

Авторами многочисленных исследований было доказано, что воздействие ИИ приводит к лучевому повреждению всех биологических тканей, попадающих в зону облучения с нарушением структуры и функций как атипических, так и здоровых клеток. Более того, существуют данные о развитии так называемого «эффекта свидетеля» (или радиационно-индуцированного «байстэндер»-эффекта) [12], молекулярные механизмы которого остаются предметом дискуссий и, вероятно, связаны с активацией клеточной пролиферации или гибели, токсического воздействия свободных радикалов, индукции экспрессии генов сигнальных путей митоген-активируемой протеинкиназы (mitogen activated protein kinases, MAPKs), ядерного фактора каппа-би (nuclear factor kappa B, NFkB), синтазы оксида азота (inducible nitric oxide synthase, iNOS) и циклооксигеназы-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) [159]. Данные изменения приводят к гибели соседних здоровых клеток, непопавших напрямую в зону облучения, что связано с увеличением пораженной облучением зоны и ее распространением вокруг очага лучевого воздействия.

Цитотоксические эффекты различных видов ионизирующего излучения достаточно однотипны и происходят по общим принципам в большинстве органов.

Так, поток заряженных частиц (при  $\beta$ -облучении) или волн (при  $\gamma$ -облучении) запускает прямые и косвенные пути лучевого поражения.

*Прямой путь* обусловлен повреждением генетического аппарата и макромолекул в клетки непосредственно энергией заряженной частицы. Поток электронов «выбивает» частицы из атомов цепей ДНК, что приводит к изменению заряда их отдельных участков. Это сопровождается формированием разрывов и сшивок в структуре ДНК, хромосомных aberrаций. Подробные механизмы прямого воздействия ИИ продемонстрированы на рисунке 1.1.

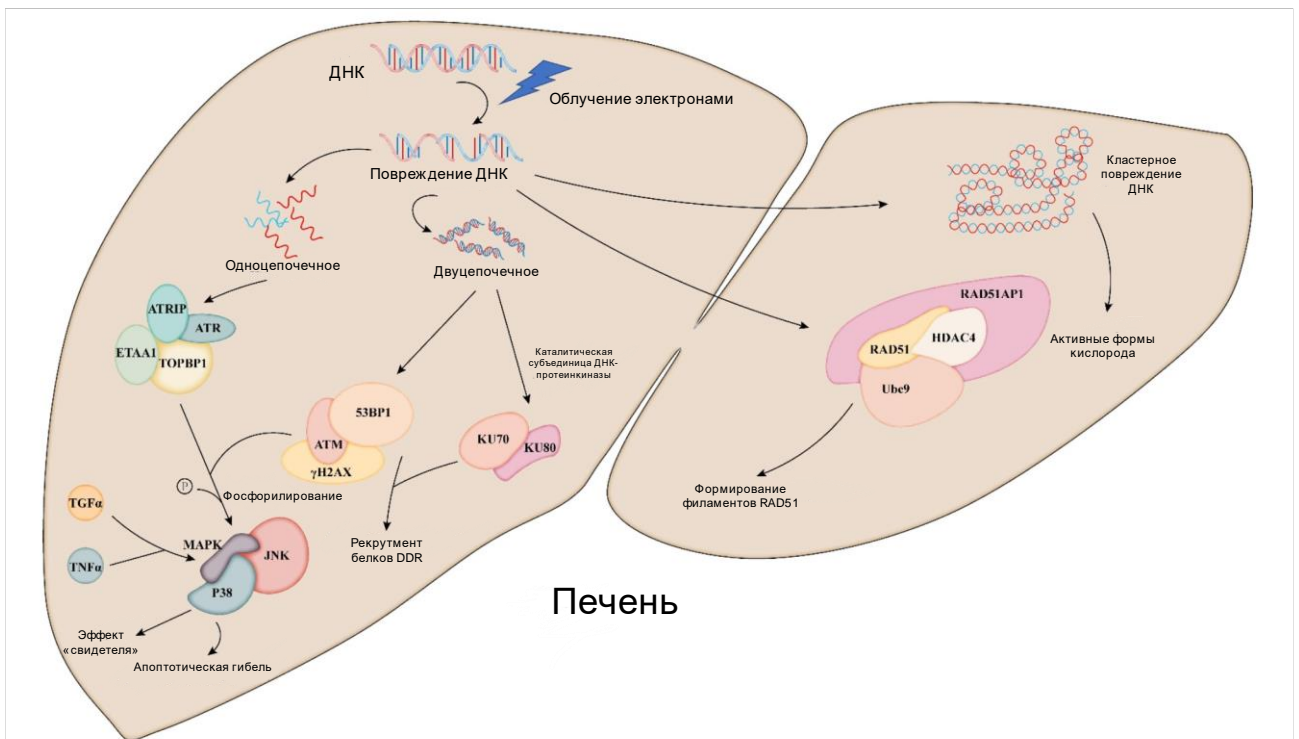


Рисунок 1.1 – Прямой путь лучевого повреждения печени, схема

Так, одноцепочечные разрывы/сшивки ДНК считаются менее опасными ввиду возможности их репарации с матрицы второй цепи. Тем не менее, в случае нерепарируемого повреждения при участии трансформирующего фактора роста- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) происходит активация каскадов MAPK/Jnk/p38, модуляция которых ответственна за запуск клеточной гибели путем апоптоза, а также за развитие ранее описанного «эффекта наблюдателя».

В свою очередь, двуцепочечные разрывы/сшивки ДНК чаще всего являются фатальными для клетки, так как их репарация практически невозможна. Их появление связано с активацией локусов  $\gamma$ -H2AX и рекрутменту белков-маркеров повреждения ДНК (KU70, KU80). Фосфорилирование  $\gamma$ -H2AX приводит к индукции MAPK/Jnk/p38, которые запускают клеточную гибель путем апоптоза.

Помимо этого, в некоторых случаях происходит накопление целых кластеров и комплексов повреждений ДНК (cluster/complex DNA damage, CDD), которые значительно тормозят репарацию и приводят к накоплению большого количества нерепарируемых мутаций, увеличивая нестабильность генома [144].

Кроме того, в единичных молекулярно-генетических исследованиях было обнаружено, что некоторые микро-РНК (miR) также являются непосредственными участниками лучевого повреждения. Так, miR-34a является промотором повреждения ДНК, индуктором экспрессии цитокинов и ингибитором синтеза ферментов эндогенной антиоксидантной защиты, а также медиатором p53-опосредованного апоптоза и остановки клеточного цикла в фазе G1 [21]. В другом исследовании было обнаружено, что miR-21 и miR-34c ответственны за индукцию «эффекта наблюдателя» посредством увеличения экспрессии факторов TGF- $\beta$ 1 и NO, в то время как miR-495 способствует ограничению «эффекта наблюдателя» путем модуляции сигнального пути Sp1/eNOS ( $\downarrow$ NO) [60; 62; 107].

Косвенный путь лучевого повреждения тканей обусловлен ионизирующей способностью  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -излучения. Так, ионизация атомов в процессе радиолиза внутриклеточной воды приводит к их диссоциации и генерации свободных радикалов – активных форм кислорода (АФК) и реактивных форм азота (РФА) [126]. Накопление этих субстратов становится причиной развития оксидативного стресса, преобладания оксидантов в ткани, нарушения оксидантно-антиоксидантного гомеостаза (эндогенной редокс-системы). Помимо этого, АФК способны напрямую повреждать ДНК и гены, ответственные за синтез ферментов антиоксидантной защиты, что также усугубляет степень окислительного повреждения [133].

Биохимически, АФК чаще всего являются продуктами радиолиза молекул воды, то есть радикалами, содержащими кислород, с дефицитом от одного до трех электронов, что в разы повышает их реактивность [57]. При оксидативном стрессе, вызванном ИИ, чаще всего преобладают пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ), супероксид-анион радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ) [124]. Последний считается одним из наиболее опасных, так как способен к оксидации большого количества внутриклеточных макромолекул, таких как белки, липиды, углеводы и др. [118].

В свою очередь, в результате пероксидации липидных молекул свободными радикалами кислорода происходит образование липидных гидропероксидов (LOOH), которые также способны к взаимодействию с другими макромолекулами и усилению их деградации в рамках оксидативного стресса [28]. Конечными продуктами этого процесса считаются два наиболее изученных соединения, уровни которых используют для оценки выраженности пероксидации липидов и оксидативного стресса – малоновый диальдегид (MDA) и транс-4-гидрокси-2-ноненал (4-HNE) [116].

Помимо этого, хорошо изучено влияние оксидативного стресса на белковые макромолекулы, которые не только меняют свою конформацию с нарушением биологических функций, но и взаимодействуют со свободными радикалами с образованием карбонильных белковых производных [68]. Кроме того, в результате воздействия свободных радикалов при ИИ возможно нарушение структуры ДНК, причем как ядерной, так и митохондриальной, что влечет за собой мутации и даже карциногенез. Аналогичные механизмы влияния оксидативного стресса на клетки описаны при некоторых онкологических, сердечно-сосудистых, эндокринных, нейродегенеративных, аллергических и других заболеваниях [55; 95; 104; 166].

Эндогенная антиоксидантная система является адаптационным механизмом защиты организма от свободных радикалов, генерируемых в ответ на воздействие ИИ. Ее ключевыми эффекторами являются эндогенные низкомолекулярные антиоксиданты (глутатион, аскорбат, коэнзим Q10,  $\alpha$ -липоевая кислота, токоферол

и др.) и антиоксидантные ферменты (супероксид дисмутазы (SODs), глутатион редуктаза (GR), глутатион пероксидазы (GPxs) и каталазы (CAT)) [116; 173]. Экзогенные антиоксиданты также принимают участие в защите от токсического действия свободных радикалов: каротиноиды, витамины А, С, Е, полифенолы, селен и др. [125] Однако, воздействие ИИ обычно сопряжено с быстрым синтезом АФК и приводит к нарушению функций митохондрий в сочетании с дисрегуляцией активности синтазы оксида азота, липоксигеназ, циклооксигеназ и NADPH-оксидаз [142]. Таким образом, антиоксидантная система быстро истощается и формируется дисбаланс оксидантов и антиоксидантов с выраженным преобладанием первых над вторыми. Продолжение генерации свободных радикалов при дисфункции редокс-системы приводит к дальнейшему повреждению облученных (в результате косвенных механизмов лучевого повреждения) и здоровых («эффект наблюдателя») клеток органа. Кроме того, синтез многочисленных цитокинов в сочетании с формированием большого количества продуктов разрушения клеток активирует миграцию иммунных клеток в зону облучения, которые также экспрессируют большое количество факторов агрессии, повреждая при этом здоровые клетки. Молекулярные механизмы этого пути повреждения будут описаны ниже.

### **1.5. Воздействие ионизирующего излучения на печень: острое радиационно-индуцированное поражение печени**

Радиационно-индуцированное поражение печени или радиационно-индуцированная болезнь печени (*от англ. Radiation-induced liver disease, RILD*) представляет собой сложное патологическое состояние, возникающее в результате воздействия ионизирующего излучения на ткани печени, что приводит к различным молекулярным и клеточным изменениям. Основные патогенетические механизмы развития РИПП включают в себя повреждение ДНК (прямой путь

лучевого повреждения), окислительный стресс (косвенный путь лучевого повреждения), воспаление (острое или хроническое) и фиброз (в отдаленные сроки).

*Окислительный стресс и повреждение митохондрий.*

Ионизирующее излучение инициирует образование активных форм кислорода (АФК), которые играют центральную роль в патогенезе РИПП [135]. Повреждение митохондрий приводит к нарушению функций цепи переноса электронов и усиленному образованию АФК, что вызывает апоптоз и преждевременную гибель клеток печени. Накопление АФК усиливает повреждение клеточных мембран, белков и ДНК, что инициирует митохондриально-опосредованный некроз и митохондриальный (внутренний) путь апоптоза [100; 108; 137]. Ключевые события включают перемещением цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, его связывание с белком АРАФ-1 и активацию каспазы-9 с дальнейшим включением эффекторных каспаз (каспазы-3), ответственных за терминацию апоптотического каскада и гибель клеток [157].

*Повреждение ДНК и клеточная сенесценция.*

Радиация вызывает прямое повреждение ДНК потоком заряженных частиц (электронов), генерируя одноцепочечные и двуцепочечные разрывы, что частично активирует механизмы репарации ДНК и систему клеточного ответа на повреждение ДНК (от англ. DNA Damage Response, DDR system) и приводит к клеточной сенесценции или апоптозу [135]. Эти процессы усиливают воспаление и нарушают функцию печени, особенно при хроническом воздействии радиации.

В частности, ключевую роль в этом процессе играют протеины АТМ (атаксия-телеангиэктазия мутированная) и АТР (атаксия-телеангиэктазия и Rad3-подобный белок), которые распознают повреждения и активируют сигнальные каскады для остановки клеточного цикла и запуска механизмов репарации ДНК. Если повреждения слишком обширны и их невозможно исправить, эти сигнальные пути запускают апоптоз через активацию p53 и проапоптотических белков семейства Bcl-2, таких как Bax и Bak, которые способствуют высвобождению цитохрома *c* из митохондрий и запуску внутреннего апоптотического каскада

посредством каспаз 9 и 3, что ведет к деградации клеточных компонентов и гибели гепатоцитов [153].

Помимо классических путей апоптоза, радиация может вызывать ферроптоз — особую форму клеточной гибели, связанную с окислением липидов и нарушением метаболизма железа. Ионизирующее излучение стимулирует накопление лабильного железа, что приводит к образованию токсичных продуктов окисления липидов и последующей гибели клеток [63].

При значительных повреждениях ДНК, если апоптоз не инициируется, клетки могут переходить в состояние клеточной сенесценции — это устойчивое состояние, которое характеризуется прекращением клеточного деления. Сенесценция может выступать как защитный механизм, предотвращающий неконтролируемое деление поврежденных клеток и образование новых опухолей. Однако накопление таких клеток в печени приводит к хронизации воспаления и прогрессированию РИПП [87].

Сенесцентные клетки не только секретируют провоспалительные факторы, такие как интерлейкин-6 (ИЛ-6) и интерлейкин-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ), но и ростовые факторы, что формирует так называемый SASP (от англ. senescence-associated secretory phenotype) [43; 145]. Этот молекулярный паттерн усиливает воспаление и активируют соседние клетки, включая звездчатые клетки печени, что запускает фибротический процесс.

#### *Воспаление.*

Практически все виды ионизирующего излучения действует как на гепатоциты, так и на резидентные макрофаги — клетки Купфера, это прежде всего стимулирует секрецию цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  и TGF- $\beta$  [113]. Кроме того, активация DDR вызывает транскрипцию провоспалительных генов через сигнальный путь NF- $\kappa$ B, что приводит к продукции цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6. Сигнальный путь NF- $\kappa$ B является центральным регулятором воспалительного ответа при радиационном повреждении [112; 113]. Он активируется под воздействием АФК и DDR, приводя к экспрессии генов, ответственных за продукцию провоспалительных цитокинов, хемокинов и молекул

адгезии. Не исключено, что сигнальные пути MAPK и JAK/STAT также способны к модуляции воспалительного ответа, однако их роль наиболее определена при развитии хронического воспаления при повторных повреждениях (в том числе при фракционном облучении) [40; 88].

Помимо этого, паттерн SASP также способствует секреции интерлейкинов (ИЛ-6, ИЛ-1 $\alpha/\beta$ ), TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и других медиаторов воспаления, что приводит к миграции иммунных клеток на ранних этапах, прогрессированию и хронизации воспаления, а также активации фибробластов и HSCs в отдаленные сроки [123]. Последнее влечет за собой индукцию синтеза экстрацеллюлярного матрикса и коллагеновых волокон с последующим ограничением воспаления и формированием фиброза печени.

Эндотелиальные клетки печени также радиочувствительны и играют важную роль в развитии воспалительного ответа. Под воздействием излучения они активируются и начинают секретировать молекулы адгезии, такие как ICAM-1 и VCAM-1, что способствует рекрутированию воспалительных клеток, включая нейтрофилы и моноциты [98].

Кроме того, некоторые авторы заявляют об усилении воспаления и фиброза в окружающих тканях печени при развитии «эффекта свидетеля», патогенез которого был описан ранее [157].

В совокупности перечисленные молекулярные механизмы приводят к структурным изменениям в печени в результате смешанной (апоптоз, ферроптоз, митохондриально-опосредованный некроз) гибели гепатоцитов, в сочетании с эндотелиальной дисфункцией, воспалением (вначале острым, затем хроническим), фиброзом и прогрессирующей печеночной недостаточностью, что считается паттерном РИПП.

## 1.6. Радиационно-индуцированный фиброз печени

Радиационно-индуцированная болезнь печени развивается как следствие лучевой терапии и характеризуется значительным повреждением ткани печени, приводящим к прогрессирующему фиброзу. Фиброз печени представляет собой сложный процесс, включающий активацию звездчатых клеток печени (HSC), хроническое воспаление и ремоделирование экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ). В основе этих изменений лежат молекулярные механизмы, связанные с окислительным стрессом, активацией сигнальных путей и продукцией провоспалительных цитокинов [22; 167].

HSCs играют ключевую роль в процессе фиброза [75]. В норме эти клетки находятся в покое (неактивном) состоянии и ответственны за депонирование витамина А. Однако под воздействием провоспалительных факторов и АФК они трансформируются в миофибробластоподобные клетки, которые активно продуцируют компоненты внеклеточного матрикса, включая коллаген I и III типа, фибронектин и ламинин. Основными факторами-активаторами HSC, являются TGF- $\beta$ , PDGF и Ang II [169]. TGF- $\beta$ , который считается главным медиатором фиброза, активирует Smad- и non-Smad- сигнальные пути, что приводит к усилению экспрессии генов фиброгенеза [160]. Таким образом, активированные HSC начинают интенсивно производить коллаген, что приводит к избыточному накоплению ЭЦМ в ткани печени [93]. Кроме того, активированные HSC взаимодействуют с клетками Купфера (резидентными макрофагами печени), эндотелиальными клетками и сенесцентными гепатоцитами, которые также выделяют провоспалительные и профибротические молекулы. Эти сигналы создают порочный круг активации HSC и усиления фиброза [147; 154]. Вдобавок к этому, данные клетки поддерживают воспалительный процесс за счет секреции цитокинов и хемокинов, таких как ИЛ-6 и MCP-1 [67].

Кроме того, SASP также включает синтез широкого спектра провоспалительных и профибротических молекул, таких как ИЛ-6, ИЛ-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  и АФК. Эти молекулы активируют не только HSC, но и другие клетки

микроокружения в печени, такие как макрофаги и эндотелиальные клетки, что приводит к замкнутому кругу воспаления и фиброгенеза [87].

В дальнейшем, накопление компонентов ЭЦМ и недостаточная их деградация считаются важными факторами в формировании и поддержании прогрессирующего фиброза печени. В норме металлопротеиназы (MMPs) и их ингибиторы (TIMPs) регулируют динамическое равновесие между синтезом и деградацией ЭЦМ. Однако, при РИПП наблюдается дисбаланс между MMPs и TIMPs, что приводит к избыточному накоплению коллагена и других компонентов ЭЦМ, что усиливает дезорганизацию структуры печени. Этот процесс также усиливается под действием TGF- $\beta$ , который стимулирует продукцию TIMPs и уменьшает активность MMPs [113]. Для предотвращения чрезмерного фиброза существуют механизмы отрицательной регуляции, такие как ингибиторы Smad-сигналов (например, Smad7), которые блокируют фосфорилирование Smad2/3. Однако при хроническом повреждении печени эти механизмы могут быть подавлены, что приводит к усилению фиброза [156; 178].

На основании всего вышеперечисленного, становится ясным, что ключевую роль в активации HSCs и индукции фиброза печени играет трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Так, TGF- $\beta$  связывается с рецепторами типа I (TGF- $\beta$ RI) и типа II (TGF- $\beta$ RII) на поверхности HSCs. После связывания TGF- $\beta$ RII фосфорилирует TGF- $\beta$ RI, что приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей, наиболее значимыми из которых являются Smad-зависимый и не-Smad (альтернативные) сигнальные пути.

Сигнальный путь Smad является основным механизмом, через который TGF- $\beta$  регулирует экспрессию генов, связанных с фиброзом. После активации рецепторов TGF- $\beta$ RI происходит фосфорилирование Smad2 и Smad3. Эти фосфорилированные белки образуют комплекс с Smad4 и перемещаются в ядро, где они регулируют транскрипцию генов, ответственных за продукцию компонентов ЕСМ, таких как коллаген, фибронектин и другие молекулы. Помимо Smad-зависимого пути, TGF- $\beta$  также активирует несколько не-Smad путей,

включая MAPK, PI3K/AKT и Rho/ROCK. Эти сигнальные каскады играют важную роль в поддержании пролиферации и миграции активированных клеток, а также в предотвращении апоптоза. Например, путь MAPK доказанно усиливает продукцию провоспалительных цитокинов и стимулирует активацию звездчатых клеток печени (HSC), усиливая фиброгенез [42].

Smad7 является важным ингибитором в сигнальном каскаде TGF- $\beta$  и играет ключевую роль в контроле процессов фиброгенеза. В норме Smad7 действует как антагонист, предотвращая фосфорилирование Smad2 и Smad3, которые являются основными медиаторами TGF- $\beta$  сигнального пути. Это ограничивает экспрессию генов, связанных с синтезом компонентов ЭЦМ, что снижает риск их избыточного накопления. Кроме того, Smad7 может препятствовать активации миофибробластов и снижать воспаление за счет подавления активности других сигнальных путей, таких как NF- $\kappa$ B. В условиях хронического повреждения печени при РИПП, уровень Smad7 может быть снижен, что приводит к усилению фибротического ответа и прогрессированию заболевания [65; 78].

### **1.7. Радиопротекторные свойства амифостина**

Радиопротекторы представляют собой вещества, которые применяются для защиты организма от повреждений, вызванных ионизирующим излучением. Их разработка и использование направлены на снижение радиационных повреждений в таких сферах, как радиотерапия, космическая медицина и аварийные ситуации, связанные с радиацией [140].

Основная цель радиопротекторов – минимизация вредных эффектов ионизирующего излучения на живые клетки и ткани. Эти вещества могут действовать на разных уровнях, начиная от предотвращения первичных радиохимических реакций и заканчивая усилением естественных защитных механизмов организма. В частности, радиопротекторы могут вмешиваться в процессы радиолиза воды, связывать свободные радикалы, защищать ДНК и

другие макромолекулы от повреждений, а также стимулировать процессы восстановления клеток. Радиопротекторы можно разделить на две основные группы: короткодействующие и длительного действия.

*Короткодействующие радиопротекторы* эффективны при импульсном или краткосрочном воздействии радиации. Их защитный эффект проявляется в течение первых минут после введения и длится от 30 минут до нескольких часов. В этой группе особенно выделяются серосодержащие соединения (например, цистеин и аминотиолы), антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота и токоферол) и вещества, вызывающие гипоксию клеток.

*Радиопротекторы длительного действия* обеспечивают защиту при продолжительном облучении. Их действие может продолжаться от нескольких часов до нескольких дней. К этой категории относятся вещества с анаболическими свойствами, полисахариды и полинуклеотиды.

Современные исследования радиопротекторов направлены на создание новых препаратов, основанных на понимании молекулярных механизмов радиационного повреждения и восстановления, что позволяет разрабатывать более эффективные и безопасные решения для защиты организма.

Одним из наиболее изученных препаратов данной группы является амифостин (Этиол), который доказанно снижает степень радиационно-индуцированного повреждения большинства тканей (например, слюнные железы, почек и костного мозга и др.) при воздействии ионизирующего излучения. Данный препарат представляет собой мощный радиопротектор с комплексным механизмом действия, основанным на антиоксидантной активности, защите ДНК и предотвращении апоптоза, что позволяет использовать его в клинической практике для снижения побочных эффектов радиотерапии и химиотерапии, а также улучшения качества жизни пациентов онкологического профиля. Время полувыведения активной формы амифостина из крови человека составляет 7 часов.

Основные молекулярные эффекты этого препарата заключаются в следующем:

1. Амифостин действует как “ловушка” для гидроксильных радикалов и других АФК, что снижает степень оксидативного стресса и, как следствие, количество повреждений ДНК, липидов и белков [52];

2. Амифостин предотвращает повреждение ДНК путем прямого связывания свободных радикалов и усиления репарационных процессов. Исследования показывают, что он может ингибировать радиационно-индуцированную активацию каспаз, которые запускают апоптоз в ответ на критическое повреждение ДНК [152];

3. Амифостин стимулирует экспрессию эндогенных антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза (SOD) и глутатионпероксидаза. Эти ферменты играют важную роль в детоксикации АФК и защите клеток от окислительного стресса, что дополнительно повышает радиопротективный потенциал препарата [111];

4. Одной из важных особенностей амифостина является его селективное накопление в нормальных тканях. Это связано с более высокой активностью щелочной фосфатазы в нормальных клетках по сравнению с опухолевыми, что приводит к преимущественному преобразованию амифостина в активную форму именно в здоровых тканях. Это обеспечивает защиту нормальных тканей при минимальном воздействии на опухоль [150].

Амифостин давно считается изученным радиопротективным препаратом с доказанной эффективностью. Тем не менее, несмотря на свои преимущества, применение амифостина связано с риском развития нежелательных лекарственных реакций, таких как:

1. Токсичность, которая проявляется тошнотой, рвотой, гипотензией, аллергическими реакциями, а также общей слабостью и головокружением;

2. Защита опухолей от радиационного воздействия при высоком уровне экспрессии щелочной фосфатазы;

3. Препарат вводится внутривенно или подкожно, что требует времени и дополнительного медицинского контроля, значительно сокращая возможность его применения в амбулаторной практике;

4. Узкое терапевтическое окно;
5. Высокая стоимость и необходимость проведения дополнительного мониторинга.

### 1.8. Аскорбиновая кислота

Аскорбиновая кислота – это водорастворимый витамин, который выполняет несколько важных функций в организме. Она играет ключевую роль в поддержании здоровья иммунной системы, синтезе коллагена, заживлении ран, усвоении железа и защите клеток от повреждений, вызванных окислительным стрессом. В форме аскорбата-иона данный субстрат является протектором липидов от перекисного окисления и относится к группе эндогенных антиоксидантов [140].

#### Молекулярные механизмы аскорбиновой кислоты:

*Антиоксидантная активность:* аскорбиновая кислота является мощным антиоксидантом, который нейтрализует свободные радикалы, образующиеся в результате воздействия ионизирующего излучения, способствуя их утилизации из организма в связанном виде. Так, под ее влиянием происходит снижение степени окислительного стресса. Это помогает ограничить радиационно-индуцированные процессы повреждения ДНК, липидов и белков [35; 179];

*Стимуляция синтеза коллагена:* аскорбиновая кислота участвует в гидроксигировании пролина и лизина – ключевых аминокислот в структуре коллагена. Это способствует поддержанию целостности ЭЦМ и способствует ускорению восстановлению тканей после радиационного воздействия [109];

*Поддержка иммунной системы:* аскорбиновая кислота стимулирует активность лейкоцитов, что способствует усилению иммунного ответа и ослаблению радиационно-индуцированной воспалительной реакции [35];

*Стимуляция других антиоксидантов:* аскорбиновая кислота способствует накоплению и активации других эндогенных антиоксидантов, таких как токоферол, поддерживая их активность и усиливая общую защиту клеток от радиации [176].

Кроме того, интересными представляются единичные исследования, демонстрирующие способность аскорбиновой кислоты (в отличие от большинства других антиоксидантов) не только снижать выраженность оксидативного стресса, но и напрямую предотвращать развитие одно- и двучепочечных разрывов/сшивок ДНК, тормозя активацию прямого пути лучевого повреждения посредством связывания ионов меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) [31].

Из общих преимуществ применения аскорбиновой кислоты при различных патологических состояниях можно выделить широкую доступность и низкую стоимость, относительную безопасность и возможность применения в амбулаторных условиях, мультифункциональность (см. выше свойства аскорбиновой кислоты), а также возможность комбинирования данного субстрата с другими антиоксидантами, что потенциально может усилить радиопротективный эффект в здоровых тканях. Кроме того, единичные исследования показывают, что аскорбиновая кислота наиболее эффективна при профилактическом приеме перед воздействием радиации, так как механизм его действия направлен именно на предотвращение развития оксидативного стресса, в то время как лечебные свойства этого субстрата (при постлучевом применении) значительно ограничены [81].

### **1.9. Заключение по литературному обзору**

Учитывая вышесказанное, актуальным представляется как совершенствование методов радиотерапии, так и защиты здоровых тканей от лучевого воздействия. Так, комплексное изучение молекулярных механизмов и потенциальное внедрение электронотерапии в клиническую практику врачей радиобиологов и онкологов потенциально может не только сократить риски ранних и поздних постлучевых осложнений в печени, но и увеличить ожидаемую продолжительность жизни онкологических пациентов с опухолями гепатобилиарной зоны, улучшить качество их жизни и сократить количество рецидивов, при этом не уступая в противоопухолевой активности применяемым на

сегодняшний день видам ионизирующего излучения (X- и  $\gamma$ -лучей). Интересным и актуальным представляется исследование патогенеза как острых, так и хронических постлучевых осложнений, что может послужить основанием для разработки таргетных средств радиопротекции.

Тем не менее, на сегодняшний день любое воздействие радиации способствует развитию повреждения клеток печени и развитию разной степени печеночной недостаточности. Решением проблемы может стать применение радиопротекторов, однако в настоящее время препараты с доказанной эффективностью в отношении здоровых тканей единичны, а их эффекты в организме противоречивы. В связи с этим, высоко актуальным остается поиск и апробация новых средств защиты от радиации, а наиболее перспективными из них считаются антиоксиданты, которые могут не только ограничивать оксидативный стресс путем связывания продуктов радиолиза воды, но и, в некоторых случаях, стимулировать эндогенные системы протекции и репарации.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Диссертационное исследование выполняли в лаборатории гистологии и иммуногистохимии Центра доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет) и лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии Отдела патоморфологии Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба – филиала федерального государственного бюджетного учреждения «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

### 2.1. Дизайн эксперимента

Самцы крыс породы Вистар (*Rattus Wistar*;  $n=180$ ) в возрасте 9 – 10 недель, весом  $220\pm 20$  грамм были поделены на группы в соответствии с дизайном эксперимента:

- I группа ( $n=20$ ) – контрольная; животным интраперитонеально вводили 0,9 % раствор NaCl;

- II группа ( $n=40$ ) – опытная; животных локально облучали электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в фракциях по 5 Гр);

- III группа ( $n=40$ ) – опытная; животным за 1 час до каждой фракции интраперитонеально вводили аскорбиновую кислоту (АК) в дозе 50 мг/кг, локальное облучение электронами проводили в фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в фракциях по 5 Гр);

- IV группа (n=40) – опытная; животным за 30 минут до каждой фракции интраперитонеально вводили амифостин в дозе 150 мг/кг, локальное облучение электронами проводили в фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр (в фракциях по 5 Гр);

- V группа (n=20) – опытная; животным интраперитонеально вводили аскорбиновую кислоту в дозе 50 мг/кг;

- VI группа (n=20) – животным за 30 минут до каждой фракции интраперитонеально вводили амифостин в дозе 150 мг/кг.

Схематично дизайн эксперимента изображен на Рисунке 2.1.

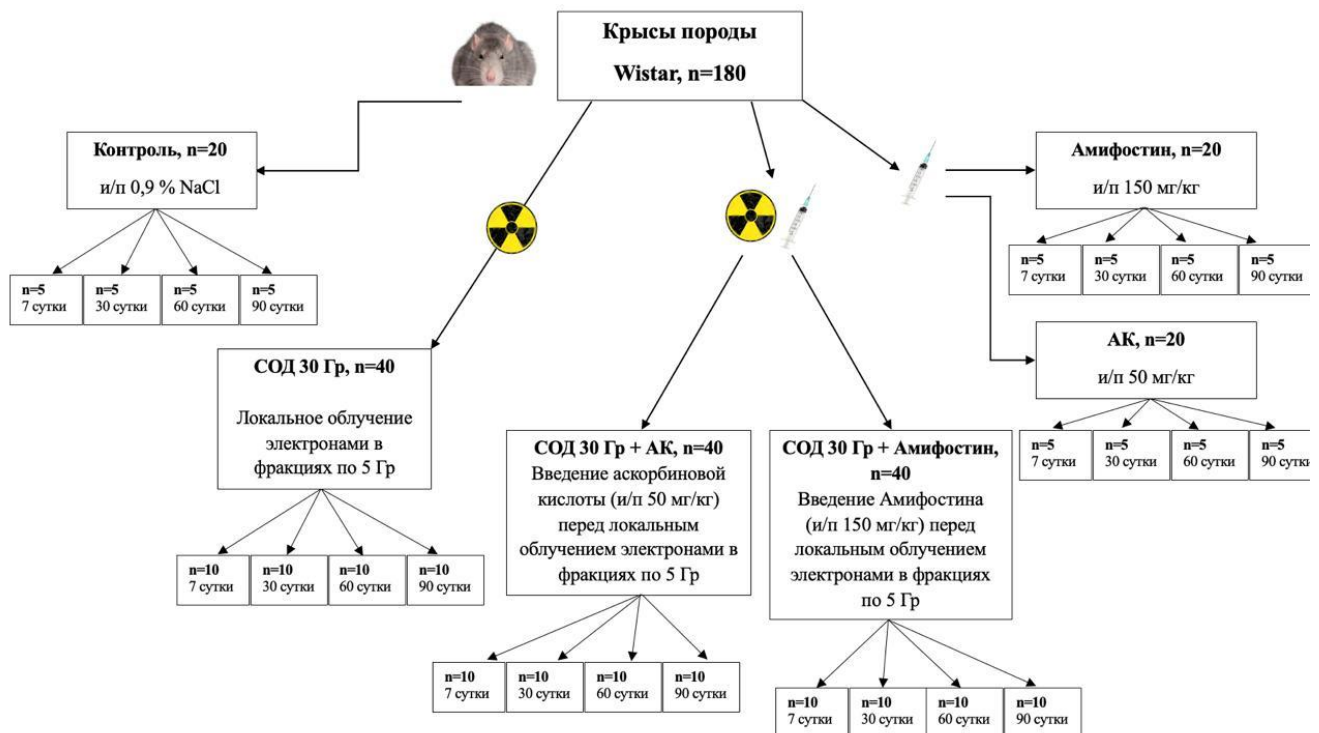


Рисунок 2.1 – Дизайн эксперимента

Согласно дизайну эксперимента и установленных стандартов по проведению доклинических исследований<sup>1</sup>, сроки выведения животных из всех групп

<sup>1</sup> -Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

- Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 26 ноября 2019 г. № 202 «Об утверждении Руководства по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов».

проводились на 7-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки после последней фракции. При этом в раннем периоде (7 сутки и 1 месяц) проводили оценку острых эффектов воздействия электронами и эффективности радиопротекторов, на 2 и 3 месяца исследовали отсроченные эффекты (поздние).

Животные устранялись из эксперимента с помощью введения сочетания высоких доз анестетиков: кетамина (Supriya Lifescience, Патнагири, Индия) в дозе 50 мг/кг внутримышечно и ксилазина (Alivira Animal Health, Хайдарабад, Индия) в дозе 5 мг/кг интраперитонеально.

### Соответствие этическим правилам и нормам

Содержание животных и проведение болезненных манипуляций осуществляли в соответствии с правилами, указанными в современных отечественных и международных рекомендациях: ARRIVE guidelines, «Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, Приказ №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Приказ №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На проведение исследования получено разрешение Локального этического комитета

---

- Руководство по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения. Приложение к Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21.05.2020 № 10.

- Хабриев РУ, ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: Медицина; 2005.

медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба (протокол №25 от 10.11.23).

При содержании животных соблюдали адекватные условия: температура воздуха 23°C, влажность воздуха 40–60%, рацион питания – стандартный, вода по потребности. Для гнездования использовали пластмассовые клетки-контейнеры, заполненные абсорбирующим материалом.

Объект исследования – печень. Первичную оценку проводили макроскопически для выявления возможного опухолевого процесса.

### Моделирование радиационно-индуцированного поражение печени

Для изучения и моделирования радиационно-индуцированного поражения печени было выбрано локальное облучение электронами в режиме фракционирования. Выбор зоны ионизирующего воздействия основан на собственном опыте и утвержденных стандартах по проведению доклинических исследований с учетом анатомических ориентиров. Выбор режима и суммарной очаговой дозы (СОД) облучения электронами обусловлен результатами обзора источников в современной научной литературе по выбранной теме, а также режимами радиотерапии, рекомендованными для лечения и / или паллиативной терапии при злокачественных новообразованиях гепатобилиарной зоны.

Для настоящего исследования было выбрано проведение локального облучения электронами в СОД 30 Гр фракциями по 5 Гр в области брюшного сегмента. Облучение проводили в отделе радиационной биофизики Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба (г. Обнинск, Россия) на импульсном ускорителе электронов «NOVAC-11» (S.I.T. Sordina IORT Technologies S.P.A., Италия).

После размещения животных на предметном столе, тубус линейного ускорителя электронов, диаметром 60 мм, подводили непосредственно к поверхности кожи (с предварительным бритьем шерстяного покрова) под углом

90° в области проекции печени; область грудной клетки были экранированы свинцовыми пластинами. Заданные параметры: энергия пучка электронов – 10 МэВ, частота бенчей – 9 Гц, мощность – 1 Гр/мин. Для седации во время облучения однократно применяли комбинацию кетамина и ксилазина внутримышечно и интраперитонеально, соответственно (Рисунок 2.2).



Рисунок 2.2 – Импульсный ускоритель электронов «NOVAC-11» (S.I.T. Sordina IORT Technologies S.P.A., Италия) и размещение животных на предметном столе в распорках на «салазках»

### Лекарственные препараты

В качестве субстрата, обладающего радиопротекторной активностью, была выбрана аскорбиновая кислота в дозе 50 мг/кг в форме интраперитонеальных инъекций за 1 час до воздействия электронами. Режим дозирования аскорбиновой

кислоты был выбран исходя из необходимости инъекции перед каждым сеансом фракционного облучения ввиду быстрого периода полувыведения аскорбиновой кислоты при разовом введении ( $T_{1/2} - 1,87 \pm 0,4$  ч).

Доза выбиралась исходя из официальной инструкции к препарату – взрослым пациентам профилактическая доза АК составляет в интервале 100 – 500 мг/сутки. Был выполнен пересчет дозы на единицу массы тела среднестатистического взрослого человека весом 60 кг, затем с помощью таблицы переноса доз для животных (Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry. Rockville: Food and Drug Administration, 2005 г.) выполнен пересчет путем умножения полученного значения на коэффициент перевода для мышей (12,3) и получен диапазон доз для животных от 20,5 мг/кг до 102,5 мг/кг. В пилотном исследовании было обнаружено, что наиболее эффективной дозой аскорбиновой кислоты является разовая доза 50 мг/кг, животные этой группы демонстрировали минимальные побочные эффекты и наилучшие показатели репарации печени.

В качестве препарата сравнения был выбран Амифостин (WR-2721; AMI) (500 мг) в форме сухого белого порошка, действие которого доказано во многих исследованиях при радиационном поражении. Была выбрана средняя терапевтическая доза, наиболее часто используемая в экспериментах на крысах – 150 мг/кг. Для этого амифостин растворяли в фосфатно-буферном растворе (PBS, Invitrogen Life Technologies) при комнатной температуре и вводили интраперитонеально в концентрации 150 мг/кг за 30 минут до каждой фракции (время, необходимое для всасывания и накопления минимальной эффективной концентрации в крови).

## 2.2. Методы исследования

В настоящей работе на молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом и органном уровнях проведен комплексный анализ проявлений радиационно-

индуцированной болезни печени и способов их коррекции введением радиопротекторных субстратов – амифостина и аскорбиновой кислоты. Для этой цели были использованы следующие методы:

- Биохимический и иммуноферментный анализ крови – АЛТ, АСТ, щелочная фосфатаза и общий билирубин, а также на ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, TNF- $\alpha$ ;
- Иммуноферментный анализ гомогената печени на маркеры редокс-системы и воспалительной реакции – на уровни малонового диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD), анализ на содержание цитокинов – ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10;
- Молекулярно-генетический – экспрессия генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3*;
- Гистологический;
- Морфометрический;
- Гистохимический – окраска трихромом по Массону;
- Иммуногистохимический (с оценкой маркеров жизненного цикла и воспалительной реакции) – Ki67, *Caspase 3*;
- Иммунофлуоресцентный – фрагментации ДНК и гибели клеток (Tunel-метод);
- Статистический.

В течение всего эксперимента животных взвешивали, оценивали поведенческие реакции, состояние слизистых оболочек и кожи, измеряли базальную температуру тела *per rectum* при помощи термометра (Braun, Kronberg, Germany).

Отсроченные эффекты воздействия электронами оценивали макроскопически при помощи общепринятой шкалы оценки поздних осложнений облучения (RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme [49]) в таблице 2.1. Затем, обнаруженные изменения после локального воздействия электронами переводили в баллы, ранжируя экспериментальных животных по степени повреждения (от 1 до 4).

Таблица 2.1 – Оценка по RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme

Баллы	Критерии
0 баллов	Нет изменений
1 балл	Потеря веса менее 5%, нечастая рвота/диаррея, не оказывающая влияния на поведение
2 балла	Потеря веса от 5 до 15%, рвота/диаррея, оказывающая влияние на поведение в виде астенизации
3 балла	Потеря веса более 15%, рвота/диаррея с прожилками крови, приводящая к астенизации
4 балла	Смерть животного

### 2.2.1. Биохимический и иммуноферментный анализы крови

При биохимическом анализе крови у экспериментальных животных всех групп определяли уровни аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и общего билирубина при помощи биохимического анализатора (7080 type, Hitachi, Tokyo, Japan).

Уровни провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 (Bender MedSystems, Вена, Австрия), TNF- $\alpha$  (Assaypro, Сент-Чарльз, США), а также противовоспалительного ИЛ-10 (Abcam, Бранфорд, США) измеряли в сыворотке крови с использованием коммерческих наборов ELISA-kit (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкциями производителя.

### 2.2.2. Иммуноферментный анализ гомогената печени

Для количественной оценки оксидантного/антиоксидантного соотношения фрагменты печени животных всех групп гомогенизировали и центрифугировали в течение 5 минут при 1000 g на ледяной бане с целью получения 10% гомогената. Гомогенат повторно центрифугировали, после чего был произведен забор супернатанта для дальнейшего анализа. Уровни малонового диальдегида (MDA) и супероксиддисмутазы (SOD) оценивали при помощи иммуноферментного анализа (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) в соответствии с требованиями набора ELISA kit (Lifespan Biosciences, USA).

Помимо этого, для иммуноферментной количественной оценки воспалительной реакции готовили гомогенат в условиях охлаждающей водяной бани, с последующим центрифугированием со скоростью 3000 об/мин в течение 10 минут, после чего проводили забор супернатанта. Количественный анализ уровней провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6) и противовоспалительного ИЛ-10 в тканях печени проводили с использованием коммерческих наборов ELISA-kit (Cloud-Clone Corp., США) в соответствии с инструкцией производителя.

### 2.2.3. Молекулярно-генетическое исследование

Молекулярно-генетическое исследование заключалось в оценке уровней экспрессии генов *Bax*, *Bcl-2*, и *Caspase 3* в гомогенате печени при помощи количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ, RT-qPCR). Для этой цели общая РНК была извлечена из образцов печени с использованием реагента TRIzol (Invitrogen), а синтез кДНК был выполнен с использованием наборов для транскрипции РНК от Promega Corporation (Мэдисон, США). Конкретные пары праймеров (с температурой плавления 60°C) для генов *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase-3* перечислены в Таблице 2.2.

При ПЦР-РВ каждый образец анализировали трехкратно для обеспечения точности и воспроизводимости. В реакциях использовались вода, обработанная DEPC, 2X Tap, PCR Mix и ДНК-маркеры от Promega Corporation (Мадисон, Висконсин, США). Условия амплификации основывались на рекомендациях производителя и были оптимизированы в соответствии со спецификацией праймеров и экспериментальными требованиями.

Таблица 2.2 – Последовательности праймеров для проведения РТ-ПЦР генов *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase-3*

Ген	Последовательности праймеров
<i>Bax</i>	F-ATGGAGCTGCAGAGGATGATT R-TGAAGTTGCCATCAGCAAACA
<i>Bcl-2</i>	F-TGGGATGCCTTTGTGGAAC R-TCTTCAGAGACTGCCAGGAGAAA
<i>Caspase-3</i>	F-AATTCAAGGGACGGGTCATG R-GCTTGTGCGCGTACAGTTTC

#### 2.2.4. Гистологическое исследование

Гистологические препараты готовились по стандартной методике (Рисунок 2.3).

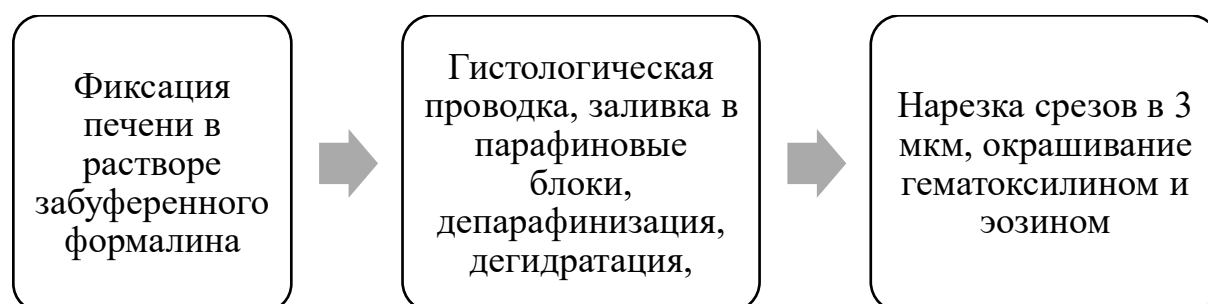


Рисунок 2.3 – Схема гистологической техники

Полученные микропрепараты изучали под микроскопом Leica DM2000 с выполнением микрофотосъемки. Для оценки степени острого повреждения печени использовали установленные гистологические критерии активности гепатита, полученные результаты переводили в баллы [64] (Таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Шкала морфологических изменений печени – МИП (по Knodell с изм.)

I.	Перипортальный ± мостовидный некроз	Балл	II.	Дистрофия, атрофия, некроз гепатоцитов	Балл	III.	Инфильтрация портальных трактов	Балл	IV.	Фиброз	Балл
A.	нет	0	A.	нет	0	A.	нет портального воспаления	0	A.	нет	0
B.	слабый некроз	1	B.	слабая (ацидофильные тельца, балонная дистрофия, фокальные некрозы гепатоцитов менее чем в 1/3 печеночных долек)	1	B.	слабая (распределение воспалительных клеток менее чем в 1/3 портальных трактов)	1	B.	перипортальный фиброз	1
C.	умеренный некроз менее 50 % окружности портальных трактов	3	C.	умеренная (затрагивает от 1/3 до 2/3 печеночных долек)	3	C.	умеренная (увеличение количества воспалительных клеток в 1/3 – 2/3 доле портальных трактов)	3	C.	мостовидный фиброз (портально-портальный или портально-центральный)	3
D.	значительный некроз более чем 50 % окружности портальных трактов	4	D.	выраженная (более 2/3 печеночных долек)	4	D.	выраженная (плотная воспалительная инфильтрация более чем в 2/3 портальных трактов)	4	D.	цирроз	4
E.	умеренный некроз + мостовидный некроз	5									
F.	значительный некроз + мостовидный некроз	6									
G.	мультилобулярный некроз	10									

### **2.2.5. Морфометрическое исследование**

Морфометрический анализ проводили в 10-ти случайно выбранных полях зрения микроскопа при увеличениях на  $\times 200$  и  $\times 400$  с использованием анализатора изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 и компьютерной программы Image J., а также для флуоресцентного микрофотографирования – QuPath-0.5.1 при совмещении с KFSlideOS. При этом, рассчитывали следующие параметры: средний диаметр гепатоцита (в мкм), средний диаметр центральной вены (в мкм), количество клеток Купфера (в 1 мм<sup>2</sup>). Полученные результаты переводили в относительные баллы от 0 до 5.

### **2.2.6. Гистохимическое исследование**

На одном препарате из каждой группы проводили гистохимические реакции для оценки состояния соединительнотканного компонента печени. Для этого использовали окраску трихромом по Массону, при котором коллагеновые волокна окрашивались анилиновым синим – в темно-синий цвет. Морфометрическую оценку микропрепаратов, окрашенных по Массону, исследовали с использованием анализатора изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 и компьютерной программы Image J. Затем полученные данные переводили в баллы, учитывая площадь и оптическую плотность (хромогенность) в относительных единицах: «1» – слабое (0–0,3); «2» – умеренное (0,3–0,6); «3» – выраженное (>0,6).

### **2.2.7. Иммуногистохимическое исследование**

Для оценки пролиферации и апоптоза прежде всего гепатоцитов проводили иммуногистохимическое исследование в ручном режиме после депарафинизации срезов печени и с последующей демаскировкой в 10мМ растворе цитратного

буфера,  $\text{pH} \approx 6,0$ ). Далее реакции ставили согласно рекомендациям производителя антител (Рисунок 2.4), включая следующие шаги (на каждом этапе срезы промывали раствором PBS,  $\text{pH} \approx 7,4$ ):

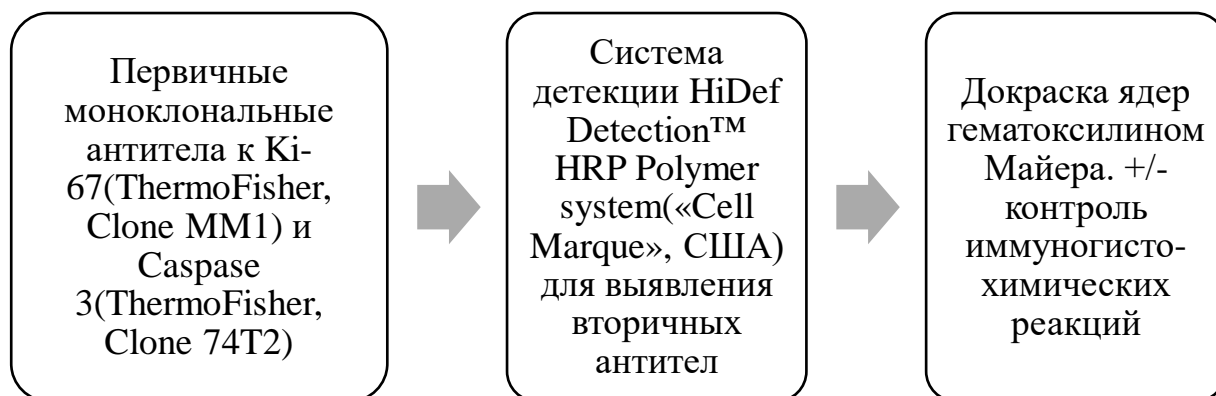


Рисунок 2.4 – Этапы иммуногистохимического исследования

Количество иммунопозитивных клеток подсчитывали в 10 случайных полях зрения светового микроскопа Leica DM2000 с микрофотосъемкой, при увеличении  $\times 400$  (в %).

### 2.2.8. Исследование фрагментации ДНК и гибели клеток

Для детекции локусов фрагментации ДНК (разрывы) прежде всего в гепатоцитах использован TUNEL метод – обнаружение терминальной дезоксирибонуклеотидил трансферазы (TdT)-опосредованным мечением X-деоксиуридин трифосфат нуклеотидов (X-dUTP) в местах 3'-ОН концевых разрывов цепи ДНК.

Шаги:

- а) фиксация срезов печени в 4% растворе параформальдегида и фосфатно-буферном растворе (PBS) на 15 – 20 минут при  $20^{\circ}\text{C}$ ;
- б) обработка раствором протеиназы К с концентрацией 20 мкг/мл;
- в) инкубация в течение 10 минут при комнатной температуре;

- г) отмывка предметных стекол в PBS на 5 минут при комнатной температуре;
- д) добавление 50 мкл окрашивающего раствора TdT (ThermoFisher, США) и инкубация в течение 60 минут при 37°C с последующей промывкой в PBS;
- е) докрасивание ядер DAPI (ThermoFisher, США).

Интенсивность сигналов изучали в флуоресцентном микроскопе набором фильтров FITC (зеленое свечение).

### **2.2.9. Мультиплексная иммунофлуоресцентная микроскопия**

Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с иммунофлуоресцентным окрашиванием было выполнено (на базе Научно-образовательного ресурсного центра «Инновационные технологии иммунофенотипирования, цифрового пространственного профилирования и ультраструктурного анализа», директор – д.м.н., доц. Д.А. Атякшин) с помощью набора Opal (Akoya Biosciences, Marlborough, MA) для флуоресцентной микроскопии в соответствии с протоколом производителя.

После депарафинизации, регидратации проводилось извлечение антигена при Tris-EDTA pH9.0 в микроволновой печи в течение 15 минут. Затем было выполнено блокирование эндогенной пероксидазы.

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к Alpha-Smooth Muscle Actin (Thermo Fisher Scientific; 53-9760-82, 1:500), а затем с полимером HRP Ms + Rb в течение 10 минут, после чего инкубацию проводили с фторофором Opal480 также в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были разрушены с помощью повторного кипячения в микроволновой печи при Tris-EDTA pH9.0 (см. описание выше).

Второй цикл окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций с антителами к TGF-beta 1 (Abcam; EPR21143, 1:500), инкубацией с полимером HRP

Ms + Rb в течение 10 минут, а затем инкубацией с фторофором Opal690 в течение 10 минут. Кроме того, образцы ткани были окрашены DAPI в течение 5 минут и установлены в ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Визуализация. Автоматизированная система количественной патологии Vectra Polaris (Akoya Biosciences) использовалась для многоспектральной визуализации при 20-кратном увеличении. После этого целые изображения слайдов были загружены в программное обеспечение для анализа изображений InForm (Akoya Bioscience).

#### **2.2.10. Статистические методы**

Полученные в результате подсчёта данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12 for Windows (IBM Analytics, США). Данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка (SD). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. При сравнении исследуемых групп при распределении, отличном от нормального, применяли критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна. Парные сравнения проводили при помощи U-теста Манна-Уитни. Значение  $p \leq 0,05$  считали статистически значимым.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Макроскопическая оценка

Масса тела, поведенческие реакции, состояние кожи и слизистых оболочек, а также базальная температура тела животных опытных групп практически не отличались от показателей контрольной группы. Тем не менее, на третьем месяце эксперимента обнаружили незначительное увеличение массы тела контрольных и опытных животных (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Масса тела и возраст животных через 7 суток и через 3 месяца в контрольной и опытных группах

Группа	n	7-е сутки		3-й месяц	
		возраст, в неделях	вес, в граммах	возраст, в неделях	вес, в граммах
<b>Контроль</b>	20	9–10	220±20	20–21	368±23
<b>СОД 30 Гр</b>	40	9–10	213±18	20–21	361±20
<b>СОД 30 Гр + АК</b>	40	9–10	228±21	20–21	377±22
<b>СОД 30 Гр + Амифостин</b>	40	9–10	216±19	20–21	354±17
<b>АК</b>	20	9–10	222±20	20–21	365±21
<b>Амифостин</b>	20	9–10	221±21	20–21	364±20

Макроскопический анализ печени на третьем месяце эксперимента проводили в соответствии с установленной схемой оценки постлучевых осложнений (RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme). Воздействие электронами в суммарной дозе 30 Гр в большинстве случаев (60 %) привело к развитию частичной рвоты, слабости и признаков диспепсии умеренной степени выраженности, а также к потере веса, в связи с чем животным было выставлено 2 балла по RTOG/EORTC. В большинстве случаев в группах введения аскорбиновой кислоты (70 %) и амифостина (65 %) перед облучением электронами в суммарной дозе 30 Гр преобладала оценка в 1 балл по RTOG/EORTC, что связано с незначительной потерей веса без признаков диспепсии. Результаты оценки групп

V и VI не отличались от таковых в контроле (0 баллов по RTOG/EORTC) (Таблица 3.2). Следует отметить, что в течение всего эксперимента ни одно животное не погибло (4 балла по RTOG/EORTC), а также не отмечали развития признаков тяжелой печеночной недостаточности (3 балла по RTOG/EORTC).

Таблица 3.2 – Визуальная оценка печени животных в соответствии с балльной шкалой RTOG/EORTC late radiation morbidity scoring scheme

Группа	n	RTOG/EORTC	
		балл	%
<b>Контроль</b>	20	0	100 %
<b>СОД 30 Гр</b>	40	1–2	1 балл – 40 %; 2 балла – 60 %
<b>СОД 30 Гр + АК</b>	40	0–1	0 баллов – 30 %; 1 балл – 70 %
<b>СОД 30 Гр + Амифостин</b>	40	0–1	0 баллов – 35 %; 1 балл – 65 %
<b>АК</b>	20	0	100 %
<b>Амифостин</b>	20	0	100 %

### 3.2. Биохимический анализ крови

Биохимическое исследование крови животных, фракционно облученных электронами в СОД 30 Гр, на 7-е сутки демонстрировало повышение уровней АЛТ (в 2,4 раза), АСТ (на 20,9 %), щелочной фосфатазы (в 2,8 раза) и общего билирубина (на 60,2 %) по сравнению с контрольной группой. В течение эксперимента в этой группе отмечали тенденцию к неуклонному увеличению изучаемых показателей, а к окончанию эксперимента (90-е сутки) уровень АЛТ был повышен в 3,49 раза, АСТ – на 38,3 %, щелочной фосфатазы – в 3,4 раза, общего билирубина – на 88,4 %, по сравнению с контролем. Следует отметить, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина в те же сроки демонстрировало значения, близкие к контрольной группе, без значительной тенденции к их увеличению. При этом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты оказалось более эффективным

по сравнению с амифостином на основании более низких уровней АЛТ – на 39 % и 18,9 % на 7-е и 90-е сутки, соответственно (Рисунок 3.1).

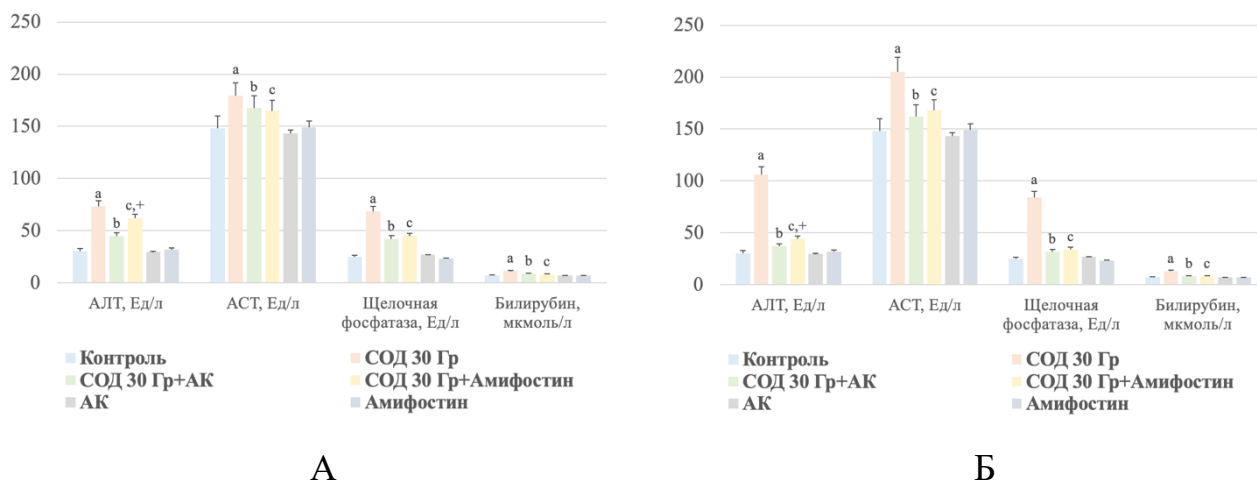


Рисунок 3.1 – Биохимический анализ крови в контрольной и опытных группах. Уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы и общего билирубина на 7-е (А) и 90-е (Б) сутки эксперимента, график. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» и «контроль»; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр+АК» и «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр+Амифостин» и «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр+Амифостин» и «СОД 30 Гр+АК»;  $p < 0,05$ . СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота.

### 3.3. Оценка маркеров редокс-системы

В гомогенизированной ткани печени при помощи анализа ELISA через неделю после локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр отмечали увеличение уровня MDA (маркера перекисного окисления липидов) в 2,4 раза и снижение уровня SOD (фермент эндогенной антиоксидантной защиты) в 2,6 раза по сравнению с контролем. В течение эксперимента наблюдали тенденцию к незначительному восстановлению баланса этих маркеров. Менее выраженные изменения выявлены в группе предлучевой инъекции аскорбиновой кислоты: увеличение MDA в 1,6 раза и снижение SOD в 1,4 раза по сравнению с результатами контрольной группы. В III-ей (предлучевое введение аскорбиновой

кислоты) и IV-ой (предлучевое введение амифостина) группах уровни SOD и MDA были равны контрольным. На 90-е сутки показатели всех опытных групп (за исключением группы локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр) не отличались от контроля (Рисунок 3.2). Причем предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к более быстрому восстановлению этих показателей до контрольных значений по сравнению с амифостин.

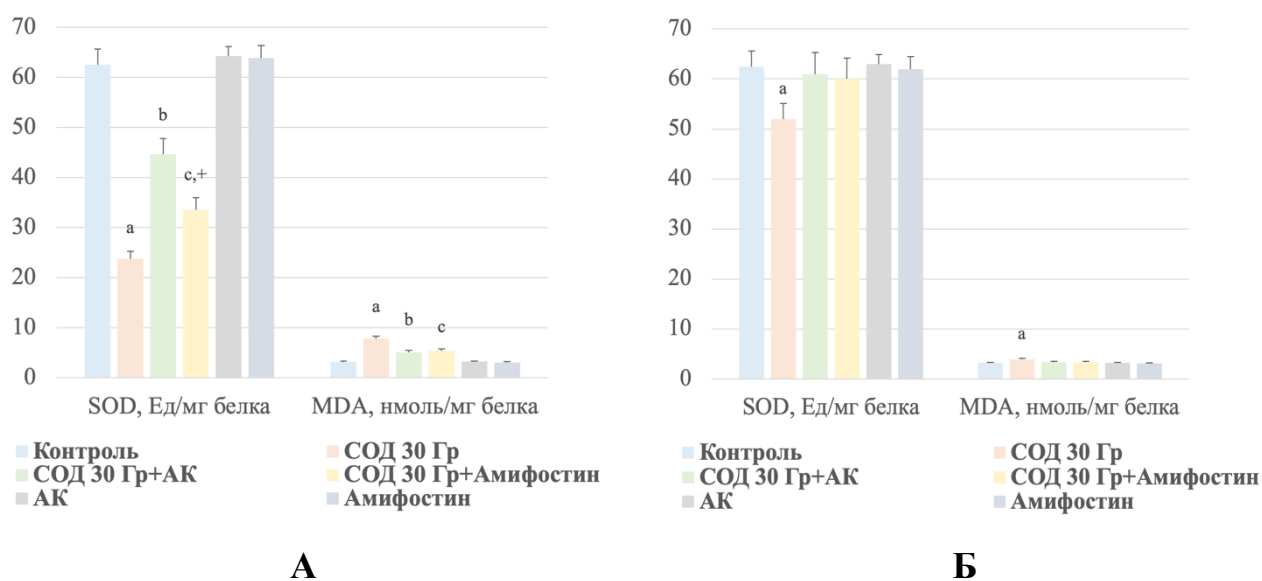


Рисунок 3.2 – Иммуноферментный анализ гомогената печени контрольной и опытных групп. Уровни эндогенного антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы (SOD) и маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида (MDA) на 7-е (А) и 90-е (Б) сутки эксперимента, график. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» и «контроль»; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр+АК» и «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр+Амифостин» и «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр+Амифостин» и «СОД 30 Гр+АК»;  $p < 0,05$ . СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота.

### 3.4. Гистологическое исследование и морфометрический анализ

В контрольной группе отмечали нормальную гистоархитектонику печени (Рисунок 3.3). Снаружи печень покрыта плотной соединительнотканной капсулой. Септы (соединительнотканые перегородки) формируют долики (дольчатое

строение печени), в виде шестигранной призмы, в ее вершинах располагались триады структур (междольковые артерия и вена (портальной системы) и желчный проток). В центре каждой дольки расположена крупная центральная вена, от которой радиально отходят двурядные печеночные балки. Формирующие их гепатоциты имеют полигональную форму и центрально расположенное крупное ядро. Между печеночными балками наблюдали единичные клетки Купфера, проникающие своими отростками в просвет синусоидных гемокапилляров, а между двумя рядами гепатоцитов узкие щелевидные пространства – желчные капилляры. Оценка по шкале МИП составила 0 баллов. Аналогичную морфологическую картину наблюдали в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронов (V-я и VI-я группы). На всех сроках эксперимента (на 1-м, 2-м и 3-м месяцах) в печени контрольной группы, а также после введения аскорбиновой кислоты и амифостина не отмечали каких-либо морфологических изменений (Рисунок 3.6, Рисунок 3.7).

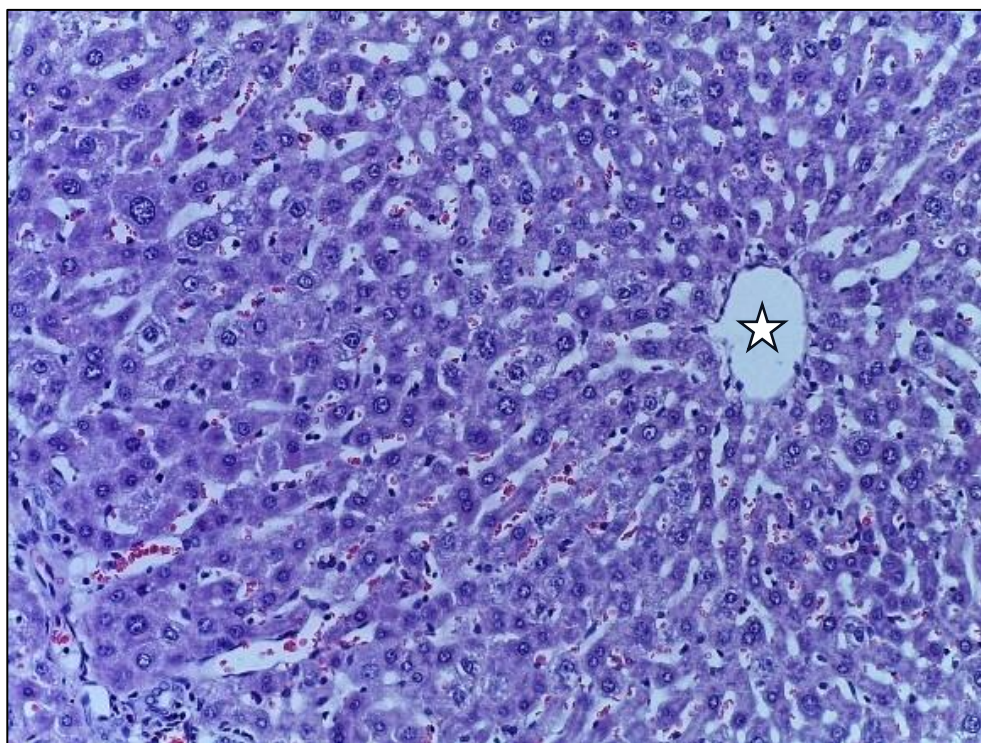


Рисунок 3.3 – Фрагмент печени контрольной группы на 7 сутки. Окрашивание гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 200$ . Звездочкой показана центральная вена

При гистологическом исследовании в группе фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр уже через неделю в печени наблюдали мелкие кисты; баллонную дистрофию большинства гепатоцитов (вакуолизацию цитоплазмы и пикноз ядер), преимущественно в зоне III печеночного ацинуса, который представляет собой участок паренхимы, образованный сегментами двух рядом расположенных классических долек; фокальную атрофию 1/3 – 2/3 части печеночных долек; умеренный частичный некроз (менее 50% окружности большинства портальных трактов); клеточную воспалительную инфильтрацию 1/3 – 2/3 части портальных трактов (в т. ч. мононуклеарными клетками); фиброз отсутствовал (по шкале МИП, в среднем, 9 баллов). Кроме того, обнаружили расширение и застойные явления в синусоидных гемокапиллярах, перисинусоидальные кровоизлияния, а также гиперплазию стенки желчных протоков (Рисунок 3.4). При морфометрическом анализе печени через неделю после фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр обнаружили резкое снижение объемной плотности (уменьшение количества гепатоцитов на единицу объема) и диаметра гепатоцитов, что сопровождалось расширением диаметра центральной вены (в 4,3 раз) и гиперплазией клеток Купфера по сравнению с контрольными значениями (Рисунок 3.6).

Обнаруженные изменения сохранялись на протяжении всего эксперимента вплоть до третьего месяца, когда наблюдали умеренное разрастание волокнистого компонента, фокальную атрофию 1/6 части печеночных долек, единичные мононуклеарные воспалительные клетки. Местами отмечали расширение синусоидов, утолщение стенки желчных протоков. Данные изменения были определены как признаки развивающегося радиационно-индуцированного фиброза печени (Рисунок 3.7).

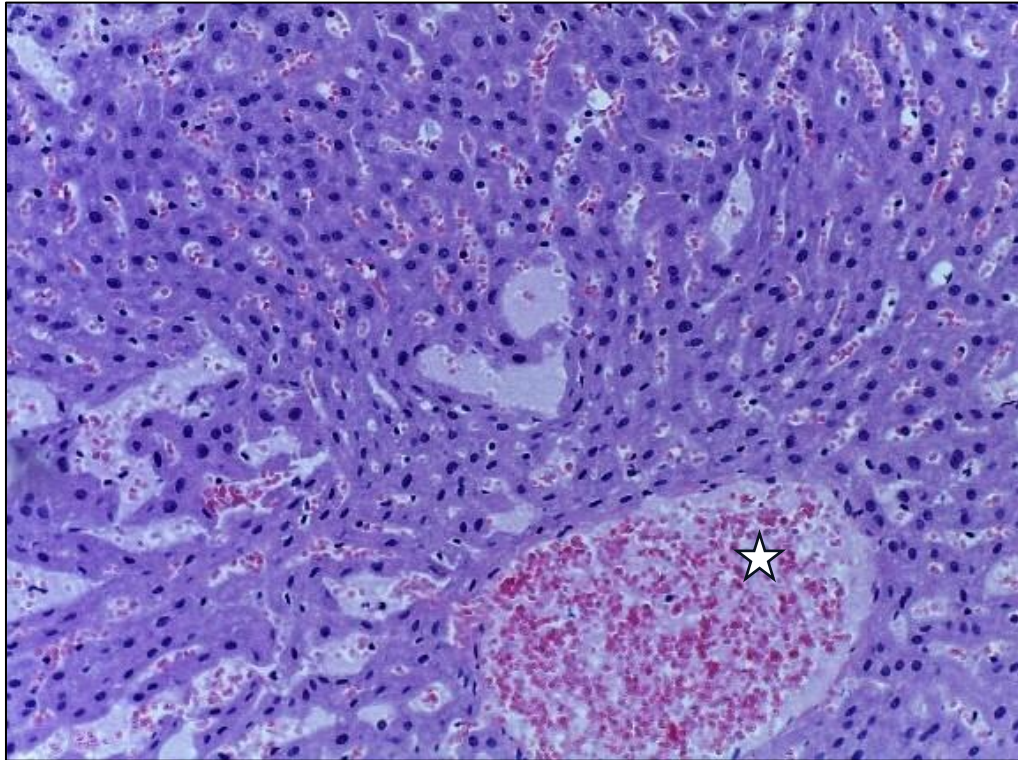


Рисунок 3.4 – Фрагмент печени на 7 сутки после локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Окраска гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 200$ . Звездочкой обозначена центральная вена

Менее значимые изменения ключевых (изучаемых) параметров морфометрического анализа отмечены в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина. В печени животных III-ей группы наблюдали: фокальную атрофию и вакуолизацию цитоплазмы некоторых гепатоцитов (менее чем в 1/3 части печеночных долек), воспалительный инфильтрат занимал менее 1/3 части портальных трактов, фиброз отсутствовал (по шкале МИП, в среднем, 4 балла) (Рисунок 3.5). При морфометрическом анализе отмечали менее выраженное снижение объемной плотности и диаметра гепатоцитов, а также незначительное увеличение диаметра центральной вены (в 2,3 раз) и количества клеток Купфера по сравнению с контрольными значениями и показателями группы локального облучения электронами (Рисунок 3.6). Практически аналогичный морфологический паттерн наблюдали в группе предлучевого введения амифостина.

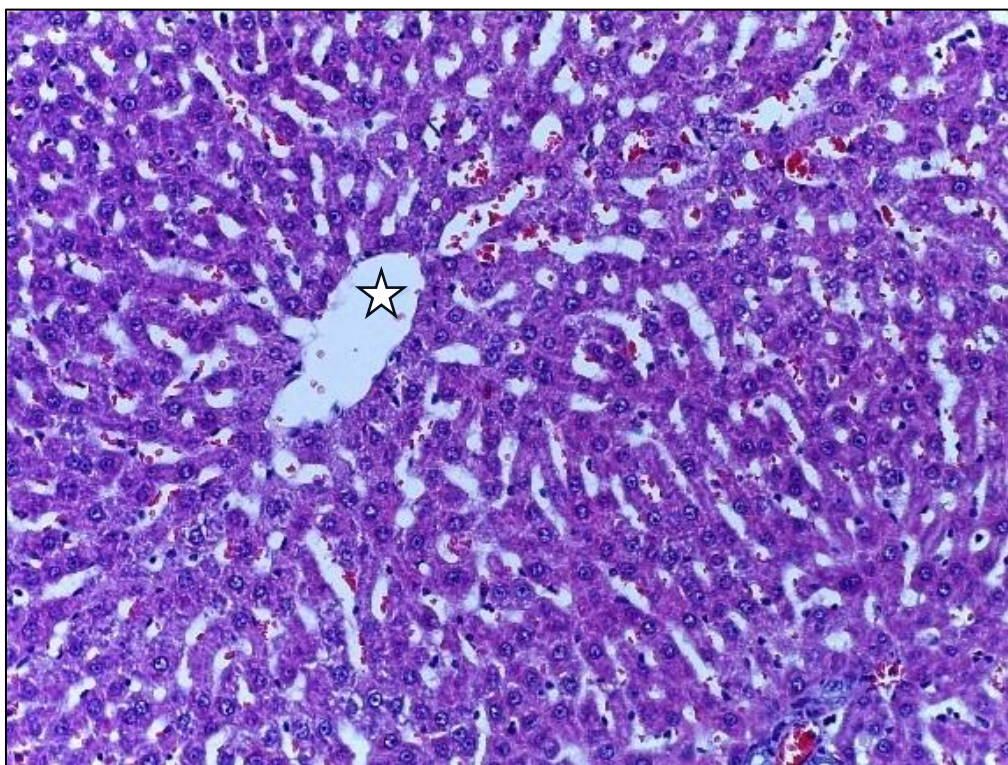


Рисунок 3.5 – Фрагмент печени на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Окрашивание гематоксилином и эозином, увелич.  $\times 200$ . Звездочкой показана центральная вена

В группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина на протяжении всего эксперимента отмечали выраженную тенденцию к восстановлению исследуемых показателей, что подтверждено результатами гистологического и морфометрического исследований, а на третьем месяце в этих группах практически не обнаружили разрастания волокнистого компонента печени, а фокальную атрофию гепатоцитов обнаруживали лишь в единичных образцах; воспалительные клетки отсутствовали. Однако, следует отметить, что данные показатели уже на втором месяце эксперимента были практически равны контрольным значениям при использовании аскорбиновой кислоты, в то время как восстановление гистоархитектоники печени при введении амифостина занимало более длительное время (Рисунок 3.7).

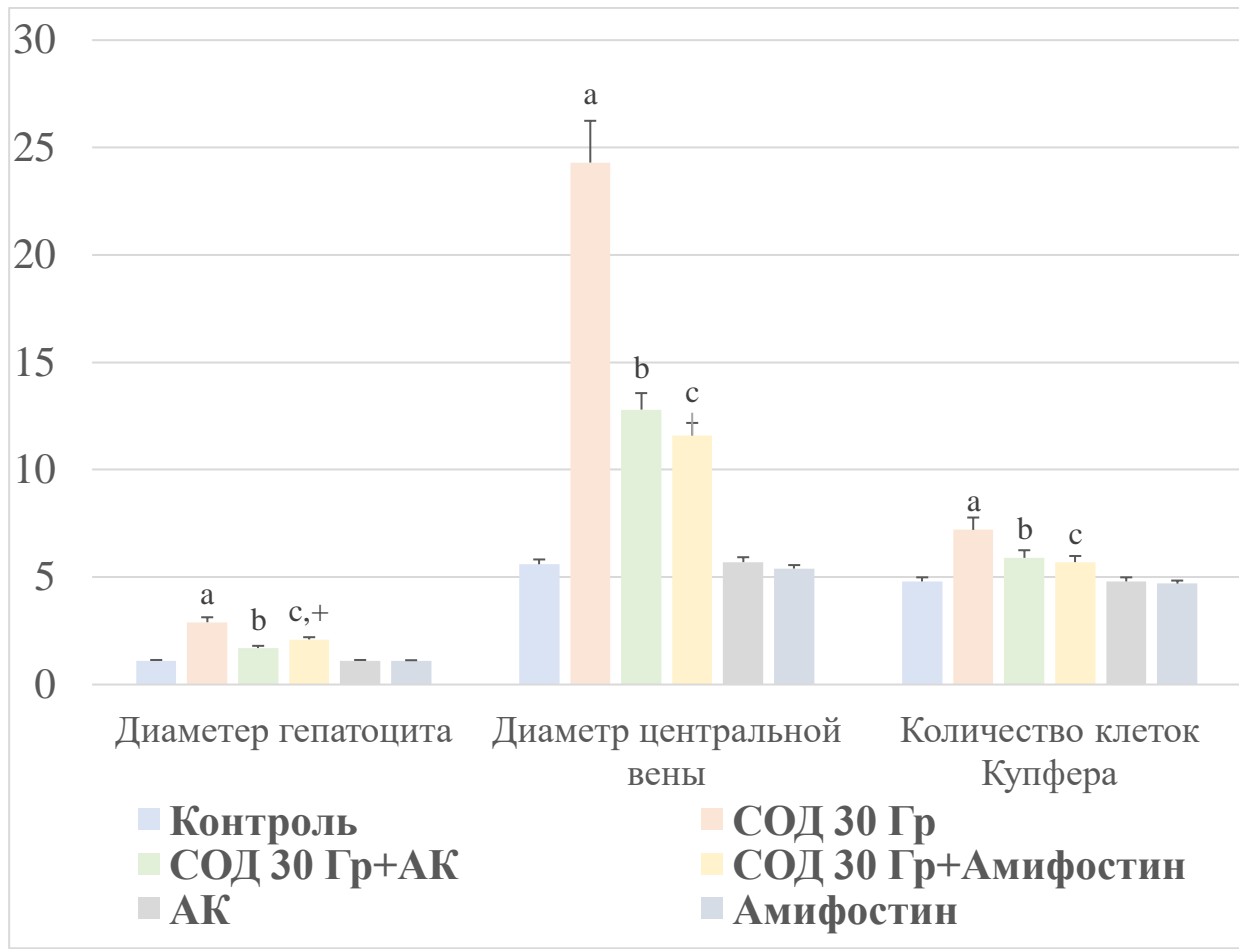


Рисунок 3.6 – Морфометрический анализ диаметра гепатоцитов и центральной вены (в мкм), а также количества клеток Купфера (в 1 мм<sup>2</sup>) в микропрепаратах печени контрольной и опытных групп на 7-е сутки эксперимента. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

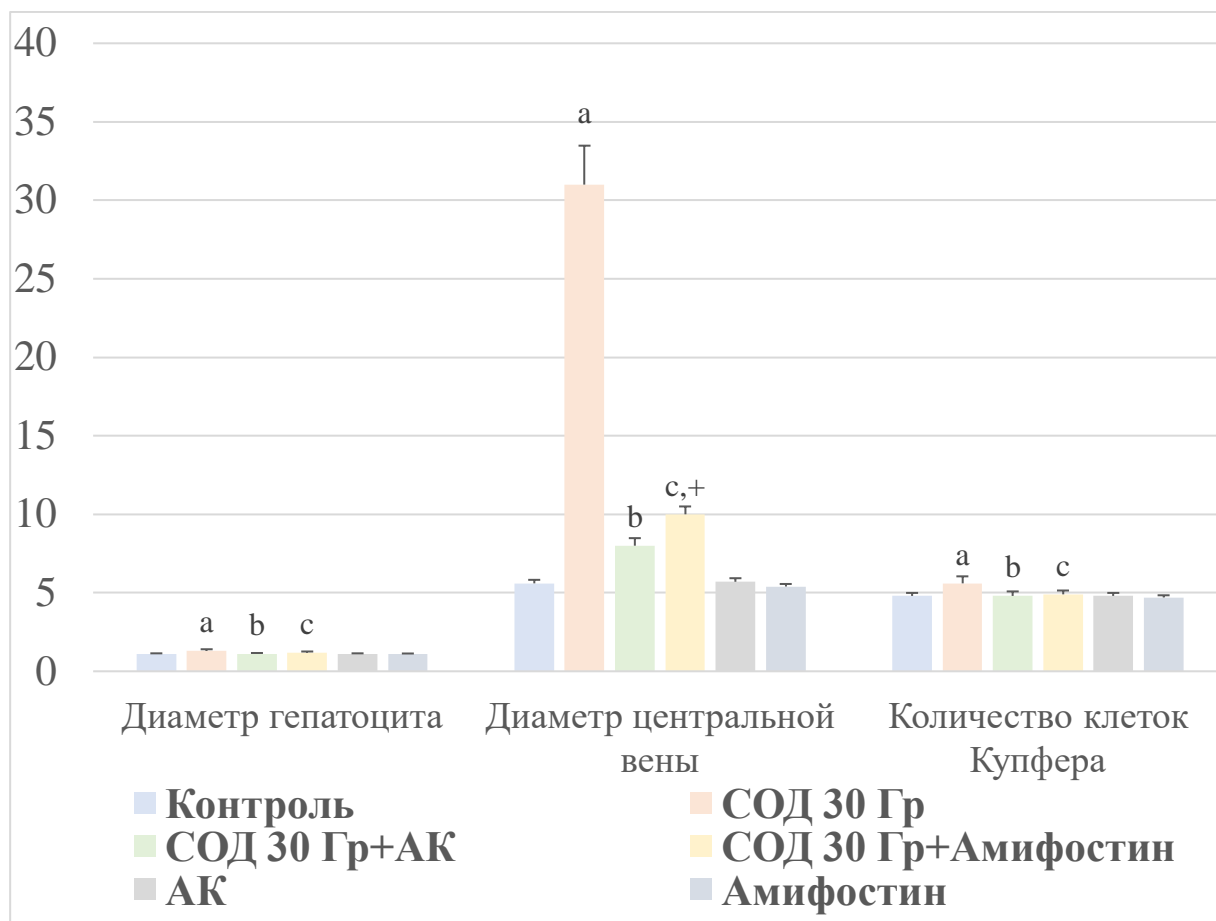


Рисунок 3.7 – Морфометрический анализ диаметра гепатоцитов и центральной вены (в мкм), а также количества клеток Купфера (в 1 мм<sup>2</sup>) в микропрепаратах печени контрольной и опытных групп на 90-е сутки эксперимента. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

Суммарные изменения при оценке по шкале МИП представлены в Таблице 3.3.

Таблица 3.3 – Оценка по Шкале морфологических изменений печени

	Некроз	Дистрофия/ Атрофия	Инфильтрация портальных трактов	Фиброз		1 неделя	3 месяца
				1 нед	3 мес		
<b>Контроль</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>СОД 30 Гр</b>	3	3	3	0	1	9	10
<b>СОД 30 Гр + АК</b>	3	1	1	0	0	4	2
<b>СОД 30 Гр + Амифостин</b>	3	1	1	0	0	4	2
<b>АК</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>Амифостин</b>	0	0	0	0	0	0	0

### 3.5. Иммуногистохимическая оценка пролиферации клеток печени

При проведении иммуногистохимических реакций с антителами к фактору пролиферации Ki-67 в печени животных контрольной группы на всех сроках эксперимента, в среднем, отмечали окрашивание  $5,2 \pm 0,2$  % гепатоцитов, а также некоторых непаренхиматозных клеток (клеток фибробластического ряда, эндотелиоцитов и др.) (Рисунок 3.8). Практически аналогичные значения наблюдали в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронами (группы V и VI).

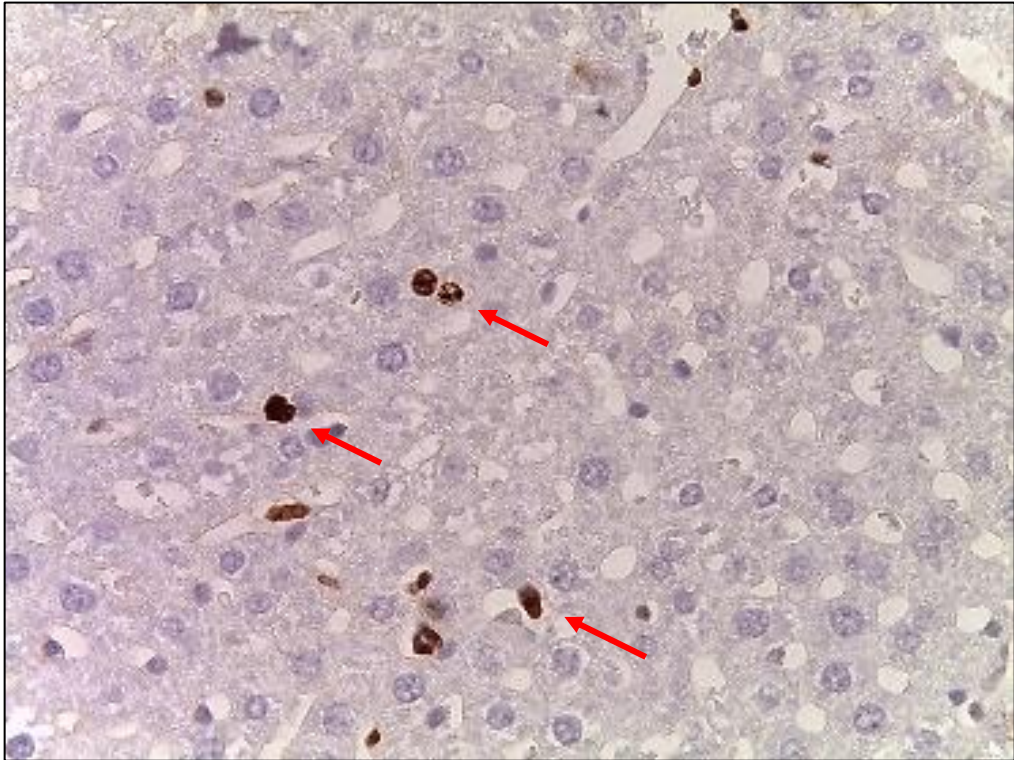


Рисунок 3.8 – Фрагмент печени контрольной группы на 7 сутки. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору пролиферации Ki-67, увелич.  $\times 400$ . Стрелки указывают на Ki-67-окрашенные гепатоциты

Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к резкому снижению количества окрашенных гепатоцитов в 2,0 раза ( $2,6 \pm 0,1\%$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными значениями без значимой тенденции к восстановлению в течение всего эксперимента (Рисунок 3.9). Кроме того, в этой группе наблюдали незначительное увеличение доли Ki-67-окрашенных клеток фибробластического ряда, эндотелия синусоидов и кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров. Данный иммуногистохимический паттерн сохранялся на всех сроках эксперимента без значимой тенденции к восстановлению пролиферативной активности гепатоцитов и непаренхиматозных клеток.

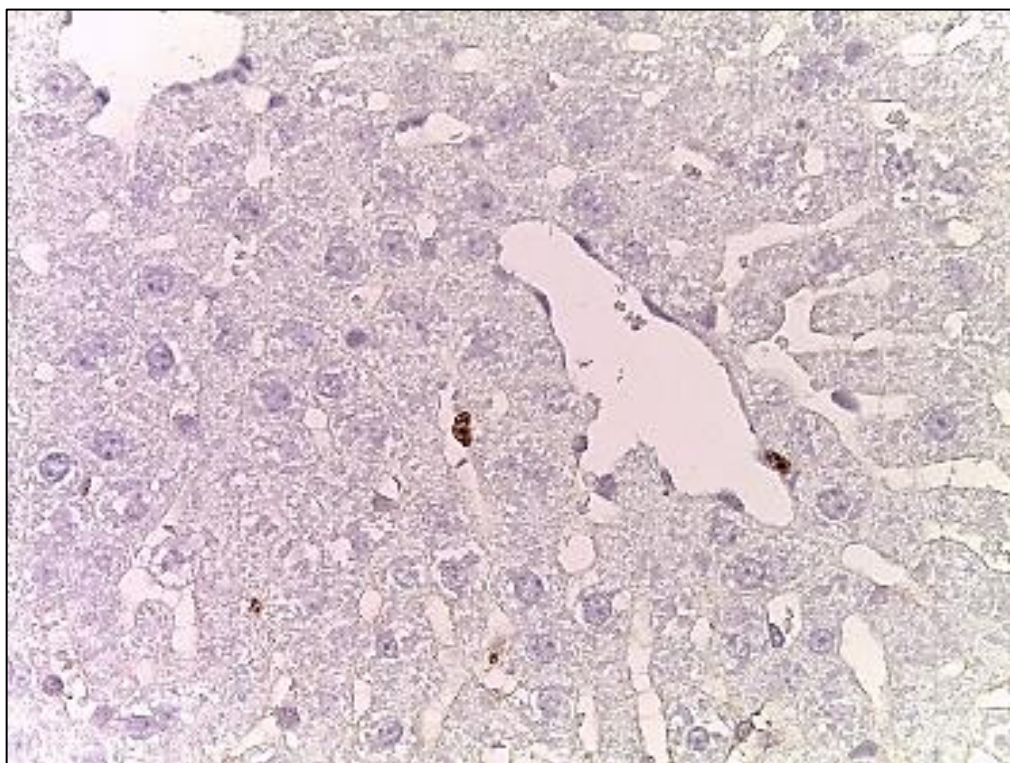


Рисунок 3.9 – Фрагмент печени на 7 сутки после локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору пролиферации Ki-67, увелич.  $\times 400$

В то же время, в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты также отмечали снижение доли Ki-67-позитивных гепатоцитов на ранних сроках, а их количество было ниже контрольных значений в 1,6 раза ( $3,3 \pm 0,1\%$ ;  $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.10). Окрашивание непаренхиматозных клеток печени в этой группе практически не отличалось от контрольных значений с первой недели эксперимента. Однако, уже на первом месяце эксперимента пролиферативная активность клеток печени возрастала, а ко второму месяцу наблюдали ее восстановление до контрольных значений. Группа предлучевого введения амифостина демонстрировала аналогичную положительную динамику, однако полное возвращение экспрессии Ki-67 к контрольным уровням отмечали на третьем месяце эксперимента.

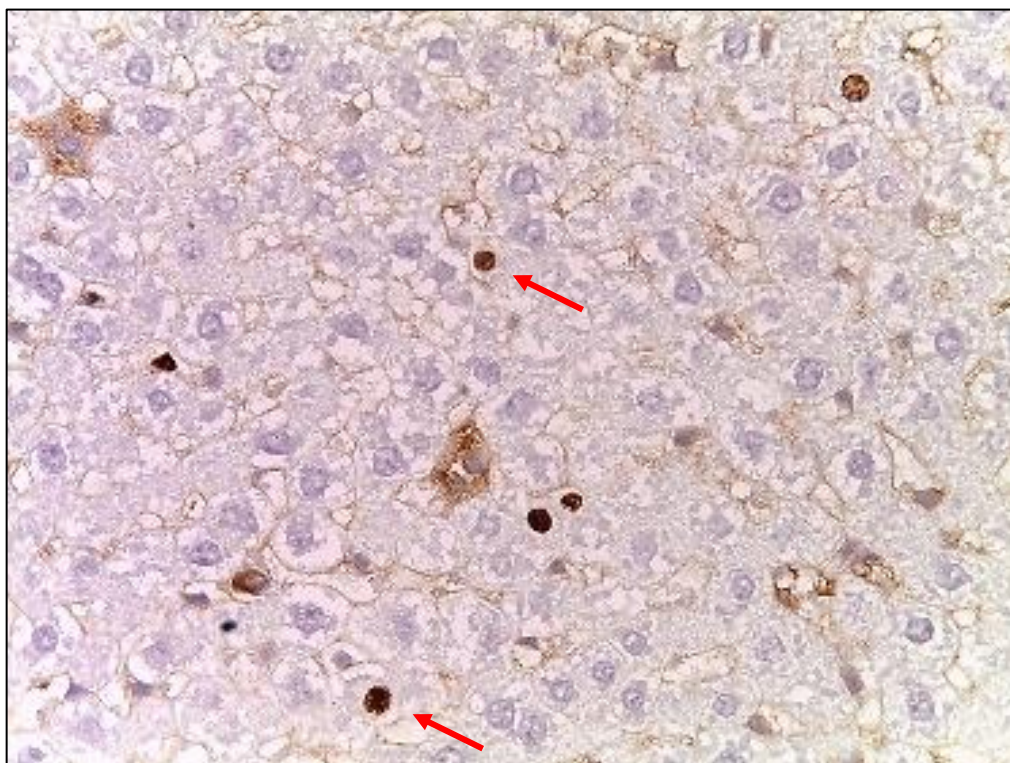


Рисунок 3.10 – Фрагмент печени на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в суммарной дозе 30 Гр. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору пролиферации Ki-67, увелич.  $\times 400$ . Стрелки указывают на Ki-67-окрашенные гепатоциты

### 3.6. Гибель клеток печени

#### 3.6.1. Иммуногистохимическая оценка апоптотической гибели

Одним из наиболее наглядных маркеров апоптотической клеточной смерти является фактор терминации апоптоза, общий для внутреннего и внешнего пути, – каспаза 3. В контрольной группе на всех сроках эксперимента наблюдали лишь единичные ИГХ-окрашенные гепатоциты ( $6,4 \pm 0,3 \%$ ) и некоторые непаренхиматозные клетки (клетки фибробластического ряда, эндотелиоциты и др.) (Рисунок 3.11). Аналогичные значения были получены на всех сроках эксперимента при проведении ИГХ-реакций с антителами к каспазе 3 в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без воздействия электронами.

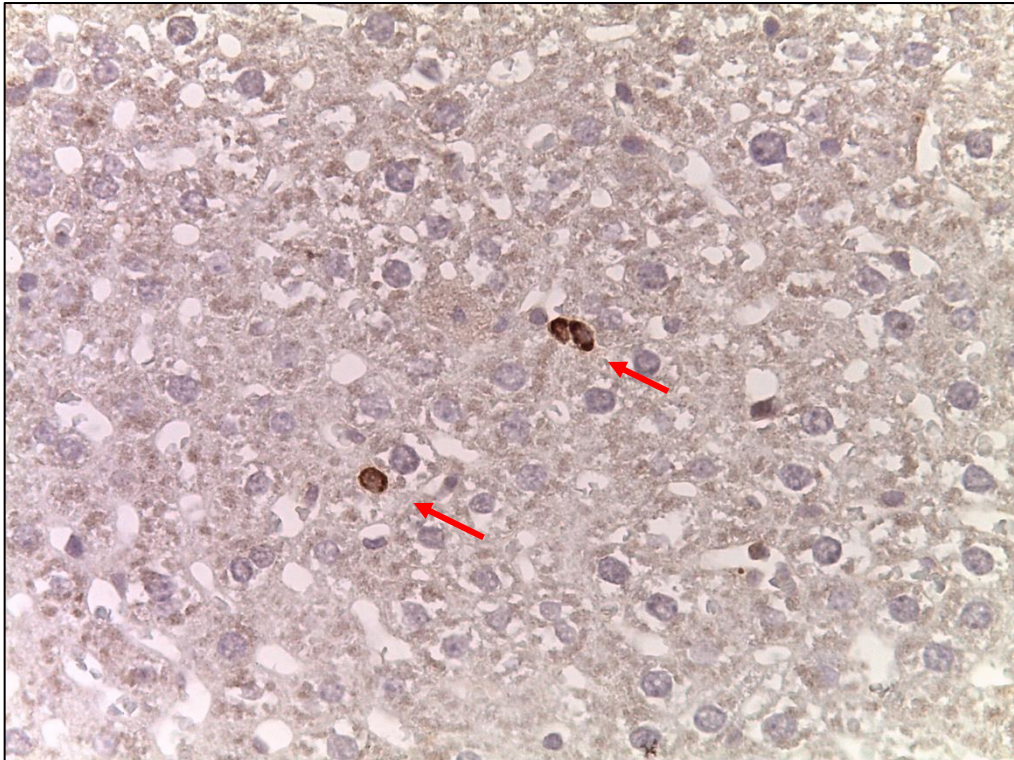


Рисунок 3.11 – Фрагмент печени контрольной группы на 7 сутки эксперимента. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору терминации апоптоза каспазе 3, увелич.  $\times 400$ . Стрелки указывают на каспаза-3-окрашенные гепатоциты

Локальное облучение печени электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к нарушению пролиферативно-апоптотического соотношения и резкому активации апоптотического каскада, обнаруженное по увеличению количества каспазы 3-позитивных гепатоцитов, более чем в 1,9 раза ( $12,5 \pm 0,6 \%$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными показателями (Рисунок 3.12). При этом, также отмечали незначимое увеличение окрашивания некоторых непаренхиматозных клеток, таких как фибробласты, эндотелиальные клетки синусоидных гемокапилляров и кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров. На более поздних сроках, была выявлена тенденция к незначительному снижению доли каспаза-3-позитивных гепатоцитов, их количество на третьем месяце эксперимента превышало контрольные значения более чем в 1,6 раза ( $10,6 \pm 0,5 \%$ ;  $p < 0,05$ ).

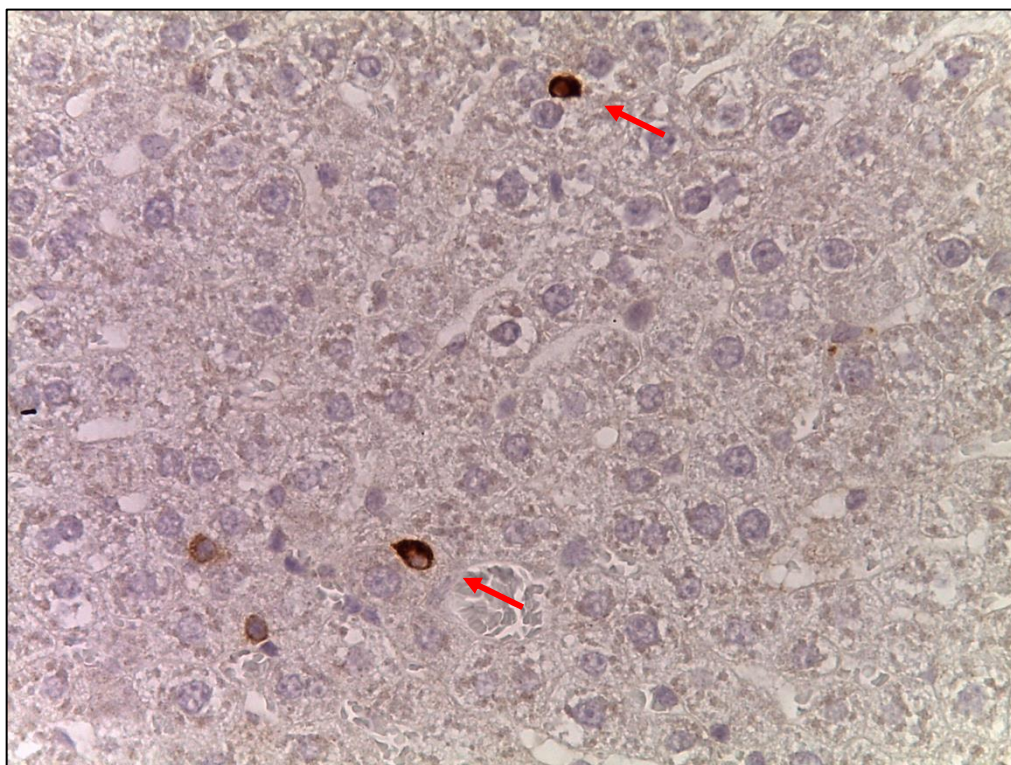


Рисунок 3.12 – Фрагмент печени на 7 сутки после локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору терминации апоптоза каспазе 3, увелич.  $\times 400$ . Стрелки указывают на каспаза-3-окрашенные гепатоциты

Через неделю после введения аскорбиновой кислоты и амифостина животным, локально облученным электронами в суммарной дозе 30 Гр, отмечали преходящее незначительное повышение уровней экспрессии каспазы 3 – в 1,2 раза ( $10,3 \pm 0,5 \%$ ;  $p < 0,05$ ) и в 1,1 раза ( $10,7 \pm 0,5 \%$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с группой монооблучения, соответственно (Рисунок 3.13). Следует отметить, что в обеих группах отмечали позитивную тенденцию к снижению данного показателя, причем аскорбиновая кислота индуцировала его более раннее возвращение к нормальным значениям (на втором месяце) по сравнению с группой предлучевого введения амифостина.

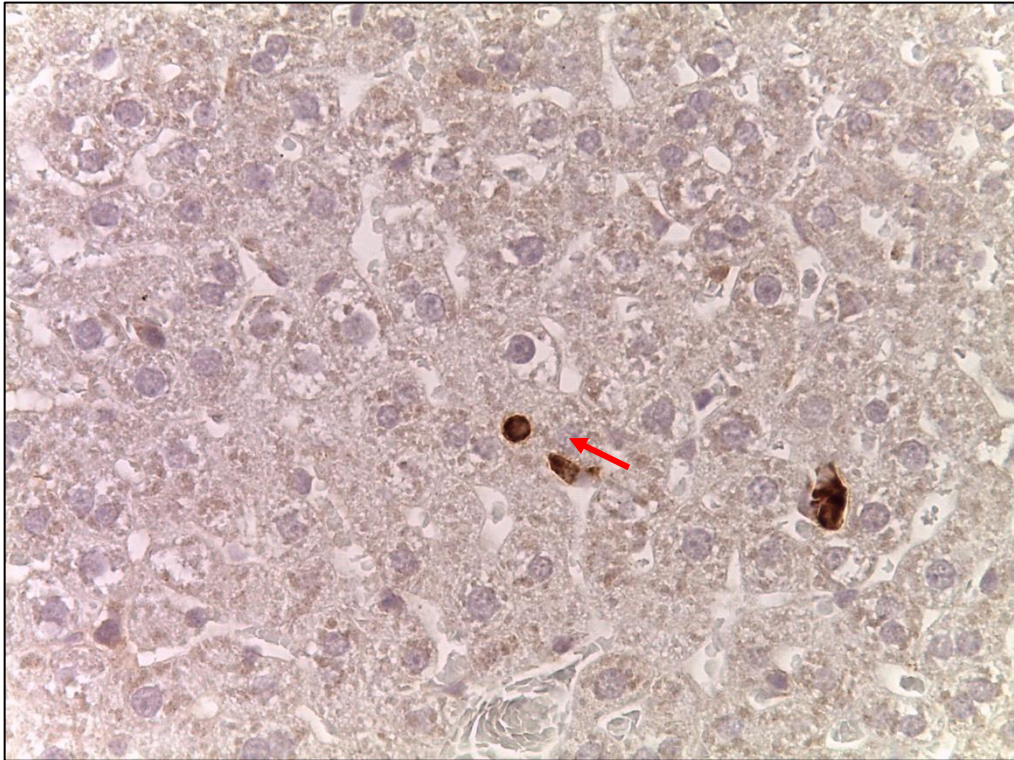


Рисунок 3.13 – Фрагмент печени на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Иммуногистохимические реакции с антителами к фактору терминации апоптоза каспазе 3, увелич.  $\times 400$ . Стрелка указывает на каспаза-3-окрашенный гепатоцит

### 3.6.2. TUNEL-исследование

Для выявления и подсчета локусов фрагментации (одно- или двуцепочечных разрывов) ДНК в гепатоцитах использовали метод TUNEL в поле зрения флуоресцентного микроскопа.

Количество гепатоцитов с участками ДНК, окрашенными флуорохромом, в контрольной группе не превышало отметки в 3 % на протяжении всего эксперимента (Рисунок 3.14, Рисунок 3.19). Аналогичные данные были получены в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без дальнейшего воздействия локального облучения электронами (Рисунок 3.19).

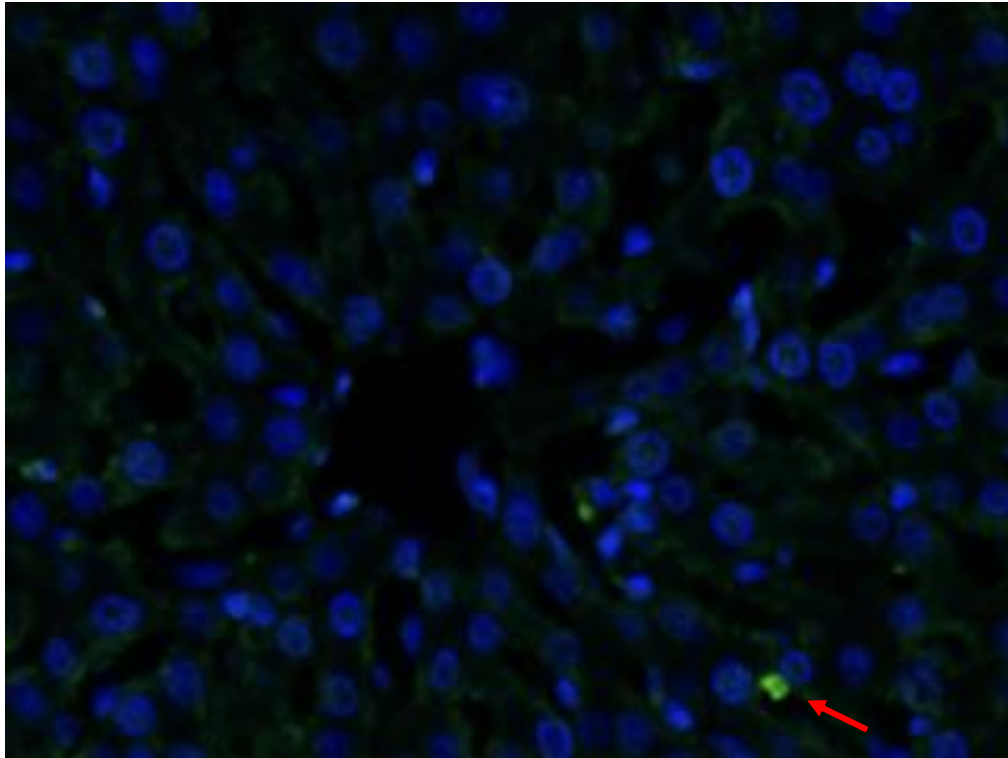


Рисунок 3.14 – TUNEL-исследование фрагмента печени контрольной группы на 7 сутки. Локусы фрагментации ДНК (зеленое свечение, стрелка) в гепатоцитах, DAPI – синее свечение ядер; флуоресцентная микроскопия, увелич.  $\times 400$ .

Напротив, у животных, локально облученных электронами в суммарной дозе 30 Гр, отмечали резкое увеличение количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК до 72 % на первой неделе эксперимента (Рисунок 3.15, Рисунок 3.19). Тем не менее, несмотря на тенденцию к частичной репарации повреждений ДНК и снижению доли TUNEL-позитивных гепатоцитов в этой группе в течение эксперимента, доля окрашенных клеток даже на третьем месяце составляла 15 %, что превышает контрольные значения более чем в 10,0 раз (Рисунок 3.16, Рисунок 3.19).

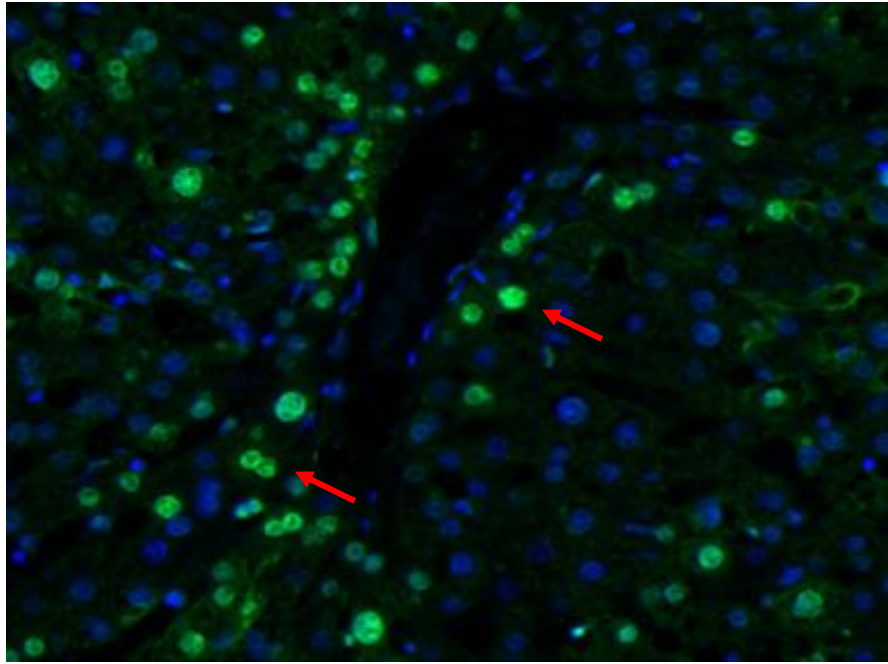


Рисунок 3.15 – TUNEL-исследование фрагмента печени на 7 сутки после локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Локусы фрагментации ДНК (зеленое свечение, стрелки) в гепатоцитах, DAPI – синее свечение ядер; флуоресцентная микроскопия, увелич.  $\times 400$

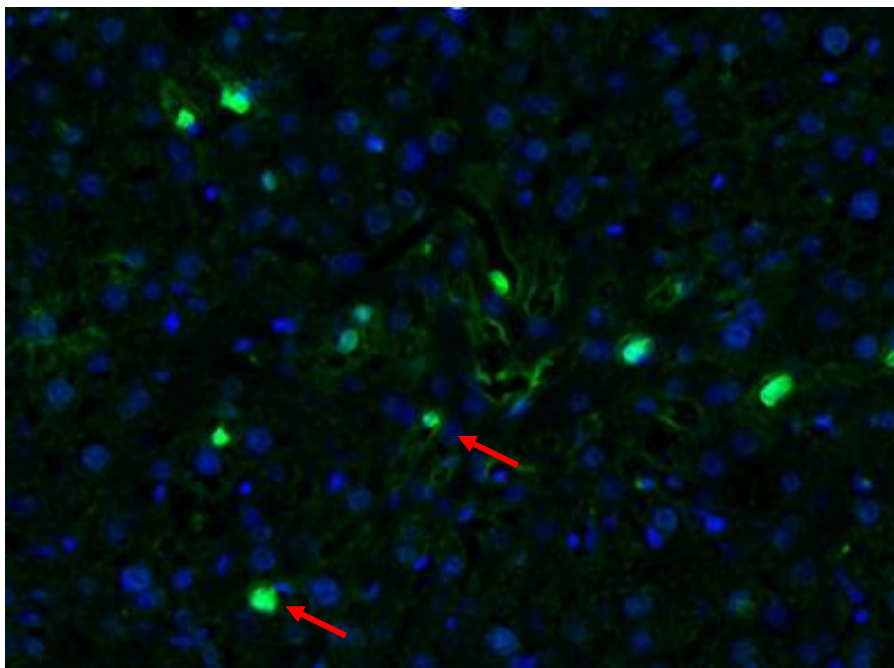


Рисунок 3.16 – TUNEL-исследование фрагмента печени через 90 суток после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Локусы фрагментации ДНК (зеленое свечение, стрелки) в гепатоцитах, DAPI – синее свечение ядер; флуоресцентная микроскопия, увелич.  $\times 400$

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты (III группа) и амифостина (IV группа) уже на 7 сутки демонстрировало снижение числа разрывов ДНК в гепатоцитах, что подтверждено более низкими значениями количества TUNEL-позитивных локусов (в 8,0 раза и в 7,6 раза, соответственно) по сравнению с группой облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр ( $p < 0,05$ ). В этих группах так же отмечали тенденцию к снижению доли поврежденных локусов ДНК, причем в течение первых двух месяцев темпы восстановления в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты значительно превышали таковые для амифостина ( $p < 0,05$ ). Однако, к третьему месяцу эксперимента в обеих группах отметили практически полное восстановление TUNEL-сигналинга в гепатоцитах до контрольного уровня.

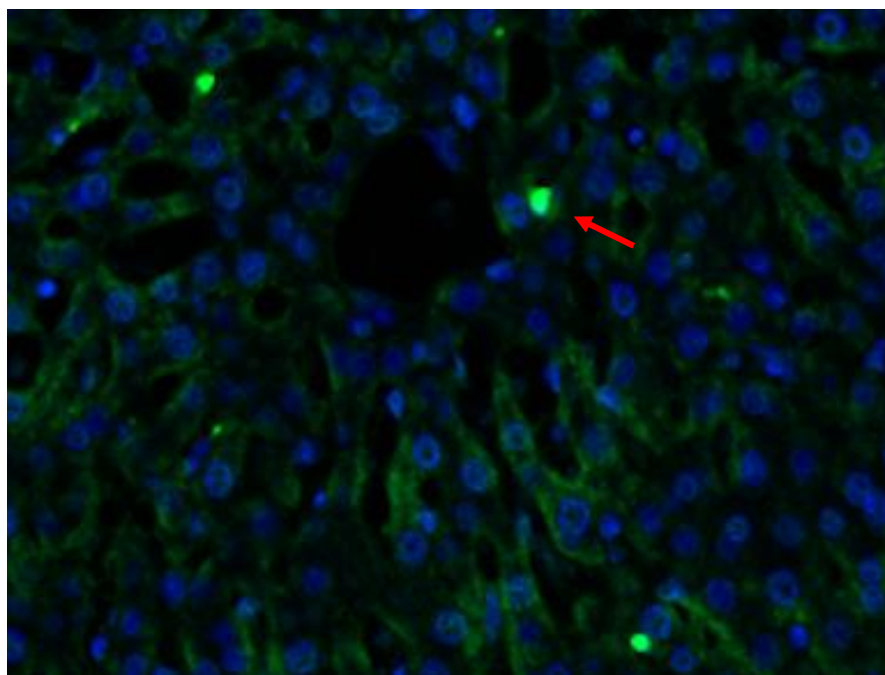


Рисунок 3.17 – TUNEL-исследование фрагмента печени на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Локусы фрагментации ДНК (зеленое свечение, стрелка) в гепатоцитах, DAPI – синее свечение ядер; флуоресцентная микроскопия, увелич.  $\times 400$

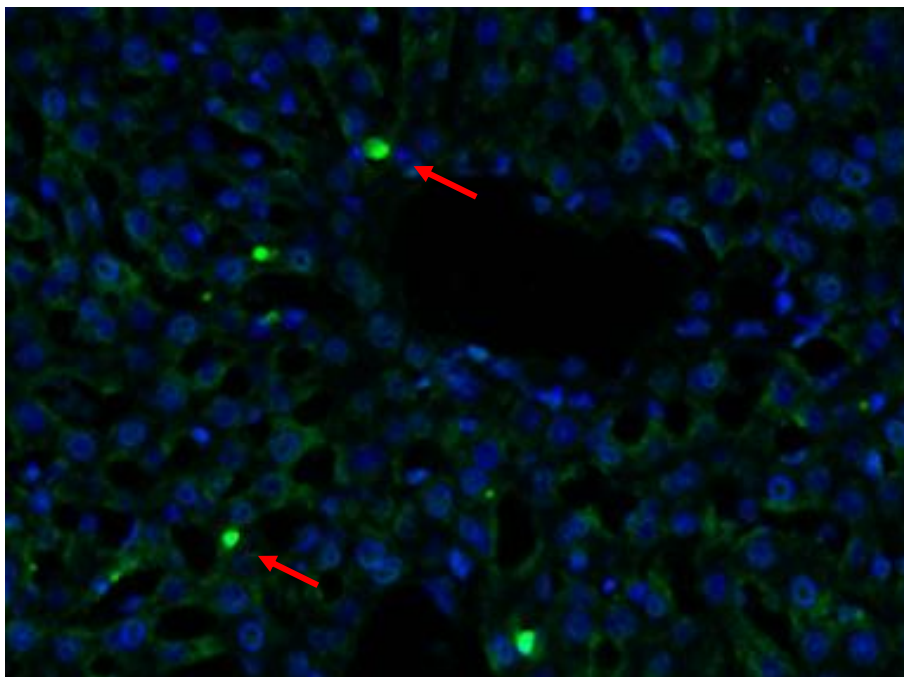


Рисунок 3.18 – TUNEL-исследование фрагмента печени через 90 суток после введения аскорбиновой кислоты и воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Локусы фрагментации ДНК (зеленое свечение, стрелки) в гепатоцитах, DAPI – синее свечение ядер; флуоресцентная микроскопия, увелич.  $\times 400$

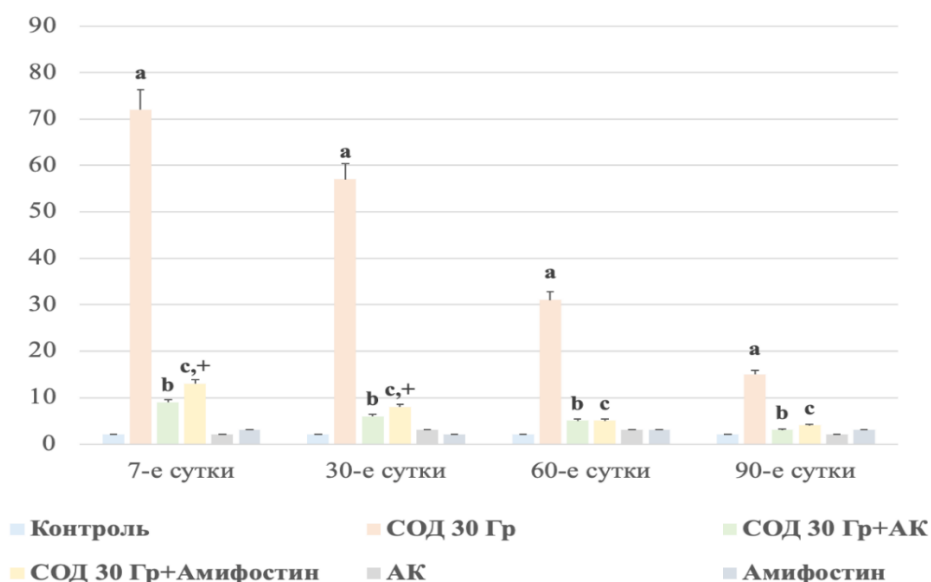


Рисунок 3.19 – TUNEL-исследование контрольной и опытных групп. Количественные результаты окрашивания гепатоцитов флуорохромом. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

### 3.6.3. Молекулярно-генетический анализ регуляторов жизненного цикла клеток печени

Оценку влияния локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр и предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина на уровни экспрессии генов-регуляторов жизненного цикла клеток печени *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase 3* проводили при помощи количественной ПЦР в реальном времени.

На 7-е сутки в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр отмечали существенное преобладание экспрессии мРНК *Bax* по сравнению с контрольной группой, что указывает на активацию проапоптотических каскадов. Экспрессия антиапоптотического *Bcl-2* в этой группе незначительно превышала контрольные значения, что не соответствовало уровням *Bax*. Это привело к увеличению соотношения *Bax/Bcl-2*, что предполагает запуск механизмов выхода клеток печени в апоптоз и их апоптотическую гибель (Рисунок 3.20).

Напротив, предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина демонстрировало умеренный ответ исследуемых показателей на локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр. Несмотря на незначительное повышение уровней экспрессии *Bax* и *Bcl-2* по сравнению с контрольной группой, в группе локального облучения электронами СОД 30 Гр отмечено существенное снижение вариативности данных параметров. В этих группах на всех сроках эксперимента сохранялось устойчивое соотношение *Bax/Bcl-2* (Рисунок 3.20, Рисунок 3.21).

Кроме того, для количественной оценки активации генов, ответственных за апоптотическую гибель клеток печени, была проведена молекулярно-генетическая оценка экспрессии мРНК фактора терминации апоптоза каспазы 3. Уровни этого параметра в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр значительно превышали контрольные показатели. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина с целью радиопротекции клеток печени в равной степени привело к менее выраженной активации гена *Caspase 3* по сравнению с группой

облучения, различий по степени и срокам приближения показателей групп аскорбиновой кислоты и амифостина к контрольным значениям не обнаружили (Рисунок 3.20). На поздних сроках эксперимента (60-е и 90-е сутки) уровни экспрессии исследуемых генов значимо не отличались от контрольных значений (Рисунок 3.21).

В группах, которым вводили аскорбиновую кислоту или амифостин без дальнейшего воздействия локального облучения электронами на всех сроках эксперимента отмечали показатели экспрессии исследуемых маркеров, аналогичные таковым в контрольной группе.

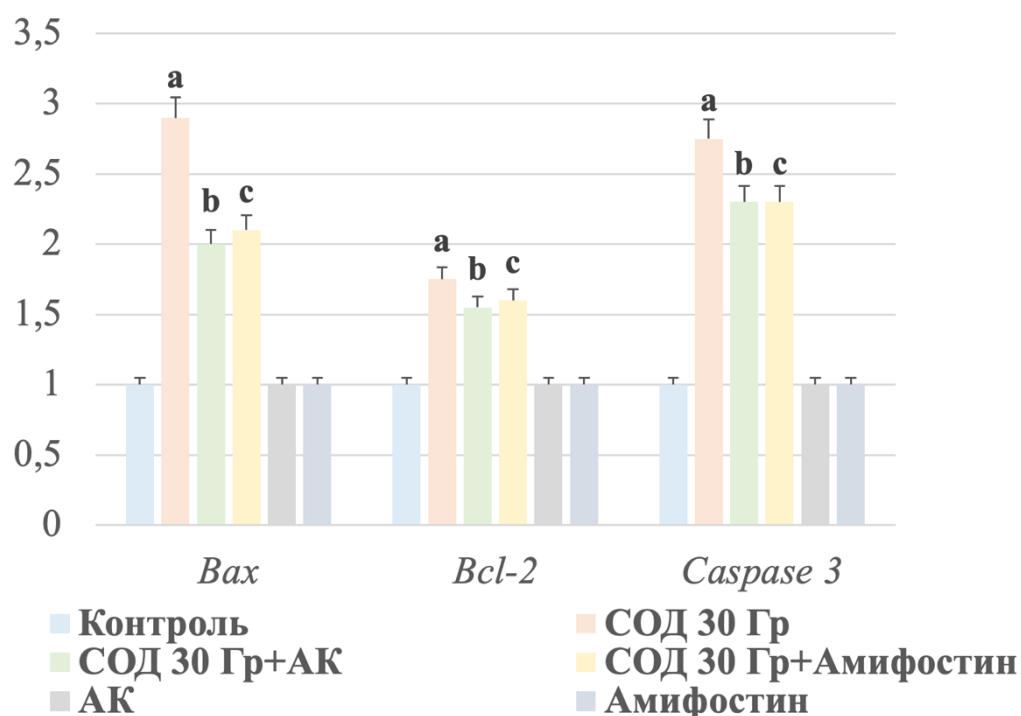


Рисунок 3.20 – ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7 сутки эксперимента. Количественные результаты экспрессии мРНК генов *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase 3*, выраженные в усл. ед., график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

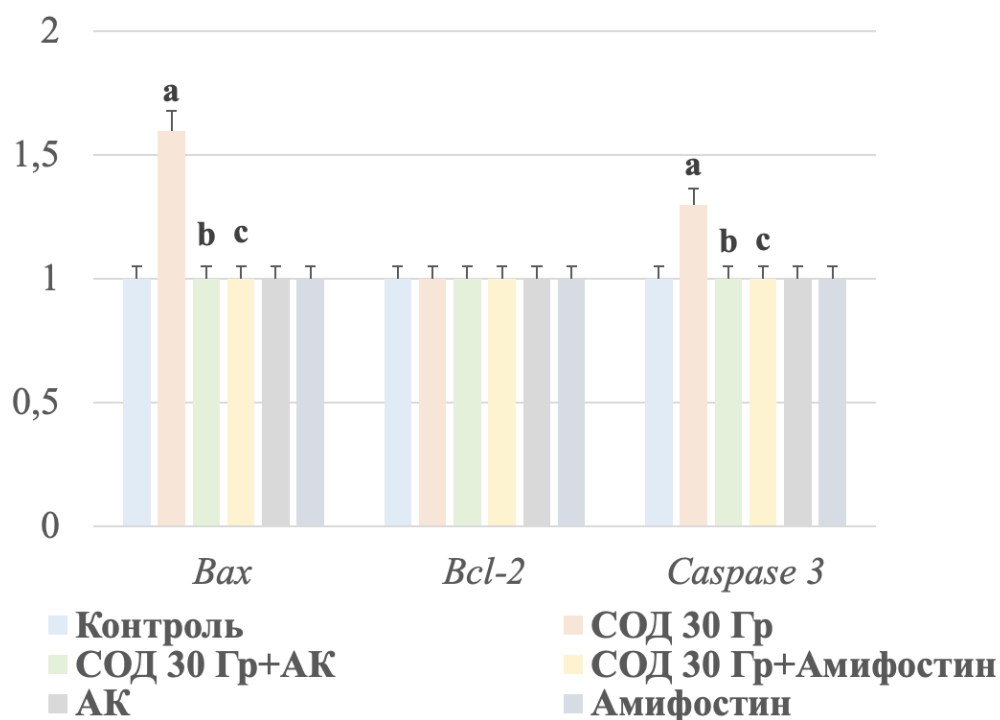


Рисунок 3.21 – ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 90 сутки эксперимента. Количественные результаты экспрессии мРНК генов *Bax*, *Bcl-2* и *Caspase 3*, выраженные в усл. ед., график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

### 3.7. Анализ воспалительной реакции

С целью оценки выраженности воспалительной реакции был проведен количественный иммуноферментный анализ сыворотки крови методом ELISA на основные провоспалительные цитокины (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительный цитокин ИЛ-10 с определением их соотношения.

Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр на 7-е сутки привело к резкому увеличению концентраций провоспалительных цитокинов по сравнению с контрольной группой: ИЛ-1 $\beta$  – в 6,2 раза, ИЛ-6 – в 3,1 раза, TNF- $\alpha$  – в 6,8 раза ( $p < 0,05$ ). В то же время, обнаруженный прирост концентрации

противовоспалительного цитокина ИЛ-10 был менее выражен и превышал контрольные значения в 5,2 раза ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.22). На более поздних сроках концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови практически не отличались от контрольных значений.

В группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр уже на 7-е сутки обнаружили частичную протекцию цитокинового баланса при менее выраженном повышении уровней исследуемых цитокинов по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ): ИЛ-1 $\beta$  – в 5,1 раза, ИЛ-6 – в 2,6 раза, TNF- $\alpha$  – в 5,3 раза, ИЛ-10 – в 4,7 раза. Результаты группы предлучевого введения амифостина значимо не отличались от таковых в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты (Рисунок 3.22).

На более поздних сроках концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови групп предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также групп введения этих препаратов без воздействия облучения статистически значимо не отличались от контрольных значений.

Количественная оценка экспрессии цитокинов в гомогенате печени этой группы методом ELISA на 7-е сутки подтвердила увеличение локальной концентрации цитокинов с преобладанием провоспалительных над противовоспалительными. Так, в гомогенизированной ткани печени было обнаружено статистически значимое повышение экспрессии ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-10 по сравнению с контрольными значениями в 5,0 раза, в 4,5 раза и в 3,7 раза, соответственно ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.25). На поздних сроках отмечали некоторое снижение концентрации провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, а на третьем месяце их количество по-прежнему значительно превышало контрольные показатели ( $p < 0,05$ ): ИЛ-1 $\beta$  – в 4,6 раза, ИЛ-6 – в 3,4 раза, ИЛ-10 – в 4,0 раза (Рисунок 3.24, Рисунок 3.25, Рисунок 3.26).

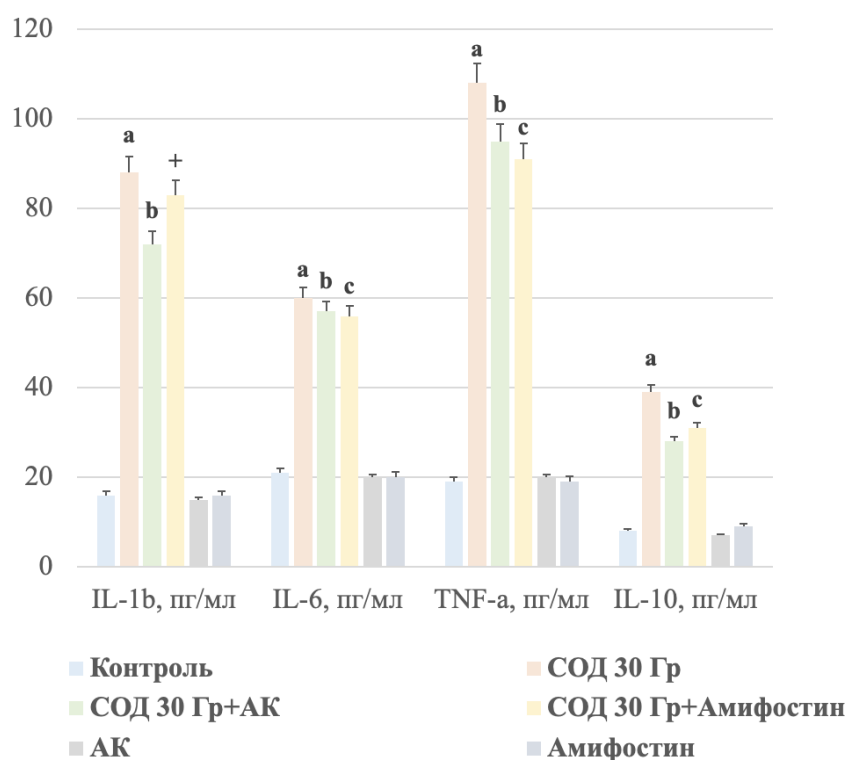


Рисунок 3.22 – Иммуноферментный анализ печени контрольной и опытных групп на 7 сутки методом ELISA. Концентрации провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, TNF- $\alpha$ ) и противовоспалительного ИЛ-10 в сыворотке крови в пг/мл. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты перед воздействием электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к частичному предотвращению развития локальной воспалительной реакции в результате снижения экспрессии провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Это было подтверждено результатами количественной оценки их концентраций в гомогенизированных тканях: на первой неделе эксперимента значения экспрессии ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИЛ-10 при проведении анализа ELISA оказались ниже на 50 %, на 33 % и на 7 % по сравнению с группой облучения электронами в суммарной дозе, соответственно ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 3.23). Следует отметить практически полное сохранение баланса провоспалительных/противовоспалительных цитокинов в этой группе. На более поздних сроках положительная динамика сохранялась, а экспрессия исследуемых

маркеров на третьем месяце практически приближалась к контрольным показателям (Рисунок 3.24, Рисунок 3.25, Рисунок 3.26).

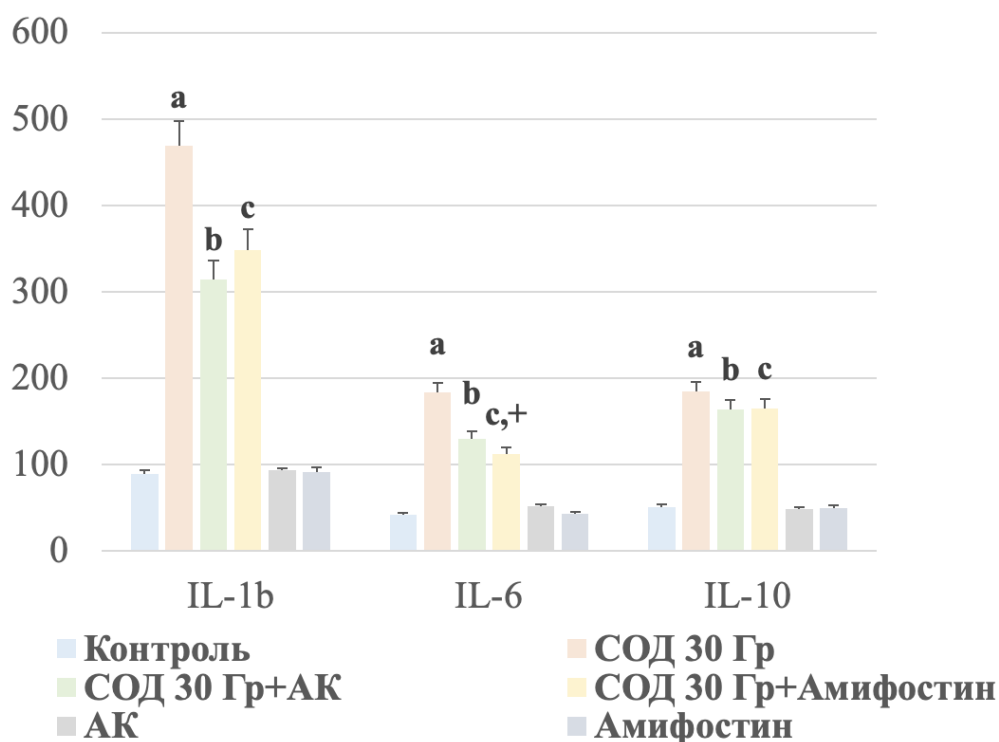


Рисунок 3.23 – Количественная оценка концентраций (в пг/мл) провоспалительных цитокинов ИЛ-1β и ИЛ-6, а также противовоспалительного ИЛ-10 в гомогенизированной ткани печени на 7-е сутки эксперимента, график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

Примечательно, что несмотря на аналогичную позитивную динамику и тенденцию к восстановлению цитокинового состава до контрольных значений в группе предлучевого введения амифостина в течение эксперимента в некоторых случаях отмечали более высокие уровни экспрессии отдельных цитокинов по сравнению с группой предлучевого введения аскорбиновой кислоты (Рисунок 3.23, Рисунок 3.24, Рисунок 3.25, Рисунок 3.26). Так, на последнем месяце обнаружили статистически значимо повышенные значения концентрации ИЛ-6 (на 12 %,  $p$

<0,05) при сравнении эффективности амифостина и аскорбиновой кислоты (Рисунок 3.26).

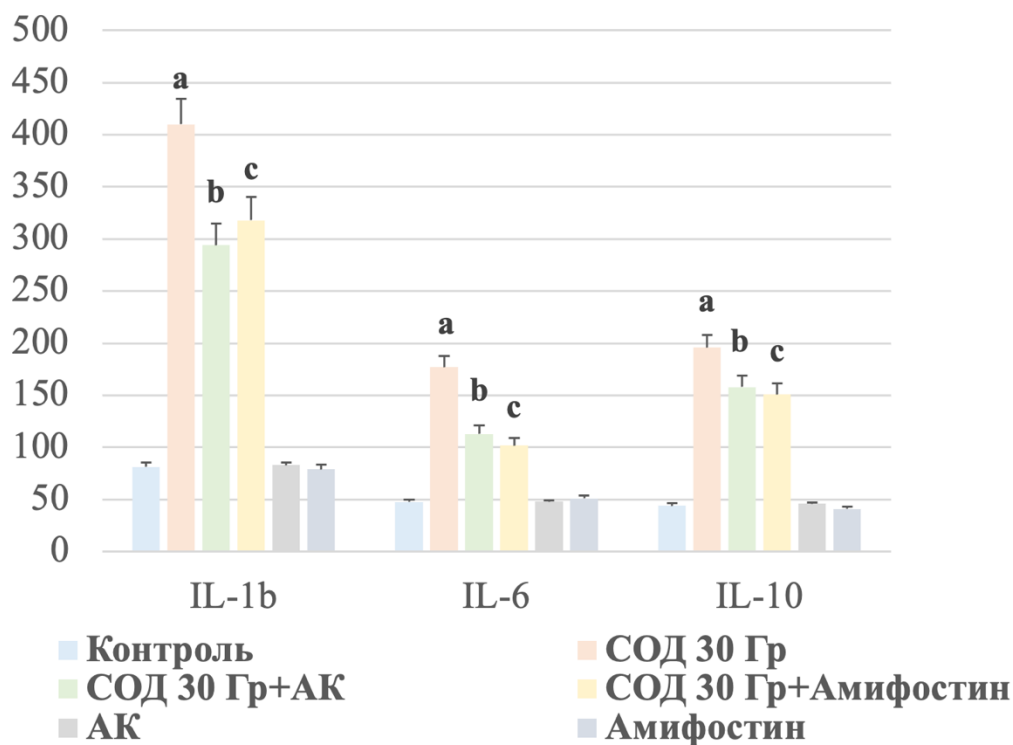


Рисунок 3.24 – Количественная оценка концентраций (в пг/мл) провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, а также противовоспалительного ИЛ-10 в гомогенизированной ткани печени на 30-е сутки эксперимента, график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; + – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

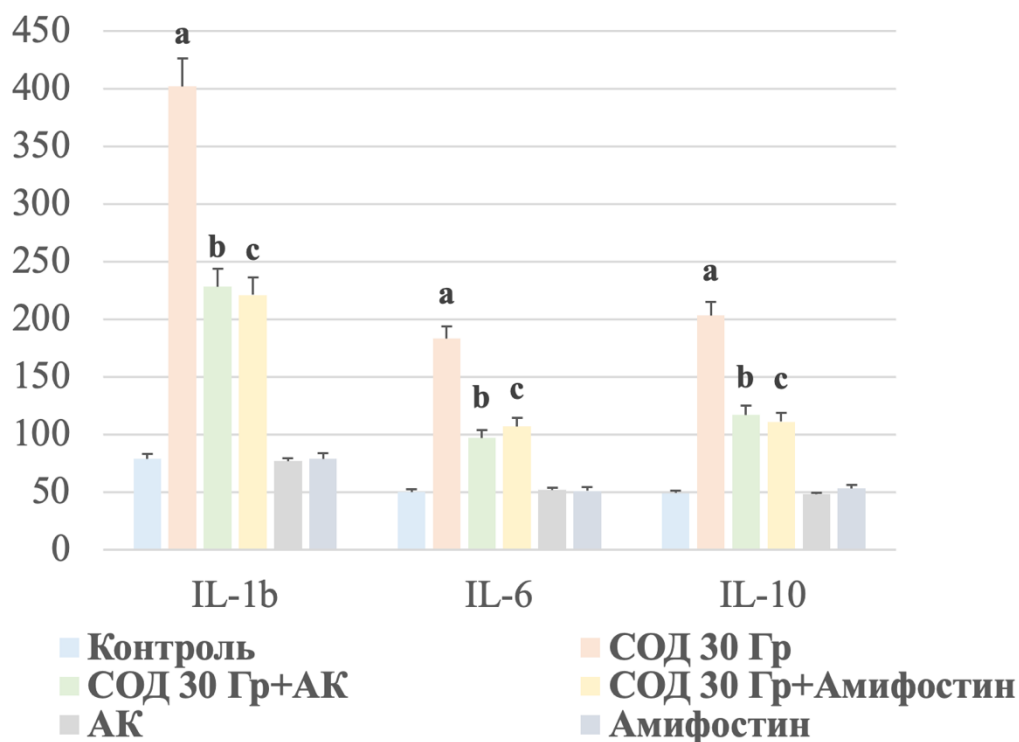


Рисунок 3.25 – Количественная оценка концентраций (в пг/мл) провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, а также противовоспалительного ИЛ-10 в гомогенизированной ткани печени на 60-е сутки эксперимента, график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Gr» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Gr + АК» против «СОД 30 Gr»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Gr + амифостин» против «СОД 30 Gr»; + – «СОД 30 Gr + амифостин» против «СОД 30 Gr + АК»;  $p < 0,05$

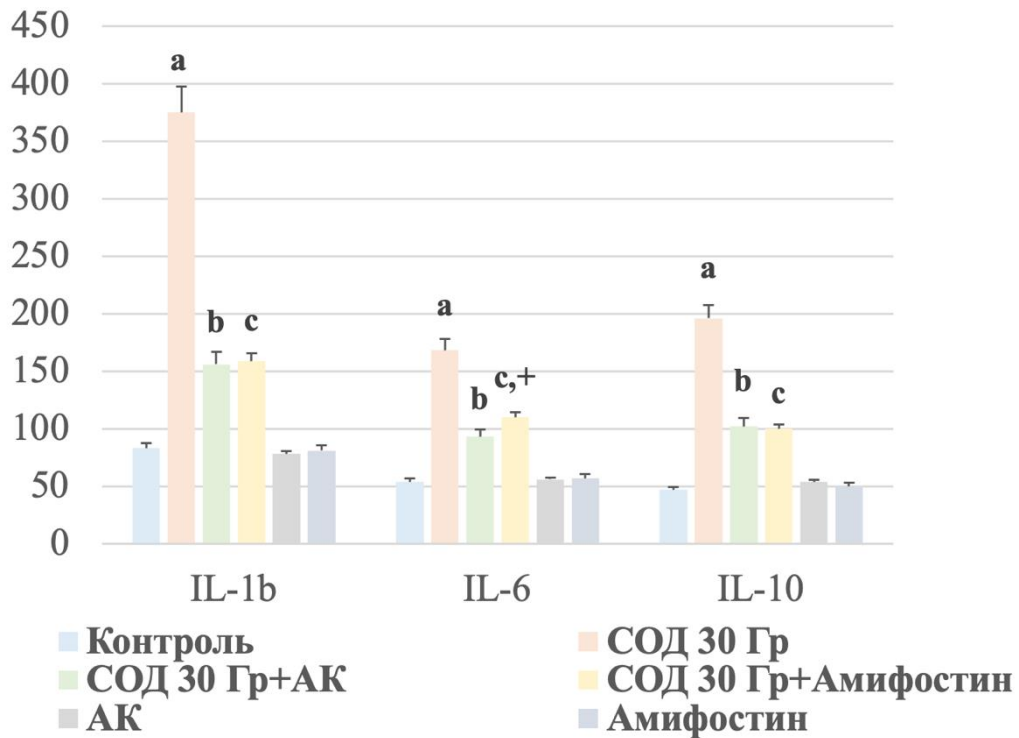


Рисунок 3.26 – Количественная оценка концентраций (в пг/мл) провоспалительных цитокинов ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, а также противовоспалительного ИЛ-10 в гомогенизированной ткани печени на 90-е сутки эксперимента, график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; <sup>+</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

### 3.8. Гистохимическое исследование

С целью оценки степени разрастания соединительной ткани после введения аскорбиновой кислоты или амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также для подтверждения эффективности использования уровней коэкспрессии  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в звездчатых клетках печени в качестве ранних маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени, было проведено гистохимическое окрашивание микропрепаратов трихромом по Массону на третьем месяце эксперимента. Данный метод

окрашивания позволяет обнаружить волокна соединительной ткани, окрашивая их в синий цвет.

Так, спустя три месяца после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр обнаружили умеренное разрастание стромального компонента печени, количественно подтвержденное увеличением площади окрашивания коллагеновых волокон анилиновым синим и хромогенности по результатам морфометрической обработки полученных изображений. Выявленные изменения локализовались преимущественно в перисинусоидном и междольковом пространствах печени (Рисунок 3.27, Рисунок 3.30).

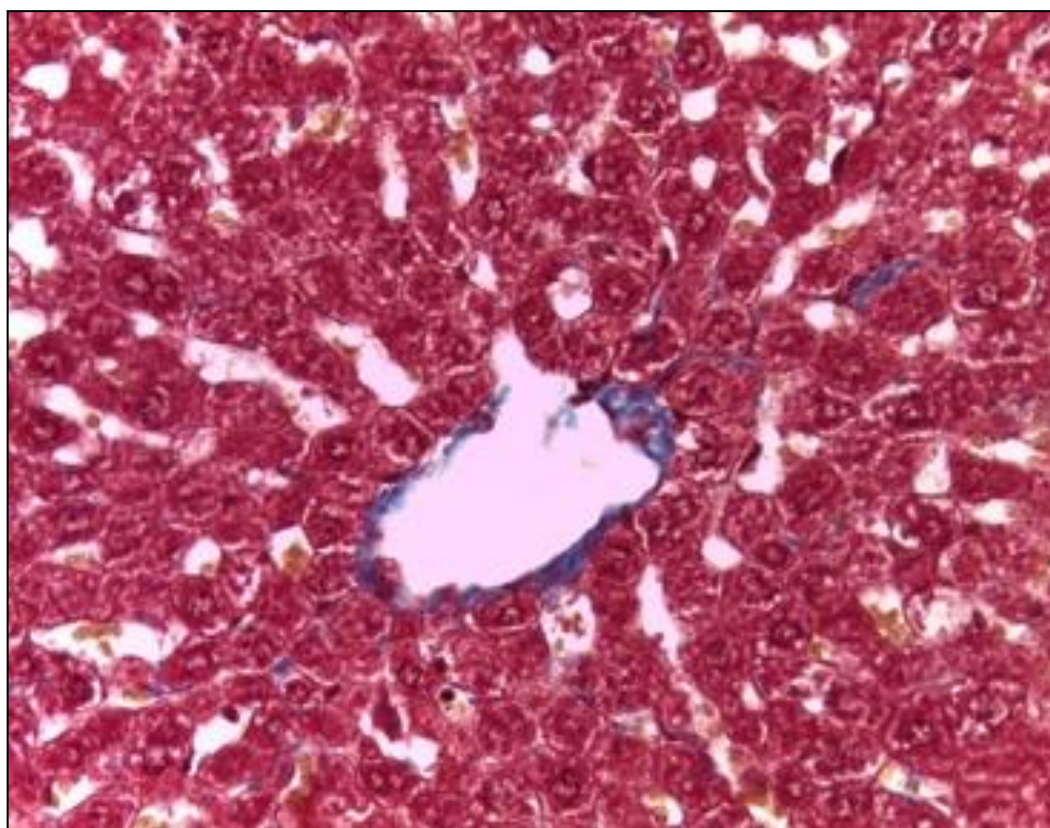


Рисунок 3.27 – Фрагмент печени на 90 сутки после локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Гистохимическое окрашивание волокон трихромом по Массону, увелич.  $\times 400$

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к частичному предотвращению развития радиационно-индуцированного фиброза

печени, ожидаемому нами на основании анализа коэкспрессии  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  на ранних сроках. Так, к третьему месяцу в этих группах обнаружили снижение количества и оптической плотности коллагеновых волокон по сравнению с группой локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Площадь коллагеновых и ретикулярных волокон по данным гистохимического исследования трихромом по Массону на этом сроке была приближена к контрольным значениям. Слабое диффузное окрашивание волокнистого компонента соединительной ткани анилиновым синим отмечали лишь в некоторых локусах перисинусоидного и / или междолевого пространств (Рисунок 3.28, Рисунок 3.30).

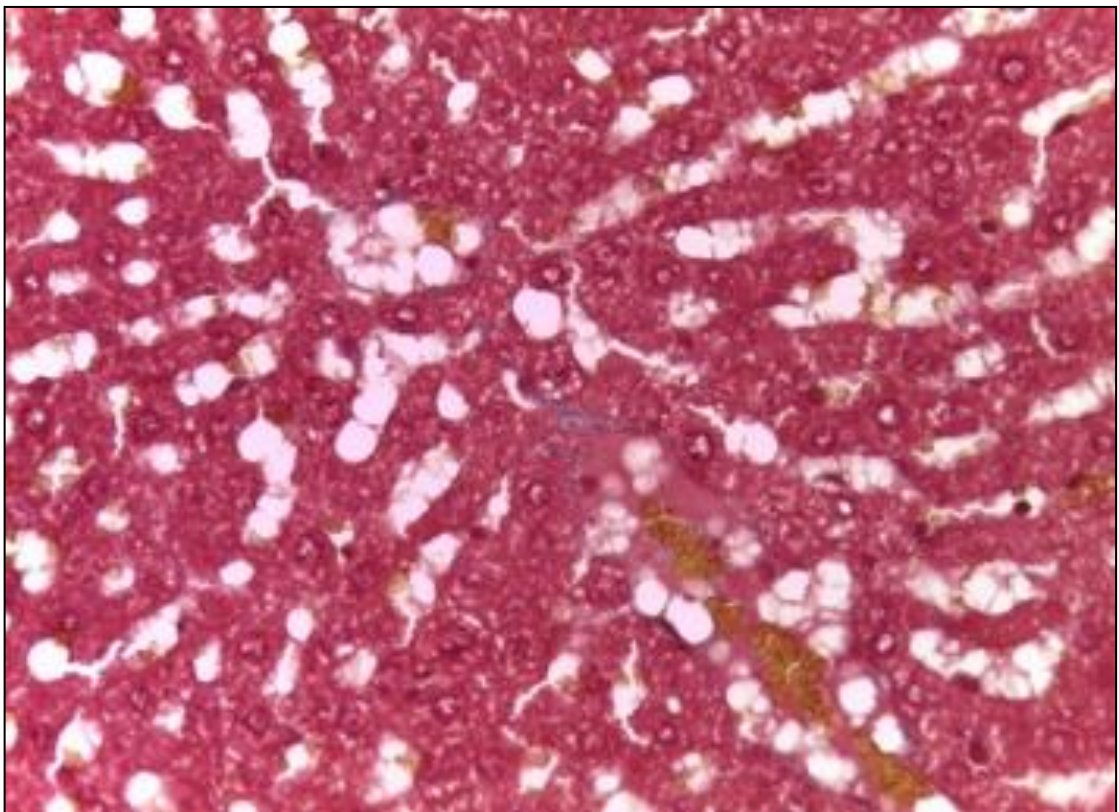


Рисунок 3.28 – Фрагмент печени на 90 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в СОД 30 Гр. Гистохимическое окрашивание волокон трихромом по Массону, увелич.  $\times 400$

Гистохимическая картина, которую наблюдали в группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без дальнейшего воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также морфометрические

показатели хромогенности коллагеновых волокон были аналогичны таковым в контрольной группе (Рисунок 3.29, Рисунок 3.30).

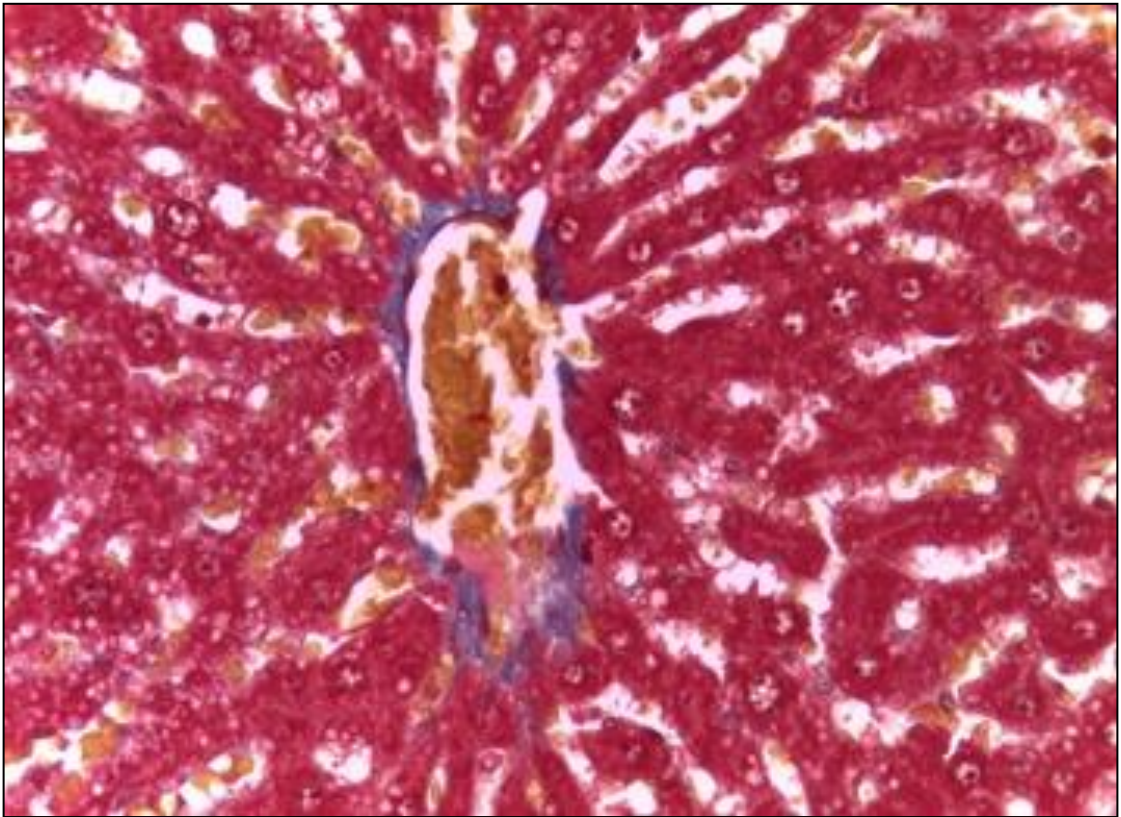


Рисунок 3.29 – Фрагмент печени контрольной группы на 90 сутки.  
Гистохимическое окрашивание волокон трихромом по Массону, увелич. ×400

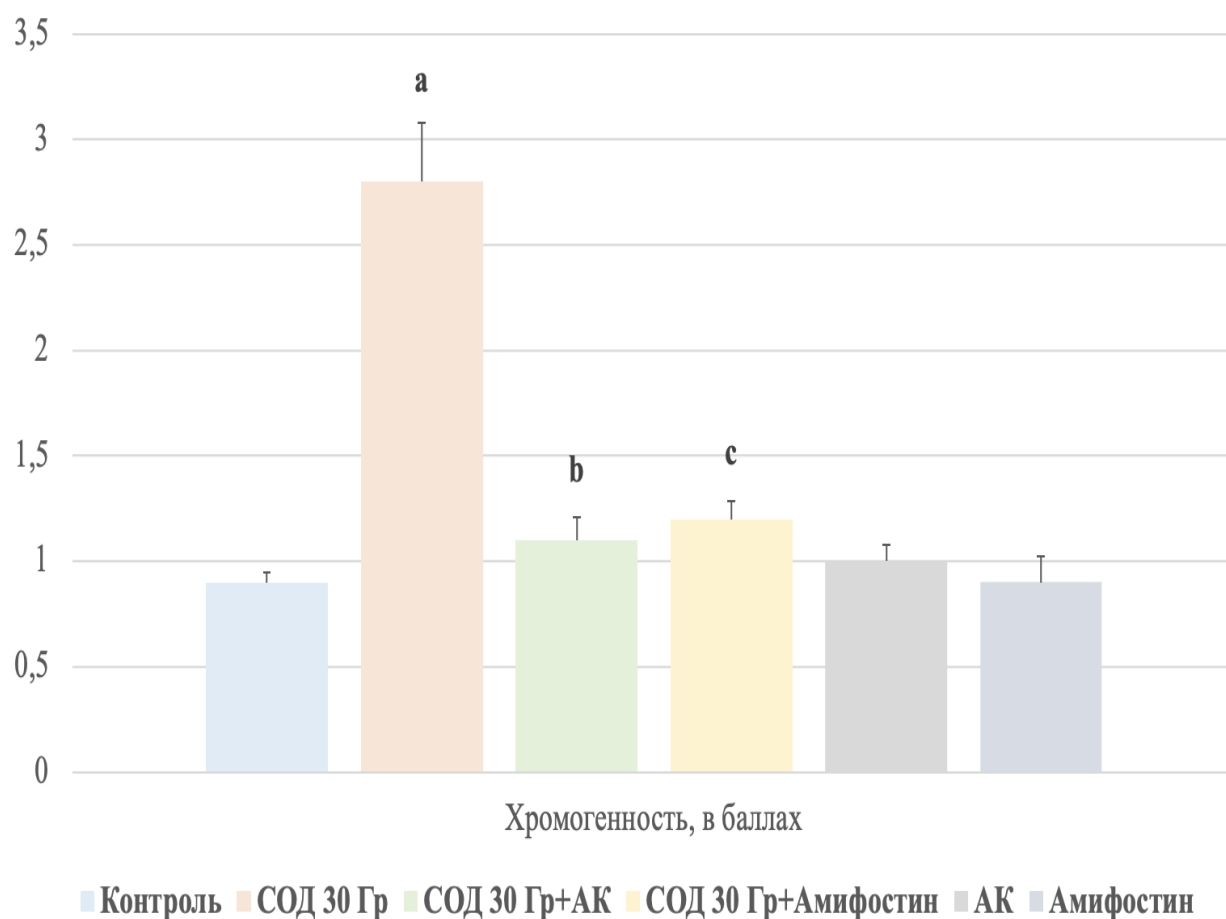


Рисунок 3.30 – Хромогенность коллагеновых и ретикулярных волокон соединительной ткани печени контрольной и опытных групп на 90-е сутки эксперимента, график. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота. Статистически значимые различия между группами: <sup>a</sup> – «СОД 30 Гр» против контрольной группы; <sup>b</sup> – «СОД 30 Гр + АК» против «СОД 30 Гр»; <sup>c</sup> – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр»; + – «СОД 30 Гр + амифостин» против «СОД 30 Гр + АК»;  $p < 0,05$

### **3.9. Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование на выявление маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени**

На основании данных в специализированной научной литературе и собственных наблюдений, в качестве потенциальных ранних маркеров-предикторов радиационно-индуцированного фиброза печени в настоящей работе были апробированы  $\alpha$ -актин гладких мышечных клеток ( $\alpha$ -SMA) и трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). При этом особое внимание уделяли маркированию клеток Ито, которые, кроме накопления витамина А в липидных каплях, в том числе участвуют в регуляции коллагенообразования экстрацеллюлярного матрикса.

По результатам флуоресцентной микроскопии печени с антителами к потенциальным маркерам фиброгенеза ( $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$ ) на 7 сутки после воздействия электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр отмечали усиление сигналинга в клетках Ито, в отличие от образцов контрольной группы (Рисунок 3.32). Иммунофлуоресцентная метка на профибротический фактор TGF- $\beta$  также была зафиксирована в гепатоцитах (Рисунок 3.34, Рисунок 3.35).

Напротив, ослабление сигналинга на указанные маркеры отмечали в звездчатых клетках печени в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед локальным облучением электронами в СОД 30 Гр (Рисунок 3.33). Следует отметить, что в группе предлучевого введения амифостина интенсивность сигнала  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в звездчатых клетках печени была незначительно выше, чем при предлучевом введении аскорбиновой кислоты.

Коэкспрессия  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в печени групп, которым вводили аскорбиновую кислоту или амифостин без дальнейшего воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, практически отсутствовала (Рисунок 3.31).

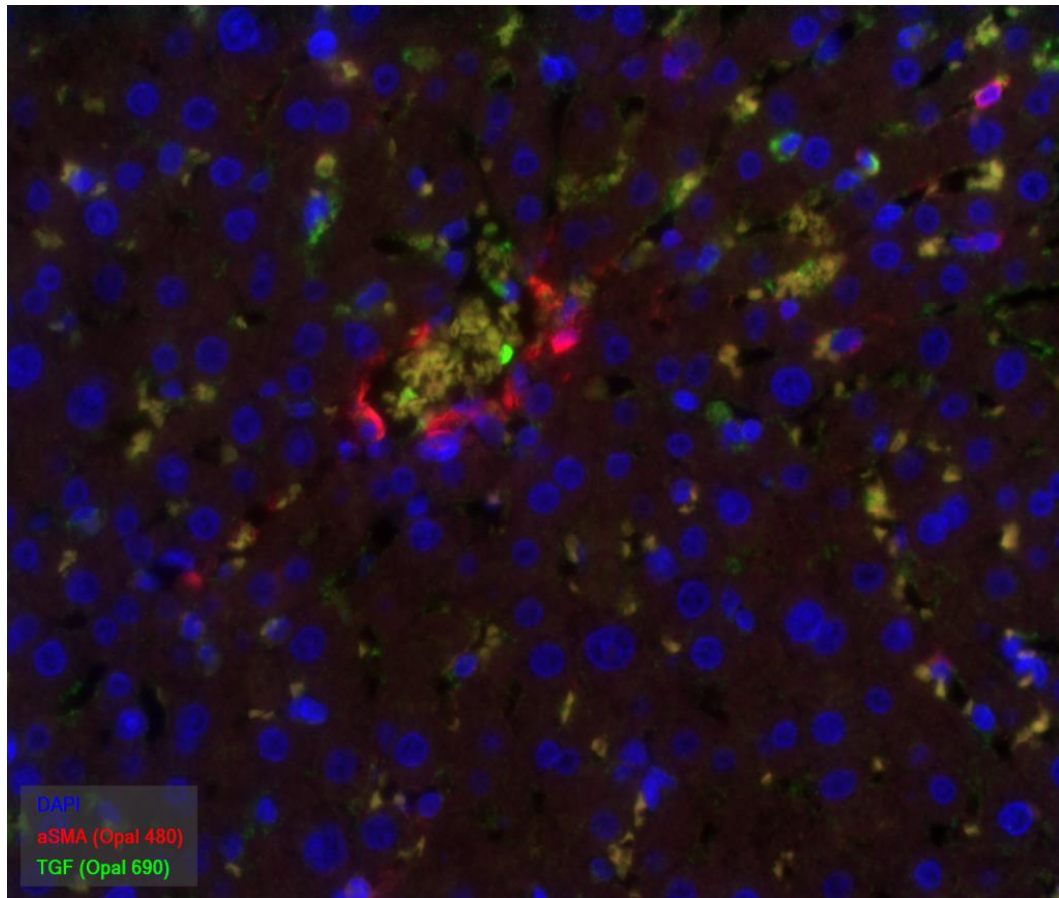


Рисунок 3.31 – Фрагмент печени контрольной группы на 7 сутки. Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование методом флуоресцентной микроскопии с антителами к маркерам-предикторам фиброгенеза  $\alpha$ -SMA (Opal 480) и TGF- $\beta$  (Opal 690). Красное ( $\alpha$ -SMA) и зеленое (TGF- $\beta$ ) флуоресцентное окрашивание в звездчатых клетках печени, а также синее свечение – DAPI – ядра, увелич.  $\times 400$

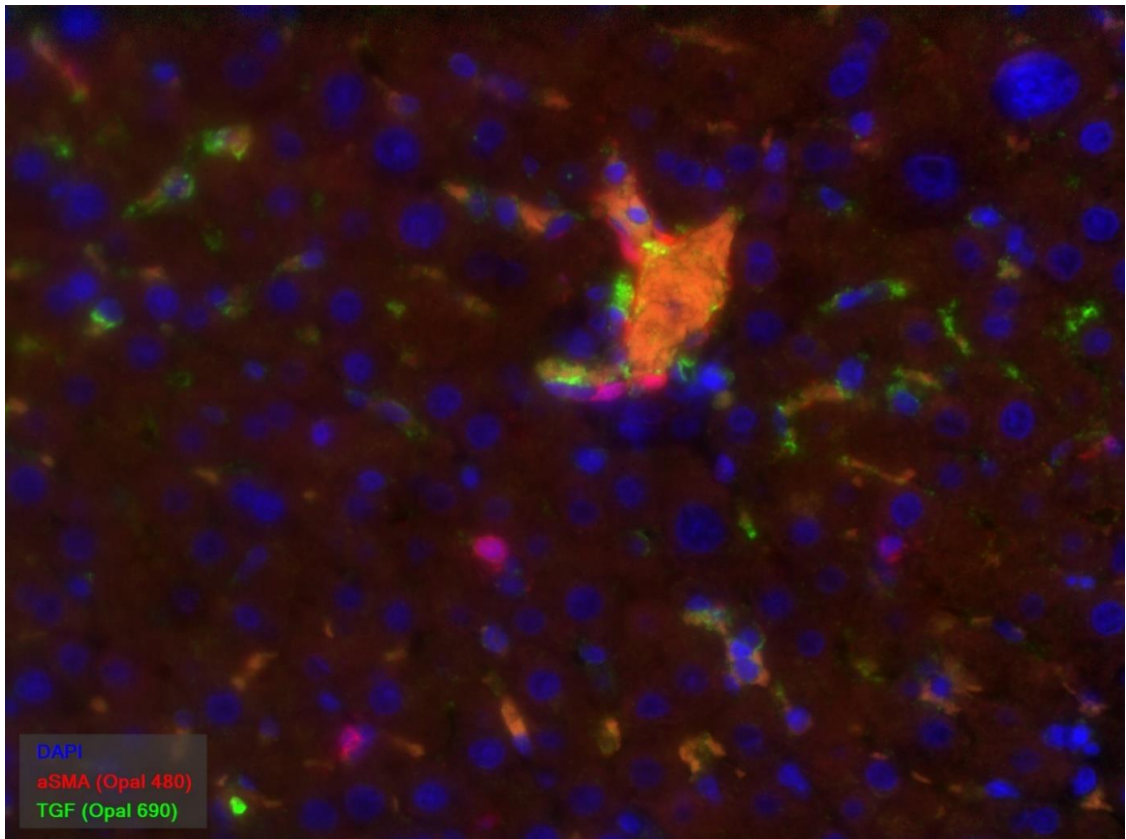


Рисунок 3.32 – Фрагмент печени на 7 сутки после локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование методом флуоресцентной микроскопии с антителами к маркерам-предикторам фиброгенеза  $\alpha$ -SMA (Opal 480) и TGF- $\beta$  (Opal 690). Красное ( $\alpha$ -SMA) и зеленое (TGF- $\beta$ ) флуоресцентное окрашивание в звездчатых клетках печени, а также синее свечение – DAPI – ядра, увелич.  $\times 400$

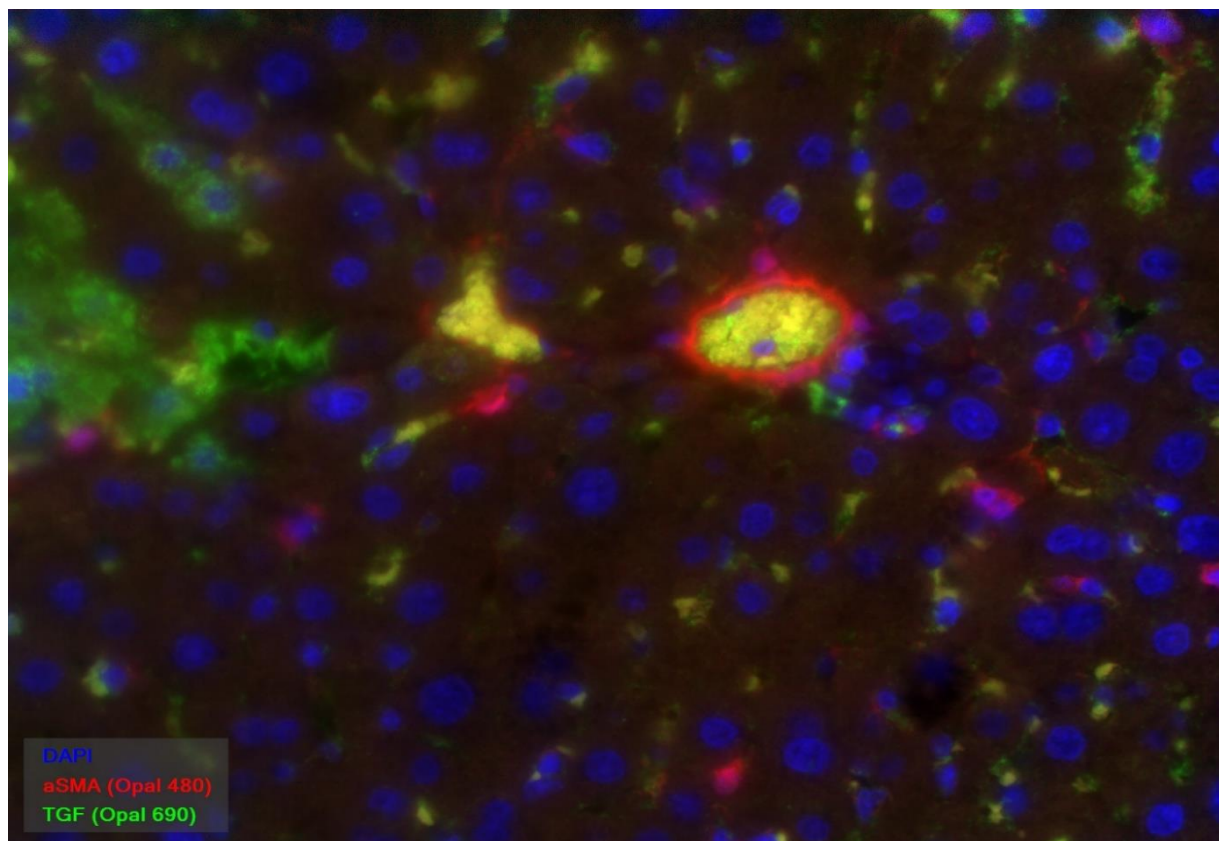


Рисунок 3.33 – Фрагмент печени на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Иммуногистохимическое (мультиплексное) исследование методом флуоресцентной микроскопии с антителами к маркерам-предикторам фиброгенеза  $\alpha$ -SMA (Opal 480) и TGF- $\beta$  (Opal 690). Красное ( $\alpha$ -SMA) и зеленое (TGF- $\beta$ ) флуоресцентное окрашивание в звездчатых клетках печени, а также синее свечение – DAPI – ядра, увелич.  $\times 400$

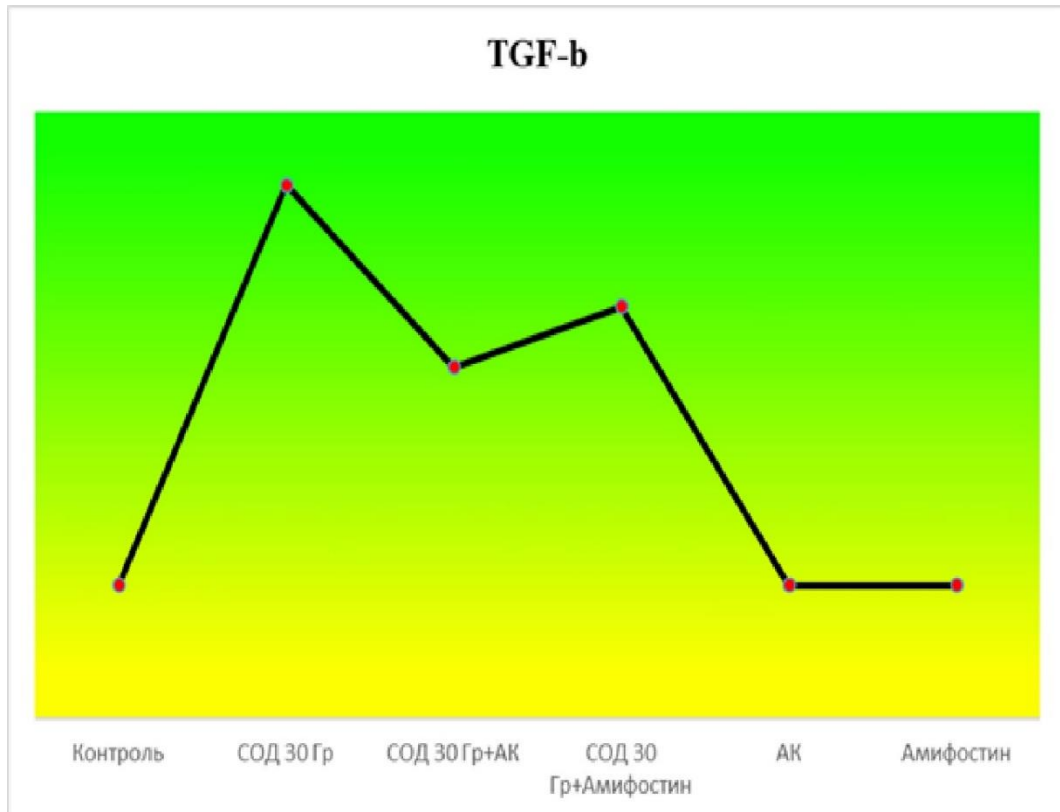


Рисунок 3.34 – Интенсивность спектра зеленого свечения Oral 690 при иммуногистохимическом исследовании методом флуоресцентной микроскопии с антителами к TGF- $\beta$  в клетках Ито на 7 сутки в контрольной и опытных группах. Группы: I – контроль, II – СОД 30Гр, III – СОД 30Гр+АК, IV - СОД 30Гр+Амифостин, V – АК, VI – Амифостин

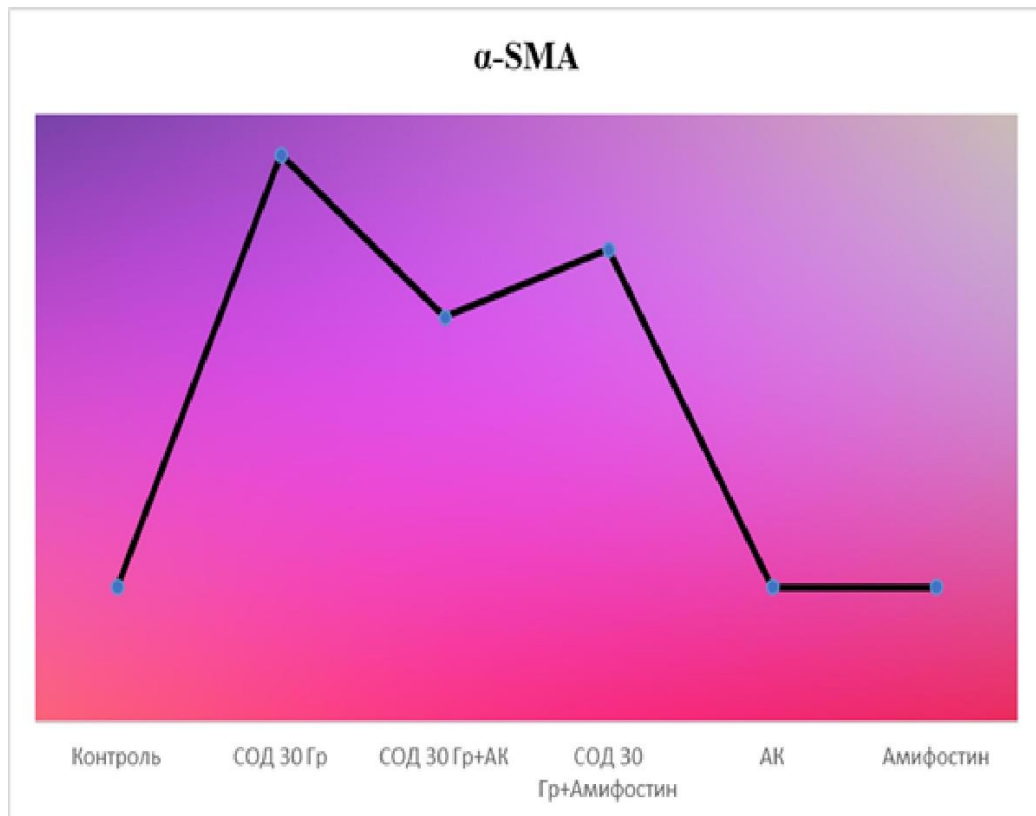


Рисунок 3.35 – Интенсивность спектра розового свечения Oral 480 при иммуногистохимическом исследовании методом флуоресцентной микроскопии с антителами к  $\alpha$ -SMA в клетках Ито на 7 сутки в контрольной и опытных группах. Группы: I – контроль, II – СОД 30Гр, III – СОД 30Гр+АК, IV - СОД 30Гр+Амифостин, V – АК, VI – Амифостин

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании проведена комплексная оценка радиационно-индуцированного повреждения печени на фоне воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр с описанием ведущих молекулярно-биологических звеньев патогенеза и апробацией новых ранних маркеров-предикторов поздних осложнений этого состояния. Кроме того, изучены механизмы, лежащие в основе радиопротективного действия аскорбиновой кислоты, а также эффективность ее применения при лучевых повреждениях этого органа.

Воздействие ионизирующего излучения на здоровые клетки печени приводит к развитию ранних (воспалительная фаза) и поздних (фибропластическая фаза) постлучевых поражений [134]. В остром периоде, в ответ на облучение происходит активация механизмов клеточной гибели, воспалительных каскадов, репаративных и антиоксидантных процессов как локально, так и системно. В большинстве случаев радиационно-индуцированного повреждения печени выраженность воспалительной реакции определяет дальнейшее течение заболевания. Так, активная репарация и полное восстановление гистоархитектоники печеночной паренхимы затруднены ввиду низкой пролиферативной активности гепатоцитов, и встречаются редко. Напротив, врачи-онкологи нередко отмечают исход острого периода радиационно-индуцированной болезни печени в фиброз печени с хронической печеночной недостаточностью у пациентов после радиотерапии по поводу злокачественных новообразований не только печени (гепатоцеллюлярная карцинома), но и других органов брюшной полости [141].

В большинстве отечественных и зарубежных рекомендаций авторы заявляют об эффективности радиотерапии гепатоцеллюлярной карциномы при воздействии фракционного облучения с суммарными очаговыми дозами 74 Гр и выше с учетом размеров опухоли, локализации, стадии и т. д. При подборе режима и доз фракционирования врачи-онкологи и радиобиологи ориентируются на индивидуальные особенности пациента, чаще всего применяя дозы 100 Гр и более

[117]. Низкие же дозы используются редко и только в контексте адъювантного симптоматического лечения паллиативных больных [9; 46; 116].

Несмотря на существующие рекомендации, некоторыми авторами в единичных исследованиях получены данные о развитии классической радиационно-индуцированной болезни печени в 5–10 % случаев уже при воздействии облучения в дозах 30–35 Гр [91]. В данных условиях эффективные дозы противоопухолевой терапии составляли 60 Гр и более, что повышает риск летального исхода до 76 % в результате быстрой декомпенсации печеночной недостаточности [116]. Высокая частота и скорость развития летального исхода напрямую зависит от степени выраженности «эффекта свидетеля» в соседних здоровых тканях, когда оксидантные цитотоксические молекулы, высвобождаемые из погибающих клеток печени, запускают аналогичные механизмы гибели в интактных клетках соседних участков паренхимы [135]. Так, в отдаленные сроки после воздействия ионизирующего излучения, происходит резкое увеличение площади лучевого поражения, снижение пула функционально-активных гепатоцитов и снижение всех функций печени, включая детоксикационную, синтетическую и др.

Тем не менее, величина токсических эффектов лучевой терапии может значительно варьировать в зависимости от вида облучения, дозы, режима фракционирования, индивидуальных особенностей организма и др. В некоторых экспериментальных исследованиях авторами доказано развитие радиационно-индуцированной болезни печени у всех (100 %) лабораторных животных при однократном воздействии X-излучения в дозе 8 Гр [168]. При этом авторы отмечали развитие общепризнанных для гепатита морфологических признаков, а именно: отека гепатоцитов, множественных кровоизлияний в паренхиме органа, а также застоя в синусоидах [64; 76; 77; 121]. Другие исследователи провели оценку гибели гепатоцитов при однократном общем воздействии  $\gamma$ -излучения в низких дозах (4 Гр) и доказали, что в ответ на облучение происходит повреждение ДНК во всех случаях (100 %) с активацией апоптотических каскадов, гибелью гепатоцитов

путем апоптоза и развитием признаков радиационно-индуцированной болезни печени [23].

По сравнению с описанными исследованиями, в настоящей работе использовали электроны в сравнительно более высоких дозах (локальное облучение электронами в СОД 30 Гр). При анализе актуальной литературы практически не обнаружено комплексных работ, посвященных изучению эффектов этого вида излучения на печень. Так, при локальном воздействии электронов в режиме фракционирования в СОД 30 Гр мы обнаружили биохимические и гистологические изменения паренхимы печени, аналогичные таковым при воздействии X- и  $\gamma$ -излучения в дозах  $<10$  Гр [103]. Учитывая это, можно говорить о значительном снижении токсичности и выраженности ранних и отсроченных негативных последствий (например, признаков развития радиационно-индуцированной болезни печени и печеночной недостаточности) при использовании этого вида облучения по сравнению с популярными на сегодняшний день X- и  $\gamma$ -лучами. Вероятно, данный факт обусловлен низкой проникающей способностью электронов, что позволяет при их применении максимально ограничить площадь повреждения и развитие «эффекта свидетеля» [48]. Важно заметить, что по результатам недавних клинических сравнительных исследований некоторые авторы неоднократно отмечали равную степень противоопухолевой эффективности и количество рецидивов при использовании электронотерапии в режимах IOERT и FLASH по сравнению с другими видами и режимами ионизирующего излучения [85; 86]. Кроме того, некоторые авторы утверждают, что эффективным методом противоопухолевой терапии является применение электронов в «очень высоких» дозах (в режиме VHEE), что практически невозможно при использовании X- и  $\gamma$ -лучей ввиду их высокой токсичности [38]. Данный факт подтверждает целесообразность рассмотрения облучения электронами в качестве аналога стандартным методам радиотерапии, однако это требует проведения новых комплексных сравнительных исследований, подобных настоящей работе (Рисунок 4.1).

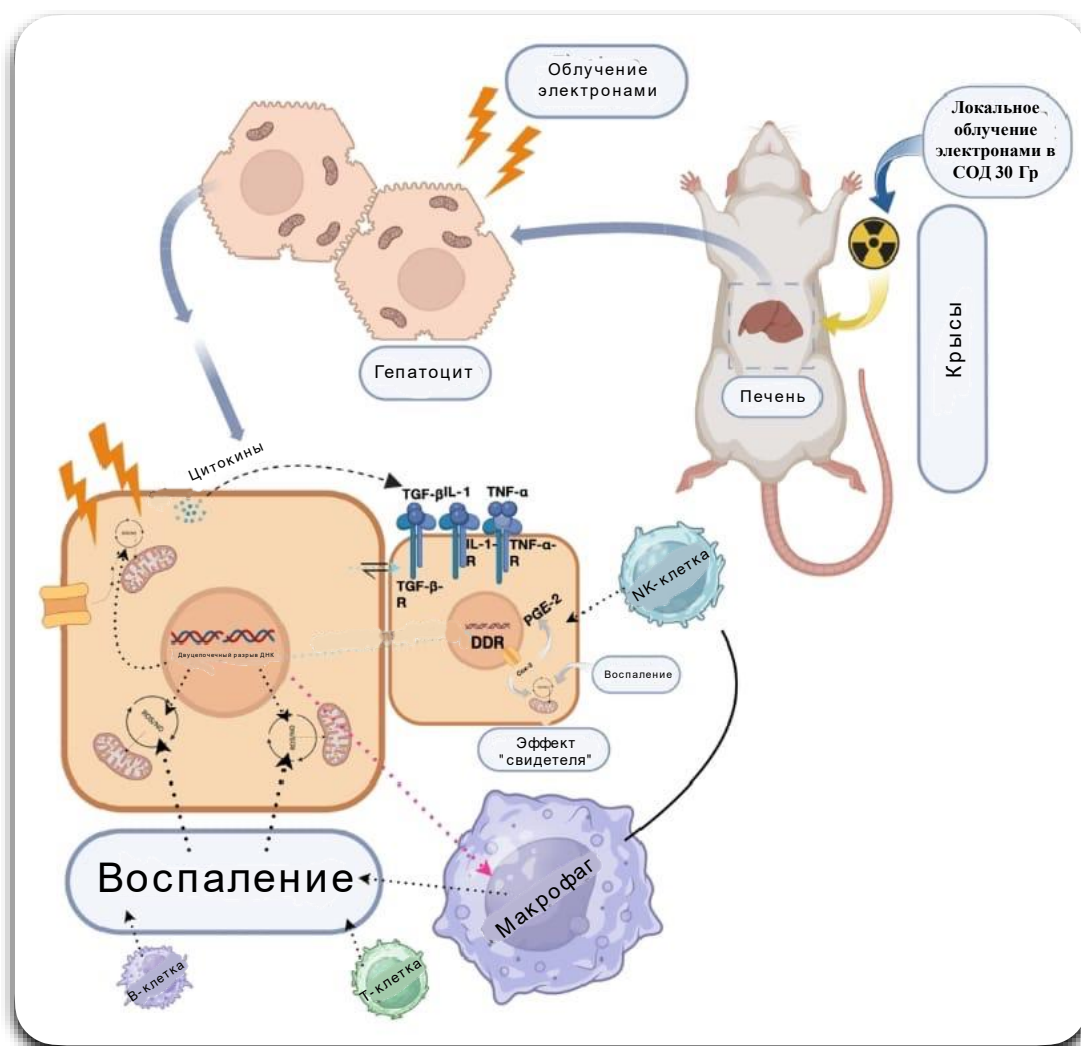


Рисунок 4.1 – Воспалительная реакция в печени в ответ на воздействие электронами, схема

Молекулярные механизмы, лежащие в основе радиационно-индуцированной болезни печени, были описаны многими авторами и являются стандартными для всех видов ионизирующего излучения, от вида излучения и органа-мишени зависит лишь степень их выраженности [29; 23; 127]. Большинство исследований продемонстрирована активация прямых и косвенных механизмов постлучевого повреждения и клеточной гибели [51; 68].

Так, прямой путь связан с накоплением нерепарируемых разрывов/сшивок ДНК, что приводит к активации miR-34a РНК, ответственной за остановку клеточного цикла в фазе G1, продукцию провоспалительных цитокинов (TNF-α,

ИЛ-1, ИЛ-6, TGF- $\beta$ ) и угнетение синтеза ферментов редокс-системы (glutathione peroxidase, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), cytochrome P450) [80; 106; 114; 119]. Вероятно, по этой причине при исследовании гомогената печени мы подтвердили резкое снижение уровня фермента эндогенной антиоксидантной защиты SOD при воздействии электронами, менее выраженное по сравнению с другими видами ионизирующего излучения [103].

Перечисленные внутриклеточные изменения приводят к активации транскрипции гена *p53*, который запускает внутренний путь апоптоза посредством белков семейства Bcl-2, происходит усиление экспрессии проапоптотических белков Bax и Bak, а также угнетение экспрессии факторов антиапоптоза Bcl-2 и Bcl-xl [135]. Они индуцируют увеличение проницаемости наружной мембраны митохондрий, что приводит к выходу цитохрома *c* в цитозоль. Цитохром *c* связывается с Araf-1 (апоптотический протеазоактивирующий фактор-1), образуя апоптосомы, которые индуцируют экспрессию гена каспазы 9. Каспаза 9, в свою очередь, активирует эффекторные каспазы, такие как фактор терминации апоптоза каспаза 3, что приводит к разрушению клетки [90; 99; 101]. Таким образом, происходит арест клеточного цикла и апоптотическая гибель гепатоцитов, обнаруженные нами при гистологическом исследовании и подтвержденные уровнями каспаза-3-иммуноокрашивания гепатоцитов при снижении пролиферативной активности (низкие значения Ki-67) в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

В то же время, косвенный путь радиационного повреждения связан с накоплением активных форм кислорода (синглетный кислород  $^1\text{O}_2$ , супероксид-анион  $\text{O}_2^-$ , гидроксильный радикал  $\text{OH}^\cdot$ , пероксид водорода  $\text{H}_2\text{O}_2$  и др.) и реактивных форм азота (оксид азота  $\text{NO}^\cdot$ , пероксинитрит  $\text{ONOO}^-$ , диоксид азота  $\text{NO}_2^-$ , нитрозильные радикалы  $\text{RNO}^\cdot$ ) в результате радиолиза внеклеточной воды, а также продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекиси липидов, малоновый диальдегид, 4-гидроксиноненаль, изопростаны) и других токсических свободных радикалов [58; 59; 130]. Это было подтверждено в нашем исследовании

результатами оценки уровня малонового диальдегида, как ключевого маркера, позволяющего судить о степени оксидативного стресса [36; 102; 129].

Таким образом, оксидативный стресс приводит к повреждению внутриклеточных макромолекул и мембран клеточных органелл, в том числе митохондрий [105; 136; 164]. Так, происходит активация как апоптотического каскада, так и других вероятных путей клеточной гибели, таких как митохондриально-опосредованный некроз и / или ферроптоз [89; 162]. Непосредственным участником и регулятором этих процессов являются MAPK-сигнальные пути p38 и JNK (доказана их активация в ответ на облучение), фосфорилирование которых при участии тиоредоксина приводит к повышению проницаемости митохондрий и еще более усиливает активность внутреннего пути апоптоза гепатоцитов [115].

Этот процесс сопровождается гибелью гепатоцитов и распространением токсических радикалов на соседние здоровые клетки («эффект наблюдателя»). Разрушение клеток приводит к формированию молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs), аденозин-трифосфата и белков теплового шока, которые являются триггерами воспалительной реакции и активаторами внешнего пути апоптоза [131; 143; 146]. Кроме того, происходит дополнительное повреждение нормальных клеток токсическими продуктами в результате активации мигрирующих в печень иммунных клеток, привлеченных цитокинами (ИЛ-1, ИЛ-6, TNF- $\alpha$ ).

В нашем исследовании экспрессия их генов значительно превышала контрольные значения, что, вероятно, связано с активацией пути NF- $\kappa$ B [24]. При этом, системные уровни концентрации основных провоспалительных цитокинов и ИЛ-10 уже на первом месяце эксперимента практически возвращались к контрольным значениям, в то время как локальная воспалительная реакция сохранялась в печени на протяжении всего эксперимента. Данный факт дает возможность говорить о хроническом воспалении печеночной паренхимы в ответ на воздействие локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, что является базисом для развития дальнейших отсроченных осложнений лучевой

терапии с развитием радиационно-индуцированного фиброза печени [71; 79; 94; 96].

Помимо гепатоцитов, к радиочувствительным клеткам относятся звездчатые клетки печени (клетки Ито, HSCs), клетки Купфера (KSs), эндотелиальные клетки (SECs), которые, так же как и иммунные клетки, в ответ на облучение способны к синтезу цитокинов (TNF- $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-4, ИЛ-10), а на более поздних стадиях радиационно-индуцированной болезни печени – факторы фиброза (в первую очередь, TGF- $\beta$ ) и репарации (VEGF, IGF-1) [151]. Например, клетки Купфера ответственны за экспрессию TNF- $\alpha$ , что приводит к повышению апоптотического индекса SECs, увеличению проницаемости капилляров для воспалительных клеток и, как следствие, к развитию капиллярно-паренхиматозного блока [135] (Рисунок 4.2).

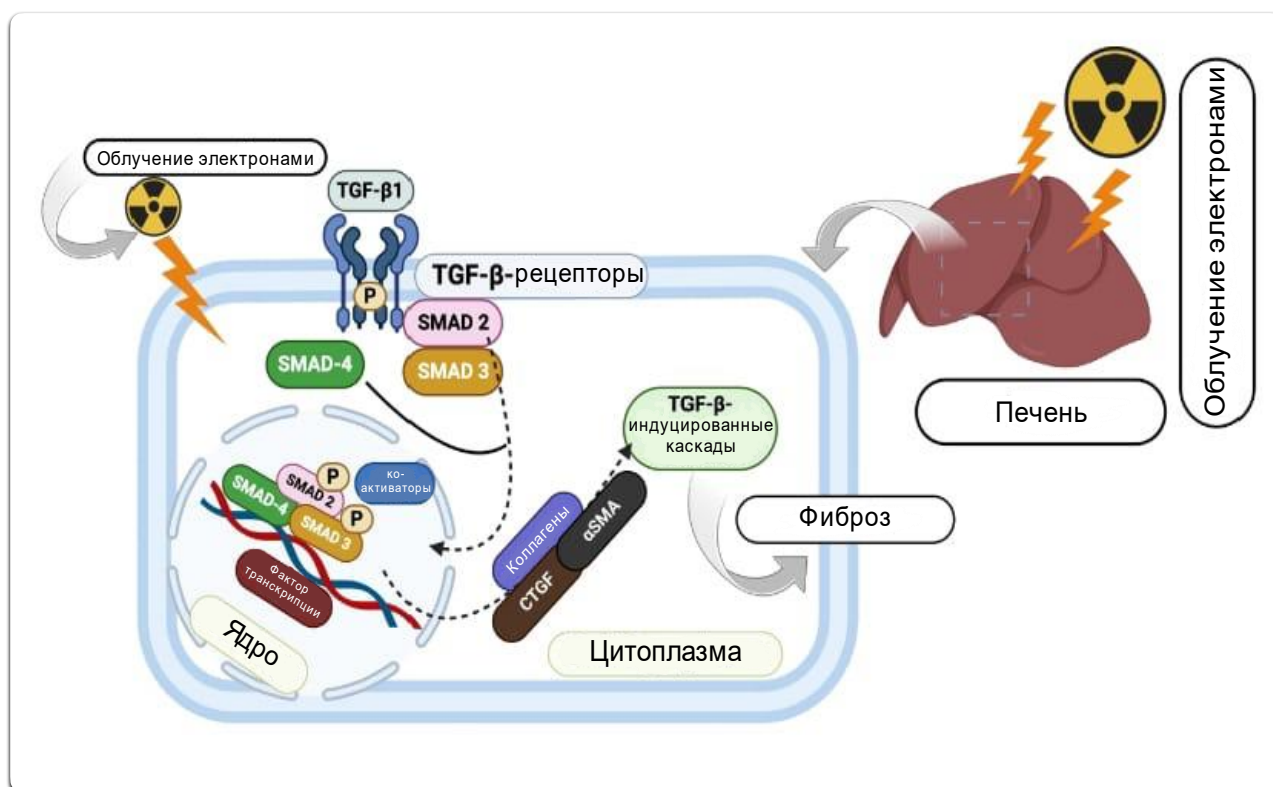


Рисунок 4.2 – Молекулярные механизмы фиброгенеза в печени после активации клеток Ито (в центре) в ответ на воздействие электронами, схема

В то же время ионизирующее излучение вызывает активацию звездчатых клеток печени, роль которых окончательно не изучена. Мультиплексная микроскопия в нашем исследовании продемонстрировала значительное увеличение экспрессии маркера активации этих клеток ( $\alpha$ -SMA) после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, что сопровождалось высокими уровнями экспрессии TGF- $\beta$ 1. Некоторые авторы предполагают, что активация этих клеток приводит к индукции фиброгенеза через экспрессию TGF- $\beta$  [165]. Возможно, под воздействием электронов данный фактор роста активирует ось TGF- $\beta$ 1/Smad/CTGF, а путь TGF- $\beta$ 1/Smad является ключевым в патогенезе радиационно-индуцированного фиброза печени как поздней стадии радиационно-индуцированной болезни печени [26]. Здесь SMAD3 выступает основным индуктором мРНК профиброгенных генов и супрессором мРНК генов антифиброза (например, ИЛ-10) [83]. Это приводит к индукции синтеза коллагеновых и ретикулярных волокон, фибронектина и других компонентов экстрацеллюлярного матрикса этими клетками через ауто- и паракринные механизмы, что способствует ремоделированию паренхимы печени и замещению поврежденных участков волокнистой соединительной тканью [84; 92]. Указанные изменения были обнаружены нами в группе воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр при гистохимическом исследовании микропрепаратов, окрашенных трихромом по Массону на третьем месяце эксперимента.

Таким образом, при сопоставлении данных мультиплексной микроскопии на ранних сроках эксперимента с результатами гистохимической оценки выраженности радиационно-индуцированного фиброза печени на третьем месяце эксперимента, можно заключить, что выбранные маркеры активации звездчатых клеток печени могут быть использованы в качестве ранних маркеров-предикторов тяжелого течения радиационно-индуцированной болезни печени и фиброза печеночной паренхимы на поздних сроках после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

Проверенным радиопротектором при радиационном воздействии является амифостин, который мы выбрали в качестве препарата сравнения в рекомендуемой

средней терапевтической дозе [31; 140]. Однако все наши методы демонстрируют некоторое преимущество в контексте сроков восстановления некоторых параметров на фоне использования аскорбиновой кислоты при радиационно-индуцированном повреждении печени, которая не уступает по большинству показателей эффективности амифостину, обладающему рядом недостатков, таких как высокая стоимость, трудность в использовании (не применяется в амбулаторных условиях), а также большого количества нежелательных лекарственных реакций (тошнота, рвота, диспепсия и др.) [149]. В связи с этим, далее речь пойдет про особенности использования аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора при воздействии электронами с раскрытием основных молекулярных механизмов ее эффективности как в отношении ранних, так и поздних осложнений лучевой терапии.

В данном исследовании в качестве радиопротектора была выбрана аскорбиновая кислота, относящаяся к группе антиоксидантов и утилизаторов свободных радикалов [140; 158; 175]. Ее антиоксидантная активность обусловлена способностью нейтрализовать активные формы кислорода (АФК) и азота (РФА), которые включают свободные радикалы и другие реактивные молекулы, такие как супероксидный анион ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $OH\cdot$ ), перекись водорода ( $H_2O_2$ ), пероксинитрит ( $ONOO^-$ ) и оксид азота ( $NO\cdot$ ). Основным механизмом антиоксидантной активности при этом заключается в способности выступать в качестве донатора электронов, благодаря чему аскорбиновая кислота может восстанавливать эти радикалы, тем самым предотвращая повреждение биологических макромолекул (липидов, белков, ДНК) токсическими продуктами оксидативного стресса [30; 50; 139].

Перечисленные свойства аскорбиновой кислоты обусловлены наличием в ее химической структуре гидроксильных групп, которые при окислении свободными радикалами (их связывании) трансформируются в аскорбатный радикал, который относительно стабилен и может быть преобразован обратно в аскорбиновую кислоту посредством ферментативных систем, таких как глутатион, тиоредоксин и аскорбат-пероксидаза, или в ходе неферментативных процессов [35; 148]. Таким

образом, аскорбиновая кислота функционирует как «ловушка» для свободных радикалов и реактивных молекул, предотвращая их реакцию с биомолекулами и защищая клетки от окислительного стресса. Более того, аскорбиновая кислота способна напрямую взаимодействовать с липидными перекисными радикалами, предотвращая перекисное окисление липидов, которое является одним из основных механизмов повреждения клеточных мембран и дисфункции клеток [41; 172].

Помимо прямого взаимодействия с АФК и РФА, аскорбиновая кислота также влияет на эндогенные антиоксидантные системы организма. Во-первых, она может восстанавливать окисленный глутатион (GSSG) обратно в его активную форму (GSH), являющуюся ключевым внутриклеточным антиоксидантом, участвующим в поддержании редокс-гомеостаза и детоксикации реактивных метаболитов [37; 66]. Во-вторых, аскорбиновая кислота способна восстанавливать токоферол, еще один важный антиоксидант, который защищает клеточные мембраны, прерывая цепные реакции перекисного окисления липидов. На молекулярном уровне в ответ на окислительный стресс аскорбиновая кислота также активирует транскрипционные факторы и ферменты, также участвующие в антиоксидантной защите. Один из таких факторов – это Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), который регулирует экспрессию генов, ответственных за синтез ферментов антиоксидантной системы, включая супероксиддисмутазу (SOD), каталазу, глутатионпероксидазу и глутатион-S-трансферазу [70]. Таким образом, аскорбиновая кислота не только непосредственно нейтрализует свободные радикалы, но и усиливает активность других антиоксидантных систем организма.

Кроме того, аскорбиновая кислота играет роль в регуляции уровня оксида азота (NO•), важной сигнальной молекулы и вазодилататора [32; 34]. В нормальных условиях NO• участвует в регуляции сосудистого тонуса, иммунной функции и нейротрансмиссии. Однако в условиях окислительного стресса избыток NO• может взаимодействовать с супероксидным анионом ( $O_2^{\cdot-}$ ), образуя токсичный пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), который индуцирует окислительное повреждение клеток. Доказана способность аскорбиновой кислоты восстанавливать NO• и

предотвращать его реакцию с супероксидом, тем самым уменьшая образование пероксинитрита и защищая клетки от его токсического действия [39; 120].

Аскорбиновая кислота также влияет на клеточные процессы, связанные с восстановлением и регенерацией тканей. Например, она стимулирует синтез коллагена посредством активации ферментов пролил- и лизилгидроксилаз, необходимых для стабилизации коллагеновых волокон, при этом индуцируя пролиферацию фибробластов [33; 122; 174]. Эти свойства имеют важное значение для восстановления тканей в ответ на повреждение, особенно в условиях окислительного стресса и воспаления. Однако, по нашим данным это свойство аскорбиновой кислоты не увеличивало степень радиационно-индуцированного фиброза печени, что может объясняться и без того высоким уровнем активности профиброгенных механизмов в печеночной паренхиме при воздействии локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

Наш выбор обусловлен не только способностью аскорбиновой кислоты связывать АФК и РФА во многих типах тканей, в том числе при облучении, но также информацией о ее способности защищать ДНК от повреждения электронами путем восстановления ионов  $\text{Cu}^{2+}$  в единичных исследованиях *in vitro* [44]. Таким образом, среди всех препаратов группы антиоксидантов аскорбиновая кислота вероятно является одним из немногих субстратов, чье действие направлено на ингибирование не только косвенного пути лучевого поражения, но и прямого пути за счет снижения количества одно- и двуцепочечных разрывов ДНК.

Стоит отметить, что аскорбиновая кислота может оказывать как положительные эффекты (радиопротекция, антиапоптотические свойства, стимулирующее влияние на репарацию и др.), так и неблагоприятные воздействия на здоровые ткани. В частности, имеются сведения о том, что введение высоких доз аскорбиновой кислоты во время радиотерапии может потенцировать развитие оксидативного стресса и усиливать эффекты лучевой терапии и способствовать рецидивирующему канцерогенезу [31; 170]. Однако для нашего исследования на основании результатов пилотного исследования была выбрана доза 50 мг/кг,

которую можно считать оптимальной благодаря высокой радиопротективной эффективности и низкому риску нежелательных лекарственных реакций.

В нашем исследовании были выявлены положительные эффекты использования аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора в модели радиационно-индуцированной болезни печени на различных уровнях организации, начиная с молекулярного и заканчивая органным. Предлучевое введение этого вещества не только улучшило морфологическое состояние печени, но и способствовало защите пролиферативно-апоптотического баланса (по результатам ИГХ-исследования с применением антител к Ki-67 и каспазе 3), а также баланса цитокинов (ИГХ-исследование про- и противовоспалительных интерлейкинов) по сравнению с группой воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Таким образом, можно утверждать, что аскорбиновая кислота проявляет не только прямые антиоксидантные и радиопротективные свойства, но также опосредованные антиапоптотические и противовоспалительные эффекты, подтвержденные в условиях *in vivo*.

Снижение апоптоза гепатоцитов при введении аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора, вероятно, связано с менее выраженным повреждением их органелл при прямом и косвенном воздействии облучения [161]. Таким образом, в клетках накапливаются дефекты, поддающиеся репарации (например, одноцепочечные разрывы / сшивки ДНК), вместо нерепарируемых повреждений (двухцепочечные разрывы / сшивки ДНК), что позволяет активировать эндогенные репаративные молекулярные механизмы взамен выхода клеток в апоптоз [44]. В нашем исследовании было установлено, что применение аскорбиновой кислоты также способствует индукции эндогенных антиоксидантных ферментов (повышает уровень супероксиддисмутазы (SOD) в ткани печени), подавлению окислительного стресса (снижает уровень MDA – маркера перекисного окисления липидов), а также увеличению содержания глутатион-S-трансферазы, глутатион-пероксидаз и каталазы, что подтверждается данными других авторов [69]. На молекулярном уровне аскорбиновая кислота способна непосредственно связывать активные формы кислорода ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH\cdot$ ,  $H_2O_2$ ) и азота ( $NO\cdot$ ,  $ONOO^-$ ), восстанавливая редокс-

гомеостаз, взаимодействовать и усиливать эффекты эндогенных низкомолекулярных антиоксидантов (таких как глутатион, токоферол и коэнзим Q10), а также индуцировать факторы транскрипции ферментов антиоксидантной системы [128]. Помимо этого, наше исследование продемонстрировало противовоспалительный эффект аскорбиновой кислоты, который проявляется в подавлении экспрессии провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, IDO-1), что связано с подавлением их транскрипции и соответствует результатам других исследований [74].

Впервые в данном исследовании мы оценили радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты в печени при воздействии локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, с исследованием отсроченных эффектов на степень радиационно-индуцированного фиброза печени ее предлучевого введения через три месяца. Несмотря на то, что это можно считать косвенными результатами, стоит отметить, что в группе, получавшей аскорбиновую кислоту, наблюдали значительное снижение выраженности фиброгенеза и печеночно-клеточной недостаточности. Этот эффект подтверждается низкой хромогенностью стромального компонента при гистохимическом окрашивании трихромом по Массону и уменьшением активации звездчатых клеток печени (на основании значимо сниженных уровней экспрессии  $\alpha$ -SMA) как ключевых участников-индукторов фиброгенной активности в печеночной паренхиме. Это сопровождается снижением экспрессии TGF- $\beta$  – ключевого фактора фиброза (в связи с подавлением оси TGF- $\beta$ 1/Smad/CTGF) и вероятным увеличением уровня IGF-1 – фактора, связанного с репарацией и регенерацией, а также маркера функциональной состоятельности и синтетической активности гепатоцитов. В сочетании, данные эффекты аскорбиновой кислоты можно назвать благоприятными, что подтверждает теорию о высокой радиопротективной активности данного субстрата.

Активация звездчатых клеток печени, которые являются ключевыми клетками, ответственными за коллагеногенез в печени, приводит к индукции экспрессии  $\alpha$ -SMA, что в свою очередь связано с формированием нового фенотипа

HSCs, экспрессирующего коллагеновые волокна [84]. Известно, что звездчатые клетки печени также способны синтезировать IGF-1, мощный митоген и индуктор пролиферации и дифференцировки гепатоцитов [61]. В нормальных условиях гепатоциты содержат небольшое количество рецепторов к IGF-1, однако при различных патологиях печени их количество может возрастать [25]. Повышенный уровень IGF-1, среди прочего, стимулирует синтез HGF в клетках Ито посредством связывания с рецепторами IGF I-го типа [45]. HGF, в свою очередь, не только является важным митогеном для гепатоцитов, но и обладает антифибротическим действием в печени, что подтверждается отдельными исследованиями *in vivo*, включая эксперименты на трансгенных крысах линии SMP8-IGF-I [61]. Более того, антифибротический эффект IGF-1 был описан в некоторых моделях цирроза печени, индуцированного CCl<sub>4</sub> [82]. Вероятно, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты до воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к увеличению транскрипции генов *IGF-1* и косвенному снижению транскрипции генов *TGF-β1* в звездчатых клетках печени в отдаленные сроки. Таким образом, уровень экспрессии IGF-1 также потенциально может быть маркером благоприятного течения и исхода радиационно-индуцированной болезни печени [97; 163]. Однако прогностическое значение этого маркера еще предстоит доказать ввиду экспрессии его рецепторов во многих тканях и разнообразия его ролей в организме [25; 54]. Таким образом, не исключено, что индукция экспрессии IGF-1 в звездчатых клетках печени способна увеличить репаративную активность гепатоцитов и ингибировать развитие фиброза печени, что не противоречит данным других авторов [56]. Это можно считать новым механизмом эффективности аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора в отдаленные сроки после воздействия облучения.

Кроме того, дальнейшие молекулярно-генетические исследования перечисленных механизмов могут сыграть решающую роль в процессе подбора таргетных препаратов для коррекции радиационно-индуцированной болезни печени у онкологических пациентов в отдаленные сроки.

## ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в исследовании проведена комплексная оценка радиационно-индуцированного поражения печени после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной дозе 30 Гр, включая описание молекулярно-биологических механизмов патогенеза ранних и отсроченных постлучевых осложнений.

Воздействие электронами приводит к развитию схожих с рентгеновским и гамма-излучением биохимических и гистологических изменений, но с незначительным риском для окружающих здоровых тканей (непопадающих непосредственно в зону облучения).

Предлучевое использование аскорбиновой кислоты в качестве радиопротектора привело к снижению степени оксидативного стресса путем связывания и утилизации свободнокислых радикалов, а также индукции маркеров эндогенной антиоксидантной защиты и восстановления редокс-гомеостаза. Это способствовало протекции гепатоцитов, предотвращению их апоптотической гибели, а также развития воспалительной реакции в печени как на раннем этапе радиационно-индуцированного повреждения печени, так и в отношении отсроченных осложнений, таких как фиброз. Это объясняется предотвращением активации звездчатых клеток печени (оцененной по уровню  $\alpha$ -SMA) и снижением экспрессии профиброгенного TGF- $\beta$ . Коэкспрессия этих маркеров определяется уже на первом месяце после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, что может использоваться в качестве раннего маркера-предиктора развития радиационно-индуцированного фиброза печени у пациентов, проходящих радиотерапию по поводу злокачественных новообразований печени и / или органов брюшной полости.

## ВЫВОДЫ

1. Локальное воздействие электронов на печень в режиме фракционирования в СОД 30 Гр через неделю приводит к баллонной дистрофии большинства гепатоцитов (вакуолизации цитоплазмы, пикнозу ядер), фокальной атрофии 1/3 – 2/3 части печеночных долек, частичному некрозу (менее 50% окружности большинства портальных трактов), клеточной воспалительной инфильтрации 1/3 – 2/3 части портальных трактов, расширению и застойным явлениям в синусоидных гемокапиллярах; оценка по шкале МИП – 9 баллов (контроль – 0 баллов). Степень выраженности морфологических изменений структур печени к 3 месяцу снижается, аналогично группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты, но уже в начале эксперимента.

2. Фракционное воздействие электронами СОД 30 Гр характеризуется прогрессированием печеночной недостаточности в течение всего времени наблюдения: повышением концентрации АЛТ –  $105,2 \pm 5,3$  ЕД/л, АСТ –  $202,1 \pm 9,7$  ЕД/л, ЩФ –  $84 \pm 4,12$  ЕД/л, признаки которой нивелируются предлучевым введением препаратов-протекторов – аскорбиновой кислоты и аминофостина.

3. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к изменениям маркеров редокс-системы на 7 сутки: повышению уровня малонового диальдегида ( $9,2 \pm 1,7$  Ед/мг белка,  $p < 0,05$ ) и снижению уровня супероксиддисмутазы ( $23,3 \pm 4,4$  нмоль/мг белка,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольными значениями, с последующим восстановлением к 3 месяцу. Аскорбиновая кислота способна усиливать систему естественной эндогенной антиоксидативной защиты, сопровождающееся незначительными отклонениями уровней малонового диальдегида и супероксиддисмутазы ( $7,0 \pm 1,4$  Ед/мг белка,  $p < 0,05$  и  $45,2 \pm 7,2$  нмоль/мг белка,  $p < 0,05$  соответственно).

4. Локальное воздействие электронами в режиме фракционирования в СОД 30 Гр приводит к снижению уровня экспрессии маркера пролиферации – Ki-67- ( $2,6 \pm 0,1\%$ ,  $p < 0,05$ ) и увеличению степени экспрессии фактора терминальной стадии апоптоза – каспаза-3- ( $12,5 \pm 0,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) в гепатоцитах на 7 сутки без

значимой тенденции к восстановлению в течение всего срока наблюдения, по сравнению с показателями контрольной группы. Также в данной группе отмечается существенное увеличение экспрессии мРНК *Bax/Bcl-2* ( $Bax - 2,9 \pm 0,14 / Bcl - 1,75 \pm 0,085$ ) в пользу первого, что предполагает запуск механизмов выхода гепатоцитов в апоптоз. При предлучевом введении аскорбиновой кислоты на 1 месяце также отмечается снижение пролиферативно-апоптотического баланса гепатоцитов:  $Ki-67 - 3,3 \pm 0,1\%$ ,  $p < 0,05$ ; каспаза-3 –  $10,3 \pm 0,5 \%$ ,  $p < 0,05$ . Однако, к концу эксперимента наблюдается полное восстановление уровня экспрессии  $Ki-67$  и каспазы-3 к контрольным значениям. Аналогичная картина визуализируется при количественной оценке генов-регуляторов клеточного цикла – *Bax* и *Bcl-2* – на 7 сутки: отмечается увеличение экспрессии мРНК *Bax* ( $2 \pm 0,097$ ) и *Bcl-2* ( $1,55 \pm 0,075$ ) с последующим возвращением данных показателей к исходным значениям на третьем месяце.

5. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к резкому увеличению количества флуоресцирующих локусов фрагментации ДНК при TUNEL-исследовании на 1 месяце – до 72% (контроль – до 1,5%), а на 3 месяце – 15%. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты уже на первой неделе демонстрирует более низкие значения TUNEL-позитивных локусов – до 9,5%. К концу эксперимента отмечено полное восстановление TUNEL-сигналинга до контрольного уровня.

6. Фракционное локальное облучение печени электронами СОД 30 Гр приводит к повышению концентрации цитокинов в сыворотке: ИЛ-1b –  $89,2 \pm 4,3$  пг/мл ( $17,3 \pm 0,8$  пг/мл); ИЛ-6 –  $60,0 \pm 2,9$  пг/мл ( $21,1 \pm 1,1$  пг/мл); TNF- $\alpha$  –  $109,3 \pm 5,1$  пг/мл ( $19,7 \pm 0,9$  пг/мл); ИЛ-10 –  $39,2 \pm 1,9$  пг/мл ( $4,4 \pm 0,2$  пг/мл) с последующим восстановлению данных показателей к третьему месяцу. Аскорбиновой кислота обеспечивает частичную протекцию цитокинового баланса при менее выраженном повышении уровней исследуемых цитокинов уже на 7 сутки по сравнению с группой монооблучения ( $p < 0,05$ ): ИЛ-1b –  $72,1 \pm 3,4$  пг/мл; ИЛ-6 –  $57,4 \pm 2,6$  пг/мл; TNF- $\alpha$  –  $95,6 \pm 4,6$  пг/мл; ИЛ-10 –  $28,9 \pm 1,4$  пг/мл. На более поздних сроках

концентрации данных цитокинов в сыворотке исследуемых групп статистически значимо не отличались от контрольных показателей.

7. При исследовании гомогената печени выявили повышение уровней экспрессии ключевых цитокинов после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр: ИЛ-1b –  $376,6 \pm 17,7$  пг/мл,  $p < 0,05$  ( $82,3 \pm 3,8$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), ИЛ-6 –  $168,3 \pm 8,1$  пг/мл,  $p < 0,05$  ( $52,4 \pm 2,4$  пг/мл,  $p < 0,05$ ), ИЛ-10 –  $188,7 \pm 9,1$  пг/мл,  $p < 0,05$  ( $49,1 \pm 2,4$  пг/мл,  $p < 0,05$ ). При этом, предлучевое введение аскорбиновой кислоты обеспечивает баланс уровней провоспалительных и противовоспалительных интерлейкинов уже в раннем периоде: ИЛ-1 –  $156,3 \pm 7,97$  пг/мл,  $p < 0,05$ , ИЛ-6 –  $93,4 \pm 4,52$  пг/мл,  $p < 0,05$ , ИЛ-10 –  $102,6 \pm 5,04$  пг/мл,  $p < 0,05$ .

8. В ответ на локальное фракционное облучение печени электронами в СОД 30 Гр происходит прогрессирующее разрастание волокнистого компонента (хромогенность трихромом по Массону – 2,7 балла, по сравнению с контрольным значением – 0,9 балла) – начальные признаки развивающегося радиационно-индуцированного фиброза. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует снижению степени выраженности фиброзирования.

9. Коэкспрессия  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  в клетках Ито активирует механизмы развития радиационно-индуцированного фиброза печени после воздействия электронов в режиме фракционирования в СОД 30 Гр, который особенно выражен к 3 месяцу. Флуоресцентный сигналинг снижен в группе предлучевого введения аскорбинкой кислоты.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. В радиобиологической, онкологической и гепатологической практике при назначении электронотерапии печени и органов брюшной полости следует учитывать дозозависимое развитие радиационно-индуцированного поражения, возможную обратимость процесса.

2. В работе врача-радиотерапевта и онколога рекомендовано применять меры профилактики печеночной недостаточности и развития фиброза, применением аскорбиновой кислоты – как предиктора.

3. Степень выраженности морфологических изменений структур печени в условии радиационно-индуцированного поражения, вызванного электронотерапией, необходимо учитывать при проведении доклинических исследований и в практике врача-патологоанатома.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаргатаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ВДФ – время—доза—фракционирование

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучение

ИЛ - интерлейкин

ЛТ – лучевая терапия

НАДН – никотинамидадениннуклеотид

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

п. зр. св. микр. – в поле зрения светового микроскопа

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОД – разовая очаговая доза

РФА – реактивные формы азота

СОД – суммарная очаговая доза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦПЭ – цепь переноса электронов

ALS – кислотолабильная субъединица (англ. acid-labile subunit)

DSB – двухнитевые разрывы ДНК (англ. double-strand breaks)

eaq- – гидратированный электрон (англ. hydrated electron)

GPx – глутатионпероксидаза (англ. glutathione peroxidase)

GSH – глутатион (англ. glutathione)

GST – глутатион-S-трансфераза (англ. glutathione S-transferase)

H• – водородный радикал (англ. hydrogen radical)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – пероксид водорода (англ. hydrogen peroxide)

HSCs – клетки Ито, (звездчатые клетки печени – англ. hepatic stellate cells)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (англ. inducible nitric oxide synthase)

IR – ионизирующее излучение (англ. ionizing radiation)

LOOH – липидный гидропероксид (англ. lipid hydroperoxide)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (англ. mitogen activated protein kinase)

MDA – малоновый диальдегид, МДА (англ. malondialdehyde)

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (англ. nuclear factor kappa B)

NOX – НАДФН-оксидаза (англ. NADPH oxidase)

O<sub>2</sub>•- – супероксид (англ. superoxide)

•OH – гидроксильный радикал (англ. hydroxyl radical)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinase)

Prx – пероксиредоксин (англ. peroxiredoxin)

RILD – англ. Radiation-induced liver disease, радиационно-индуцированная болезнь печени

SOD – супероксиддисмутаза (англ. superoxide dismutase)

SSB – однонитевые разрывы ДНК (англ. single-strand breaks)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Демяшкин, Г. А. Морфологический анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект): специальность 14.03.02 "Патологическая анатомия": диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2017. – 142 с.
2. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального  $\beta$ -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2023. – 266 с.
3. Изучение про- и антиоксидантной активностей противолучевых средств с помощью lux-биосенсоров / С. К. Абилов, Д. А. Свиридова, А. Н. Гребенюк, Е. В. Иголина, С. В. Смирнова // Радиационная биология. радиоэкология, 2019, Т. 59, № 5, С. 475–487
4. Ионизирующее излучение и его последствия для здоровья [Электронный ресурс] // Офиц. сайт Всемирной организации здравоохранения – URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-and-health-effects> (дата обращения: 21.06.2024)
5. Клинические рекомендации «Забрюшинные неорганные саркомы» // Ассоциация онкологов России. Офиц. сайт. URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/12/zabryushinnye-sarkomy.pdf> (дата обращения: 21.06.2024)
6. Клинические рекомендации «Злокачественные новообразования ободочной кишки и ректосигмоидного отдела» / Ассоциация онкологов России. Офиц. сайт. URL: <https://rrcrst.ru/content/klinicheskie-rekomendaczii/ЗНО%20ободочной%20кишки%20и%20ректосигмоидного%20отдела.pdf> (дата обращения: 21.06.2024)

7. Клинические рекомендации «Лимфома Ходжкина» / Ассоциация онкологов России. Официальный сайт. URL: <https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2021/03/limfoma-hodzhkina-2021.pdf> (дата обращения: 21.06.2024)
8. Клинические рекомендации «Нодальные Т-клеточные лимфомы у взрослых» / Ассоциация онкологов России. Официальный сайт. URL: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/nodalnye\\_t-kletochnye\\_limfomy.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/nodalnye_t-kletochnye_limfomy.pdf) (дата обращения: 21.06.2024)
9. Клинические рекомендации «Рак печени (гепатоцеллюлярный)» / Ассоциация онкологов России. Официальный сайт. URL: [https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak\\_pecheni.pdf](https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_pecheni.pdf) (дата обращения: 21.06.2024)
10. Клинические рекомендации «Холангиоцеллюлярный рак» / Ассоциация онкологов России. Официальный сайт. URL: <https://glavonco.ru/upload/iblock/f53/f5397e6bc1ce6dff4afcfc0e9b5d9507.pdf> (дата обращения: 21.06.2024)
11. Крайнов, В.П. Воздействие ионизирующего излучения на биологические ткани: учебное пособие / В. П. Крайнов. — Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект», 2022. — 95 с.
12. Морозик, П. М. Эффект свидетеля — его общеприкладное и биологическое значение / П. М. Морозик, С. Б. Мельнов // Проблемы здоровья и экологии. — 2004. — Т. 1. — № 2. — С. 7–16.
13. Морфофункциональная характеристика печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2024. — Т. 21, № 2. — С. 134-140.
14. Особенности пролиферации и апоптоза клеток поджелудочной железы после введения N-ацетилцистеина в модели острого постлучевого панкреатита / Г. А. Демяшкин, Д. А. Атякшин, Д. И. Угурчиева [и др.] // Молекулярная медицина. — 2024. — Т. 22, № 3. — С. 40-44.
15. Особенности эндокринного аппарата поджелудочной железы после введения n-ацетилцистеина в модели острого постлучевого панкреатита / Г. А.

Демяшкин, Д. И. Угурчиева, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2024. – № 2. – С. 166-175.

16. Оценка воспалительной реакции после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, В. А. Якименко, М. А. Вадюхин, Д. И. Угурчиева // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2024. – № 3. – С. 98–106.

17. Парфенов, А.А. Гепатопротекторные свойства конъюгата Ксимедона с L-аскорбиновой кислотой: специальность 1.05.04 "Биохимия": диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Парфенов А.А. – Казань, 2023. – 154 с.

18. Пролиферация и апоптоз гепатоцитов крыс после локального облучения электронами / В. А. Якименко, Д. И. Угурчиева, М. А. Вадюхин, Г. А. Демяшкин // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 143-144.

19. Характеристика пролиферации и апоптоза гепатоцитов после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита / Г. А. Демяшкин, Д. А. Атякшин, В. А. Якименко [и др.] // Морфология. – 2023. – Т. 161, № 3. – С. 31-38.

20. Характеристика стромального компонента печени после введения аскорбиновой кислоты в модели лучевого гепатита// Г.А. Демяшкин, В.А. Якименко, М.А. Вадюхин, Д.И. Угурчиева, С.Н. Корякин // Биомедицина. – 2024. – Т. 20, № 4. – С. 70-77. – DOI: 10.33647/2074-5982-20-4-70-77 [ВАК].

21. A mouse radiation-induced liver disease model for stereotactic body radiation therapy validated in patients with hepatocellular carcinoma / Z. F. Wu, J. Y. Zhang, X. Y. Shen [et al.] // Med Phys. — 2016. — Vol. 43. — P. 4349.

22. A new mouse model of radiation-induced liver disease reveals mitochondrial dysfunction as an underlying fibrotic stimulus / N. Melin, T. Yarahmadov, D. Sanchez-Taltavull [et al.] // JHEP Rep. — 2022. — Vol. 4 — № 7. — P. 100508.

23. Abdel-Aziz, N. Low-Dose Gamma Radiation Modulates Liver and Testis Tissues Response to Acute Whole Body Irradiation / N. Abdel-Aziz, R. A. Haroun, H. E. Mohamed // Dose Response. — 2022. — Vol. 20. – № 2. — С. 15593258221092365.

24. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor / C. Linard, C. Marquette, J. Mathieu [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* — 2004. — Vol. 58. — P. 427–434.
25. Adamek, A. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases / A. Adamek, A. Kasprzak // *Int J Mol Sci.* — 2018. — Vol. 19 — № 5. — P. 1308.
26. Advances in pathogenic mechanisms and management of radiation-induced fibrosis / B. Wang, J. Wei, L. Meng [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* — 2020. — Vol. 121. — P. 109560.
27. Advances in radiotherapy and immunity in hepatocellular carcinoma / Y. Yang, L. Xiong, M. Li [et al.] // *J Transl Med.* — 2023. — Vol. 21. — P. 526.
28. Ahotupa, M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis / M. Ahotupa // *Free Radic. Res.* — 2017. — Vol. 51. — P. 439–447.
29. Amelioration of radiation-induced liver damage by p-coumaric acid in mice / Y. H. Li, J. X. Wu, Q. He [et al.] // *Food Sci Biotechnol.* — 2022. — Vol. 31 — № 10. — P. 1315–1323.
30. Arrigoni, O. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant / O. Arrigoni, M. C. De Tullio // *Biochim Biophys Acta.* — 2002. — Vol. 1569 — № 1-3. — P. 1–9.
31. Ascorbic acid does not reduce the anticancer effect of radiotherapy / Y. Hosokawa, R. Saga, S. Monzen [et al.] // *Biomed Rep.* — 2017. — Vol. 6 — № 1. — P. 103–107.
32. Ascorbic acid enhances endothelial nitric-oxide synthase activity by increasing intracellular tetrahydrobiopterin / A. Huang, J. A. Vita, R. C. Venema, J. F. Keaney Jr. // *J Biol Chem.* — 2000. — Vol. 275 — № 23. — P. 17399–17406.
33. Ascorbic acid promotes a TGFβ1-induced myofibroblast phenotype switch / B. Piersma, O. Y. Wouters, S. de Rond [et al.] // *Physiol Rep.* — 2017. — Vol. 5 — № 17. — P. e13324.
34. Ascorbic Acid vs Calcitriol in Influencing Monocyte Chemoattractant Protein-1, Nitric Oxide, Superoxide Dismutase, as Markers of Endothelial Dysfunction:

In Vivo Study in Atherosclerosis Rat Model / T. Heriansyah, H. Dimiati, T. F. Hadi [et al.] // *Vasc Health Risk Manag.* — 2023. — Vol. 19. — P. 139–144.

35. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties / D. Njus, P. M. Kelley, Y. J. Tu [et al.] // *Free Radic Biol Med.* — 2020. — Vol. 159. — P. 37–43.

36. Assessment of Oxidative Stress by the Estimation of Lipid Peroxidation Marker Malondialdehyde (MDA) in Patients with Chronic Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis / K. Mohideen, K. Chandrasekar, S. Ramsridhar [et al.] // *Int J Dent.* — 2023. — Vol. 2023. — P. 6014706.

37. Averill-Bates, D. A. The antioxidant glutathione / D. A. Averill-Bates // *Vitam Horm.* — 2023. — Vol. 121. — P. 109–141.

38. Back to the Future: Very High-Energy Electrons (VHEEs) and Their Potential Application in Radiation Therapy / M. G. Ronga, M. Cavallone, A. Patriarca [et al.] // *Cancers (Basel).* — 2021. — Vol. 13 — № 19. — P. 4942.

39. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress / T. Heitzer, B. Finckh, S. Albers [et al.] // *Free Radic Biol Med.* — 2001. — Vol. 31 — № 1. — P. 53–61.

40. Berberine as a natural modulator of inflammatory signaling pathways in the immune system: Focus on NF- $\kappa$ B, JAK/STAT, and MAPK signaling pathways / S. M. Haftcheshmeh, M. Abedi, K. Mashayekhi [et al.] // *Phytother Res.* — 2022. — Vol. 36 — № 3. — P. 1216–1230.

41. Blokhina, O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt // *Ann Bot.* — 2003. — Vol. 91 — № 2. — P. 179–194.

42. Both MAPK and STAT3 signal transduction pathways are necessary for IL-6-dependent hepatic stellate cells activation / P. Kagan, M. Sultan, I. Tachlytski [et al.] // *PLoS One.* — 2017. — Vol. 12 — № 5. — P. e0176173.

43. Burton, D. G. A. Cellular senescence: Immunosurveillance and immunoregulation / D. G. A. Burton, A. Stolzing // *Inflamm Regen.* — 2018. — Vol. 38. — P. 11.

44. Cai, L. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper / L. Cai, J. Koropatnick, M. G. Cherian // *Chem Biol Interact.* — 2001. — Vol. 137 — № 1. — P. 75–88.
45. Characterization of the IGF axis components in isolated rat hepatic stellate cells / J. G. Scharf, T. Knittel, F. Dombrowski [et al.] // *Hepatology.* — 1998. — Vol. 27. — P. 1275–1284.
46. Chen, C. P. Role of Radiotherapy in the Treatment of Hepatocellular Carcinoma / C. P. Chen // *J Clin Transl Hepatol.* — 2019. — Vol. 7 — № 2. — P. 183–190.
47. Clinical significance of radiation-induced liver disease after stereotactic body radiation therapy for hepatocellular carcinoma / B. G. Jun, Y. D. Kim, G. J. Cheon [et al.] // *Korean J Intern Med.* — 2018. — Vol. 33. — P. 1093–1102.
48. Comparison of proton and electron radiation effects on biological responses in liver, spleen and blood / D. S. Gridley, T. L. Freeman, A. Y. Makinde [et al.] // *Int J Radiat Biol.* — 2011. — Vol. 87 — № 12. — P. 1173–1181.
49. Cox, J. D. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) / J. D. Cox, J. Stetz, T. F. Pajak // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* — 1995. — Vol. 31 — № 5. — P. 1341–1346.
50. De Tullio, M. C. Hopes, disillusion and more hopes from vitamin C / M. C. De Tullio, O. Arrigoni // *Cell Mol Life Sci.* — 2004. — Vol. 61 — № 2. — P. 209–219.
51. DNA Damage by Radiopharmaceuticals and Mechanisms of Cellular Repair / Y. Khazaei Monfared, P. Heidari, S. J. Klempner [et al.] // *Pharmaceutics.* — 2023. — Vol. 15 — № 12. — P. 2761.
52. Dörr, W. Amifostine as a cytoprotector in radiotherapy / W. Dörr // *Oncology Research.* — 2000. — Vol. 12 — № 3. — P. 289–299.
53. Dosimetry for New Radiation Therapy Approaches Using High Energy Electron Accelerators / K. Kokurewicz, A. Schüller, E. Brunetti [et al.] // *Front. Phys.* — 2020. — Vol. 8. — P. 568302.

54. Dual Characters of GH-IGF1 Signaling Pathways in Radiotherapy and Post-radiotherapy Repair of Cancers / Y. Cheng, W. Li, R. Gui [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* — 2021. — Vol. 9. — P. 671247.
55. Effect of Oxidative Stress on Cardiovascular System in Response to Gravity / K. Takahashi, H. Okumura, R. Guo [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* — 2017. — Vol. 18. — P. 1426.
56. Effects and potential mechanisms of IGF1/IGF1R in the liver fibrosis: A review / R. Gui, W. Li, Z. Li [et al.] // *Int J Biol Macromol.* — 2023. — Vol. 251. — P. 126263.
57. Effects of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  gamma Irradiation on the Reproductive Function of *Caenorhabditis elegans* / F. Cui, N. Ma, X. Han [et al.] // *Dose-Response.* — 2019. — Vol. 17. — P. 1–6.
58. Effects of ionizing radiation on biological molecules—mechanisms of damage and emerging methods of detection / J. A. Reisz, N. Bansal, J. Qian [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* — 2014. — Vol. 21 — № 2. — P. 260–292.
59. Effects of low-dose/high-dose-rate X-irradiation on oxidative stress in organs following forced swim test and its combined effects on alcohol-induced liver damage in mice / S. Naoe, Y. Fujimoto, K. Murakami [et al.] // *J Radiat Res.* — 2023. — Vol. 64 — № 4. — P. 635–643.
60. Exosome-mediated microRNA transfer plays a role in radiation-induced bystander effect / S. Xu, J. Wang, N. Ding [et al.] // *RNA Biol.* — 2015. — Vol. 12. — P. 1355–1363.
61. Expression of insulin-like growth factor I by activated hepatic stellate cells reduces fibrogenesis and enhances regeneration after liver injury / S. Sanz, J. B. Pucilowska, S. Liu [et al.] // *Gut.* — 2005. — Vol. 54 — № 1. — P. 134–141.
62. Extracellular vesicles transfer nuclear Abl-dependent and radiation-induced miR-34c into unirradiated cells to cause bystander effects / S. Rastogi, A. Hwang, J. Chan [et al.] // *Mol Biol Cell.* — 2018. — Vol. 29. — P. 2228–2242.

63. Ferroptosis: A novel regulated cell death participating in cellular stress response, radiotherapy, and immunotherapy / C. Liang, X. Zhang, M. Yang [et al.] // *Exp Hematol Oncol*. — 2022. — Vol. 11 — № 1. — P. 19.
64. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis / R. G. Knodell, K. G. Ishak, W. C. Black [et al.] // *Hepatology*. — 1981. — Vol. 1 — № 5. — P. 431–435.
65. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice / K. Tomita, T. Teratani, T. Suzuki [et al.] // *Hepatology*. — 2014. — Vol. 59 — № 1. — P. 154–169.
66. Fujii, J. Ascorbate Is a Primary Antioxidant in Mammals / J. Fujii, T. Osaki, T. Bo // *Molecules*. — 2022. — Vol. 27 — № 19. — P. 6187.
67. Fujita, T. Roles of hepatic stellate cells in liver inflammation: a new perspective / T. Fujita, S. Narumiya // *Inflamm Regen*. — 2016. — Vol. 36. — P. 1.
68. Gebicki, J. M. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides / J. M. Gebicki // *Arch. Biochem. Biophys*. — 2016. — Vol. 595. — P. 33–39.
69. Gegotek, A. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid / A. Gegotek, E. Skrzydlewska // *Antioxidants*. — 2022. — Vol. 11. — P. 1993.
70. Gęgotek, A. Ascorbic acid as antioxidant / A. Gęgotek, E. Skrzydlewska // *Vitam Horm*. — 2023. — Vol. 121. — P. 247–270.
71. Hammerich, L. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis / L. Hammerich, F. Tacke // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. — 2023. — Vol. 20 — № 10. — P. 633–646.
72. Helm, J. S. Adverse outcome pathways for ionizing radiation and breast cancer involve direct and indirect DNA damage, oxidative stress, inflammation, genomic instability, and interaction with hormonal regulation of the breast / J. S. Helm, R. A. Rudel // *Arch Toxicol*. — 2020. — Vol. 94 — № 5. — P. 1511–1549.
73. Hepatocyte growth factor gene-modified adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate radiation-induced liver damage in a rat model / J. Zhang, S. Zhou, Y. Zhou [et al.] // *PloS ONE*. — 2014. — Vol. 9. — P. e114670.

74. Hepatoprotective benefits of vitamin C against perfluorooctane sulfonate-induced liver damage in mice through suppressing inflammatory reaction and ER stress / M. Su, X. Liang, X. Xu [et al.] // *Env. Toxicol Pharm.* — 2019. — Vol. 65. — P. 60–65.
75. Higashi, T. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis / T. Higashi, S. L. Friedman, Y. Hoshida // *Adv Drug Deliv Rev.* — 2017. — Vol. 121. — P. 27–42.
76. Histological activity despite normal ALT and IgG serum levels in patients with autoimmune hepatitis and cirrhosis / A. Laschtowitz, K. Zachou, V. Lygoura [et al.] // *JHEP Rep.* — 2021. — Vol. 3 — № 4. — P. 100321.
77. Histological grading and staging of liver and its relation to viral loads in chronic anti-HBe positive hepatitis / S. Shafaei, S. Soleimani Amiri, M. Hajiahmadi [et al.] // *Caspian J Intern Med.* — 2013. — Vol. 4 — № 3. — P. 681–685.
78. Hydronidone ameliorates liver fibrosis by inhibiting activation of hepatic stellate cells via Smad7-mediated degradation of TGF $\beta$ RI / X. Xu, Y. Guo, X. Luo [et al.] // *Liver Int.* — 2023. — Vol. 43 — № 11. — P. 2523–2537.
79. Immune mechanisms linking metabolic injury to inflammation and fibrosis in fatty liver disease - novel insights into cellular communication circuits / M. Peiseler, R. Schwabe, J. Hampe [et al.] // *J Hepatol.* — 2022. — Vol. 77 — № 4. — P. 1136–1160.
80. Immunohistochemical and histochemical analysis of the rat skin after local electron irradiation / G. Demyashkin, Y. Shapovalova, A. Marukyan [et al.] // *Open Vet J.* — 2023. — Vol. 13 — № 12. — P. 1570–1582.
81. Impact of combining vitamin C with radiation therapy in human breast cancer: does it matter? / S. Khazaei, L. Nilsson, G. Adrian [et al.] // *Oncotarget.* — 2022. — Vol. 13. — P. 439–453.
82. Insulin-like growth factor-1 attenuates oxidative stress-induced hepatocyte premature senescence in liver fibrogenesis via regulating nuclear p53-progerin interaction / X. Luo, X. Jiang, J. Li [et al.] // *Cell Death Dis.* — 2019. — Vol. 10 — № 6. — P. 451.
83. Interleukin-10 Attenuates Liver Fibrosis Exacerbated by Thermoneutrality / H. T. Nga, J. S. Moon, J. Tian [et al.] // *Front Med (Lausanne).* — 2021. — Vol. 8. — P. 672658.

84. Interleukin-10 induces senescence of activated hepatic stellate cells via STAT3-p53 pathway to attenuate liver fibrosis / Y. H. Huang, M. H. Chen, Q. L. Guo [et al.] // *Cell Signal.* — 2020. — Vol. 66. — P. 109445.
85. Intra-Operative Electron Radiation Therapy: An Update of the Evidence Collected in 40 Years to Search for Models for Electron-FLASH Studies / F. A. Calvo, J. Serrano, M. Cambeiro [et al.] // *Cancers (Basel).* — 2022. — Vol. 14 — № 15. — P. 3693.
86. Intraoperative radiation therapy induces immune response activity after pancreatic surgery / Y. S. Lee, H. S. Kim, Y. Cho [et al.] // *BMC Cancer.* — 2021. — Vol. 21 — № 1. — P. 1097.
87. Ionizing Radiation-Induced Cellular Senescence in Normal, Non-transformed Cells and the Involved DNA Damage Response: A Mini Review / M. Li, L. You, J. Xue [et al.] // *Front Pharmacol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 522.
88. JAK-STAT signaling in inflammation and stress-related diseases: implications for therapeutic interventions / A. Sarapultsev, E. Gusev, M. Komelkova [et al.] // *Mol Biomed.* — 2023. — Vol. 4 — № 1. — P. 40.
89. Jiao, Y. Radiation-induced Cell Death and Its Mechanisms / Y. Jiao, F. Cao, H. Liu // *Health Phys.* — 2022. — Vol. 123 — № 5. — P. 376–386.
90. Kashyap, D. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis / D. Kashyap, V. K. Garg, N. Goel // *Adv Protein Chem Struct Biol.* — 2021. — Vol. 125. — P. 73–120.
91. Kim, J. Radiation-induced liver disease: current understanding and future perspectives / J. Kim, Y. Jung // *Exp Mol Med.* — 2017. — Vol. 49 — № 7. — P. e359.
92. Kinsenoside Protects Against Radiation-Induced Liver Fibrosis via Downregulating Connective Tissue Growth Factor Through TGF- $\beta$ 1 Signaling / X. Nie, Q. Yu, L. Li [et al.] // *Front Pharmacol.* — 2022. — Vol. 13. — P. 808576.
93. Kisseleva, T. Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis / T. Kisseleva, D. A. Brenner // *J Clin Invest.* — 2013. — Vol. 123 — № 5. — P. 1903–1910.

94. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. — 2021. — Vol. 18 — № 3. — P. 151–166.
95. Klaunig, J. E. Oxidative Stress and Cancer / J. E. Klaunig // *Curr. Pharm. Des.* — 2018. — Vol. 24. — P. 4771–4778.
96. Koyama, Y. Liver inflammation and fibrosis / Y. Koyama, D. A. Brenner // *J Clin Invest*. — 2017. — Vol. 127 — № 1. — P. 55–64.
97. Late Health Effects of Partial Body Irradiation Injury in a Minipig Model Are Associated with Changes in Systemic and Cardiac IGF-1 Signaling / B. Hritz, S. Y. Aghdam, B. Legesse [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2021. — Vol. 22 — № 6. — P. 3286.
98. Liver sinusoidal endothelial and biliary cell repopulation following irradiation and partial hepatectomy / P. Krause, M. Rave-Fränk, H. A. Wolff [et al.] // *World J Gastroenterol*. — 2010. — Vol. 16 — № 31. — P. 3928–3935.
99. Lossi, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis / L. Lossi // *Biochem J*. — 2022. — Vol. 479 — № 3. — P. 357–384.
100. Lumniczky, K. Mechanisms of Radiation Toxicity in Transformed and Non-Transformed Cells / K. Lumniczky, G. Safrany // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2015. — Vol. 16 — № 6. — P. 13311–13320.
101. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis / Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim [et al.] // *Tumour Biol*. — 2016. — Vol. 37 — № 7. — P. 8471–8486.
102. Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update / R. Cordiano, M. Di Gioacchino, R. Mangifesta [et al.] // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28 — № 16. — P. 5979.
103. Mangosteen hinders gamma radiation-mediated oxidative stress and liver injury by down-regulating TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B and pro-fibrotic factor TGF- $\beta$ 1 inducing inflammatory signaling / A. A. Hassan, E. M. Moustafa, I. H. El-Khashab [et al.] // *Dose Response*. — 2021. — Vol. 19. — P. 15593258211025190.

104. Manna, P. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies / P. Manna, S. K. Jain // *Metab. Syndr. Relat. Disord.* — 2015. — Vol. 13. — P. 423–444.

105. Mechanisms and applications of radiation-induced oxidative stress in regulating cancer immunotherapy / Z. Zheng, J. Su, X. Bao [et al.] // *Front Immunol.* — 2023. — Vol. 14. — P. 1247268.

106. Metformin counters oxidative stress and mitigates adverse effects of radiation exposure: An overview / E. Karmanova, A. Chernikov, A. Usacheva [et al.] // *Fundam Clin Pharmacol.* — 2023. — Vol. 37 — № 4. — P. 713–725.

107. MiR-495 functions as an adjuvant to radiation therapy by reducing the radiation-induced bystander effect / J. Fu, M. Jiang, M. Zhang [et al.] // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* — 2016. — Vol. 48. — P. 1026–1033.

108. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson [et al.] // *Cell Death Differ.* — 2018. — Vol. 25 — № 3. — P. 486–541.

109. Multiple Effects of Ascorbic Acid against Chronic Diseases: Updated Evidence from Preclinical and Clinical Studies / M. Berretta, V. Quagliariello, N. Maurea [et al.] // *Antioxidants.* — 2020. — Vol. 9 — № 12. — P. 1182.

110. Munoz-Schuffenegger, P. Radiation-Induced Liver Toxicity / P. Munoz-Schuffenegger, S. Ng, L. A. Dawson // *Semin Radiat Oncol.* — 2017. — Vol. 27 — № 4. — P. 350–357.

111. Nair, C. K. Radioprotectors in radiotherapy / C. K. Nair // *Journal of Radiation Research.* — 2001. — Vol. 42 — № 1. — P. 21–37.

112. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* — 2017. — Vol. 2. — P. 17023.

113. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer / T. Zhang, C. Ma, Z. Zhang [et al.] // *MedComm.* — 2021. — Vol. 2 — № 4. — P. 618–653.

114. Novel Molecular Mechanisms Underlying the Ameliorative Effect of Platelet-Rich Plasma against Electron Radiation-Induced Premature Ovarian Failure / G.

Demyashkin, M. Vadyukhin, Z. Murtazaliev [et al.] // *Int J Mol Sci.* — 2024. — Vol. 25 — № 18. — P. 10115.

115. Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of N-acetyl-L-cysteine against  $\gamma$ -radiation-induced premature ovarian failure in rats / E. M. Mantawy, R. S. Said, D. H. Kassem [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* — 2020. — Vol. 206. — P. 111190.

116. Nuszkievicz, J. Ionizing Radiation as a Source of Oxidative Stress—The Protective Role of Melatonin and Vitamin D / J. Nuszkievicz, A. Woźniak, K. Szewczyk-Golec // *Int J Mol Sci.* — 2020. — Vol. 21 — № 16. — P. 5804.

117. Optimal stereotactic body radiotherapy dosage for hepatocellular carcinoma: a multicenter study / T. S. Su, Q. H. Liu, X. F. Zhu [et al.] // *Radiat Oncol.* — 2021. — Vol. 16 — № 1. — P. 79.

118. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease / C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot [et al.] // *Redox Biol.* — 2018. — Vol. 14. — P. 450–464.

119. Oxidative Stress in Radiation-Induced Cardiotoxicity / Z. Ping, Y. Peng, H. Lang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* — 2020. — Vol. 2020. — P. 3579143.

120. Oxidative Stress in Wistar Rats Under Acute Restraint Stress and Its Modulation by Antioxidants and Nitric Oxide Modulators / G. Pal, H. P. Mishra, T. K. Suvvari [et al.] // *Cureus.* — 2023. — Vol. 15 — № 8. — P. e43333.

121. Parveen, S. Histology activity index: a benchmark for decision making / S. Parveen, A. Tiwari, A. Ashraf // *Hepatol Int.* — 2022. — Vol. 16. — P. 479.

122. Phillips, C. L. Effects of ascorbic acid on proliferation and collagen synthesis in relation to the donor age of human dermal fibroblasts / C. L. Phillips, S. B. Combs, S. R. Pinnell // *J Invest Dermatol.* — 1994. — Vol. 103 — № 2. — P. 228–232.

123. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment / F. M. Di Maggio, L. Minafra, G. I. Forte [et al.] // *J Inflamm.* — 2015. — Vol. 12. — P. 14.

124. Pospisil, P. Mechanism of the Formation of Electronically Excited Species by Oxidative Metabolic Processes: Role of Reactive Oxygen Species / P. Pospisil, A. Prasad, M. Rac // *Biomolecules.* — 2019. — Vol. 9. — P. 258.

125. Prauchner, C. A. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy / C. A. Prauchner // *Burns*. — 2017. — Vol. 43. — P. 471–485.

126. Presence of Stromal Cells Enhances Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) Induction in Lung Bronchial Epithelium after Protracted Exposure to Oxidative Stress of Gamma Radiation / A. Acheva, S. Haghdoost, A. Sollazzo [et al.] // *Oxidative Med. Cell. Longev.* — 2019. — Vol. 2019. — P. 1–14.

127. Prognostic analysis of radiation-induced liver damage following carbon-ion radiotherapy for hepatocellular carcinoma / K. Hayashi, O. Suzuki, Y. Wakisaka [et al.] // *Radiat Oncol.* — 2024. — Vol. 19 — № 1. — P. 51.

128. Protective effect of Vitamin C and E on enzymatic and antioxidant system in liver and kidney toxicity of Cadmium in rats / V. Poli, Y. Aparna, R. Madduru [et al.] // *Appl. Food Res.* — 2022. — Vol. 2. — P. 100098.

129. Protective role of hesperidin against  $\gamma$ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis / N. Z. Shaban, A. M. Ahmed Zahran, F. H. El-Rashidy [et al.] // *J Biol Res (Thessalon)*. — 2017. — Vol. 24. — P. 5.

130. Protective Role of *Juniperus phoenicea* L. Leaves Extract against Gamma-irradiation-induced Oxidative Stress / E. Dessoky, I. A. Ismail, E. I. El-Hallous [et al.] // *Pak J Biol Sci.* — 2020. — Vol. 23 — № 7. — P. 922–930.

131. Radiation and inflammation / D. Schaeue, E. D. Micewicz, J. A. Ratikan [et al.] // *Semin Radiat Oncol.* — 2015. — Vol. 25 — № 1. — P. 4–10.

132. Radiation induced liver disease: A clinical update / R. Benson, R. Madan, R. Kilambi, S. Chander // *J Egypt Natl Canc Inst.* — 2016. — Vol. 28 — № 1. — P. 7–11.

133. Radiation-Induced Cardiovascular Disease: Mechanisms and Importance of Linear Energy Transfer / C. B. Sylvester, J. I. Abe, Z. S. Patel [et al.] // *Front. Cardiovasc. Med.* — 2018. — Vol. 5. — P. 1–9.

134. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy / J. M. Straub, J. New, C. D. Hamilton [et al.] // *J Cancer Res Clin Oncol.* — 2015. — Vol. 141 — № 11. — P. 1985–1994.

135. Radiation-induced liver disease: beyond DNA damage / Y. J. Zhou, Y. Tang, S. J. Liu [et al.] // *Cell Cycle*. — 2023. — Vol. 22 — № 5. — P. 506–526.
136. Radiation-Induced Normal Tissue Damage: Oxidative Stress and Epigenetic Mechanisms / J. Wei, B. Wang, H. Wang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev*. — 2019. — Vol. 2019. — P. 3010342.
137. Radioprotective agents: strategies and translational advances / M. Z. Kamran, A. Ranjan, N. Kaur [et al.] // *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. — 2016. — Vol. 309 — № 2. — P. 1–13.
138. Radioprotective Role of Natural Polyphenols: From Sources to Mechanisms / M. Adnan, A. Rasul, M. A. Shah [et al.] // *Anticancer Agents Med Chem*. — 2022. — Vol. 22 — № 1. — P. 30–39.
139. Radioprotective Role of Vitamins C and E against the Gamma Ray-Induced Damage to the Chemical Structure of Bovine Serum Albumin / H. Zarei, M. Bahreinipour, Y. Sefidbakht [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. — 2021. — Vol. 10 — № 12. — P. 1875.
140. Radioprotectors.org: an open database of known and predicted radioprotectors / A. M. Aliper, M. E. Bozdaganyan, V. A. Sarkisova [et al.] // *Aging (Albany NY)*. — 2020. — Vol. 12 — № 15. — P. 15741–15755.
141. Real impact of liver cirrhosis on the development of hepatocellular carcinoma in various liver diseases—meta-analytic assessment / K. Tarao, A. Nozaki, T. Ikeda [et al.] // *Cancer Med*. — 2019. — Vol. 8 — № 3. — P. 1054–1065.
142. Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: Molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics / R. Yahyapour, E. Motevaseli, A. Rezaeyan [et al.] // *Clin. Transl. Oncol*. — 2018. — Vol. 20. — P. 975–988.
143. Regulation of radiation-induced liver damage by modulation of SIRT-1 activity: In vivo rat model / M. M. El-Sheikh, D. H. Abdel-Naby, R. M. El-Hazek [et al.] // *Cell Biochem Funct*. — 2023. — Vol. 41 — № 1. — P. 67–77.
144. Sage, E. Radiation-induced clustered DNA lesions: repair and mutagenesis / E. Sage, N. Shikazono // *Free Radic Biol Med*. — 2017. — Vol. 107. — P. 125–135.

145. Saito, Y. Role of cellular senescence in inflammation and regeneration / Y. Saito, S. Yamamoto, T. S. Chikenji // *Inflamm Regener.* — 2024. — Vol. 44. — P. 28.
146. Salminen, A. Photoaging: UV radiation-induced inflammation and immunosuppression accelerate the aging process in the skin / A. Salminen, K. Kaarniranta, A. Kauppinen // *Inflamm Res.* — 2022. — Vol. 71 — № 7–8. — P. 817–831.
147. Schuppan, D. Evolving therapies for liver fibrosis / D. Schuppan, Y. O. Kim // *J Clin Invest.* — 2013. — Vol. 123 — № 5. — P. 1887–1901.
148. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants / K. Jomova, S. Y. Alomar, S. H. Alwasel [et al.] // *Arch Toxicol.* — 2024. — Vol. 98 — № 5. — P. 1323–1367.
149. Singh, V. K. The efficacy and safety of amifostine for the acute radiation syndrome / V. K. Singh, T. M. Seed // *Expert Opin. Drug Saf.* — 2019. — Vol. 18. — P. 1077–1090.
150. Stähelin, H. Selective cytoprotection by amifostine in radiation therapy: mechanisms and clinical results / H. Stähelin // *Seminars in Radiation Oncology.* — 2002. — Vol. 12 — № 1. — P. 12–19.
151. Stimulation of hepatoma cell invasiveness and metastatic potential by proteins secreted from irradiated nonparenchymal cells / L. Y. Zhou, Z. M. Wang, Y. B. Gao [et al.] // *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* — 2012. — Vol. 84. — P. 822–828.
152. Stone, H. B. Amifostine: its clinical utility and radioprotective effects in oncology / H. B. Stone // *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics.* — 2003. — Vol. 57 — № 3. — P. 837–846.
153. Strategies for prediction and mitigation of radiation-induced liver toxicity / D. A. S. Toesca, B. Ibragimov, A. J. Koong [et al.] // *Journal of Radiation Research.* — 2018. — Vol. 59. — P. i40–i49.
154. Tacke, F. Update on hepatic stellate cells: Pathogenic role in liver fibrosis and novel isolation techniques / F. Tacke, R. Weiskirchen // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* — 2012. — Vol. 6 — № 1. — P. 67–80.

155. Targeting Oxidative Stress: The Potential of Vitamin C in Protecting against Liver Damage after Electron Beam Therapy / G. Demyashkin, M. Parshenkov, S. Koryakin, V. Yakimenko [et al.] // *Biomedicines*. — 2024. — Vol. 12 — № 10. — P. 2195.

156. TGF- $\beta$  in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis: Updated / B. Dewidar, J. Soukupova, I. Fabregat [et al.] // *Curr Pathobiol Rep*. — 2015. — Vol. 3. — P. 291–305.

157. The biological effects of radiation-induced liver damage and its natural protective medicine / T. Li, Y. Cao, B. Li [et al.] // *Prog Biophys Mol Biol*. — 2021. — Vol. 167. — P. 87–95.

158. The effects of vitamin C on respiratory, allergic and immunological diseases: an experimental and clinical-based review / M. H. E. Ghalibaf, F. Kianian, S. Beigoli [et al.] // *Inflammopharmacology*. — 2023. — Vol. 31 — № 2. — P. 653–672.

159. The mechanisms of radiation-induced bystander effect / M. Najafi, R. Fardid, G. Hadadi [et al.] // *J Biomed Phys Eng*. — 2014. — Vol. 4 — № 4. — P. 163–172.

160. The NF- $\kappa$ B Signaling Pathway: Players and Functions / G. Courtois, A. Pescatore, J. Gautheron [et al.] // *NF- $\kappa$ B-Related Genetic Diseases. SpringerBriefs in Biochemistry and Molecular Biology*. — Springer, Cham, 2016. — Доступно по ссылке: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25850-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25850-8_1)

161. The Prophylactic Effect of Vitamin C and Vitamin B12 against Ultraviolet-C-Induced Hepatotoxicity in Male Rats / A. A. Attia, H. A. Hamad, M. A. Fawzy [et al.] // *Molecules*. — 2023. — Vol. 28 — № 11. — P. 4302.

162. The role of ferroptosis in ionizing radiation-induced cell death and tumor suppression / G. Lei, Y. Zhang, P. Koppula [et al.] // *Cell Res*. — 2020. — Vol. 30 — № 2. — P. 146–162.

163. The Role of IGF/IGF-1R Signaling in Hepatocellular Carcinomas: Stemness-Related Properties and Drug Resistance / M. T. Ngo, H. Y. Jeng, Y. C. Kuo [et al.] // *Int J Mol Sci*. — 2021. — Vol. 22 — № 4. — P. 1931.

164. The role of radiation induced oxidative stress as a regulator of radio-adaptive responses / M. Sisakht, M. Darabian, A. Mahmoodzadeh [et al.] // *Int J Radiat Biol.* — 2020. — Vol. 96 — № 5. — P. 561–576.

165. The Role of Sirtuin 3 in Radiation-Induced Long-Term Persistent Liver Injury / F. V. LoBianco, K. J. Krager, G. S. Carter [et al.] // *Antioxidants (Basel).* — 2020. — Vol. 9 — № 5. — P. 409.

166. The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review / H. Yaribeygi, Y. Panahi, B. Javadi [et al.] // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* — 2018. — Vol. 17. — P. 207–215.

167. Tissue fibrosis induced by radiotherapy: current understanding of the molecular mechanisms, diagnosis and therapeutic advances / Z. Yu, C. Xu, B. Song [et al.] // *J Transl Med.* — 2023. — Vol. 21. — P. 708.

168. Transient Inhibition of mTORC1 Signaling Ameliorates Irradiation-Induced Liver Damage / W. Yang, L. Shao, S. Zhu [et al.] // *Front Physiol.* — 2019. — Vol. 10. — P. 228.

169. Tsuchida, T. Mechanisms of hepatic stellate cell activation / T. Tsuchida, S. L. Friedman // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* — 2017. — Vol. 14 — № 7. — P. 397–411.

170. Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent / J. Kaźmierczak-Barańska, K. Boguszevska, A. Adamus-Grabicka [et al.] // *Nutrients.* — 2020. — Vol. 12 — № 5. — P. 1501.

171. Ultra-high dose rate dosimetry: Challenges and opportunities for FLASH radiation therapy / F. Romano, C. Bailat, P. G. Jorge [et al.] // *Med Phys.* — 2022. — Vol. 49 — № 7. — P. 4912–4932.

172. Valgimigli, L. Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection / L. Valgimigli // *Biomolecules.* — 2023. — Vol. 13 — № 9. — P. 1291.

173. Veal, E. Role/s of ‘Antioxidant’ Enzymes in Ageing / E. Veal, T. Jackson, H. Latimer // *Subcell. Biochem.* — 2018. — Vol. 90. — P. 425–450.

174. Vitamin C Regulates the Profibrotic Activity of Fibroblasts in In Vitro Replica Settings of Myocardial Infarction / Y. Xu, H. Zheng, P. Nilcham [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2023. — Vol. 24 — № 9. — P. 8379.

175. Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability / A. C. Caritá, B. Fonseca-Santos, J. D. Shultz [et al.] // Nanomedicine. — 2020. — Vol. 24. — P. 102117.

176. Vitamins and Radioprotective Effect: A Review / I. Lledó, B. Ibáñez, A. Melero [et al.] // Antioxidants. — 2023. — Vol. 12 — № 3. — P. 611.

177. Volumetric modulated arc therapy: a review of current literature and clinical use in practice / M. Teoh, C. H. Clark, K. Wood [et al.] // Brit J Radiol. — 2011. — Vol. 84. — P. 967–996.

178. Xiaohua, Y. Feedback regulation of TGF- $\beta$  signaling / Y. Xiaohua, X. Xiong, Y.-G. Chen // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. — 2018. — Vol. 50 — № 1. — P. 37–50.

179. Yamamoto, T. Radioprotective Effect of Vitamin C as an Antioxidant [Internet] / T. Yamamoto, M. Kinoshita // InTech, 2017. — Доступно по ссылке: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.68988>