

После завершения курса терапии отбирали пробы крови для исследования на морфологические и биохимические показатели, включая определение альбумина и глобулинов в сыворотке, а также проводили УЗИ-диагностику брюшной полости и ПЦР.

**Результаты исследований.** Три кошки с поздно поставленным диагнозом (через 20-40 дней после появления первых симптомов) и на фоне осложнений инфекционного перитонита пали в начале терапии (после 2-5 инъекций препарата «Коронакэт»). При патологоанатомическом вскрытии у них обнаруживали асцит, перитонит и изменения различной степени в печени, сердце, почках, селезенке, почках и поджелудочной железе.

При своевременном обращении владельцев кошек в клинику и началом лечения улучшение состояния животных отмечалось уже после 2-3 инъекций испытуемого препарата. Кошки начинали больше двигаться, появлялся аппетит. В дальнейшем (через 10-15 инъекций) наблюдали постепенное угасание клинических признаков болезни. По результатам комплексных исследований было установлено, что после полного курса терапии шесть кошек оказались клинически здоровыми. При наблюдении за ними еще в течение 20-30 дней рецидива инфекционного перитонита кошек не выявлено.

Результаты биохимического и морфологического исследования крови показали, что у кошек больных вирусным перитонитом в процессе лечения происходит нормализация и улучшение абсолютного большинства биохимических показателей крови, в том числе и коэффициент отношения альбумин/глобулин (от  $0,41 \pm 0,08$  до  $0,80 \pm 0,14$ ). Из морфологических показателей следует отметить динамику лейкоцитов. Их содержание в начале лечения существенно превышало максимальное значение референтного интервала для данного вида животных, а к концу терапии существенно снизилось и составило  $11,02 \pm 1,97 \cdot 10^9/\text{л}$ .

В период проведения клинических испытаний побочных эффектов от применения кошкам препарата «Коронакэт», кроме поражения кожи, не выявлено. Кожные изменения характеризовались тем, что на месте инъекций у некоторых кошек отмечали гиперемию и alopecию, которые самостоятельно проходили в течение 2-3 недель.

Все кошки контрольной группы пали в течение месяца (10-30 дней). Вскрытие их не проводили.

**Заключение.** Ветеринарный препарат «Коронакэт» (производитель филиал «Промветсервис-Альба» (РБ) для ООО «ВЕТУЧАСТОК» (РФ) безопасен для кошек и при своевременно начатом лечении эффективен при вирусном перитоните, в связи с чем может быть рекомендован к применению в практике ветеринарной медицины.

**Литература.** 1. Барсебян, Л.С. *Инфекционный вирусный перитонит кошек (обзор литературы)* / Л.С. Барсебян, О.И. Сухарев, Е.В. Куликов // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии.* – 2015. – №1(25). – С. 16-23. 2. Пальцева, Е.Д. *Коронавирусы в популяции домашних кошек* / Е.Д. Пальцева, В.И. Плешакова // *Вестник Омского государственного аграрного университета.* – 2022. – № 1 (45). – С. 94-101. 3. *Патологоанатомическая характеристика вирусного перитонита кошек* / Е. В. Куликов [и др.] // *Российский журнал сельскохозяйственных и социально-экономических наук.* – 2017. – №4(64). – PP. 270-280. 4. *Современный взгляд на диагностику, лечение и профилактику инфекционного перитонита кошек* / Ю.О. Терехова [и др.] // *VetPharma.* – 2014. – №2(18). – С. 46-53. 5. *Соломахина, Л.А. Офтальмологические проявления вирусного перитонита кошек* / Л.А. Соломахина, О.О. Смирнова // *VetPharma.* – 2017. – №1. – С. 52-63. 6. *Efficacy and safety of the nucleoside analog GS-441524 for treatment of cats with naturally occurring feline infectious peritonitis* / N.C.Pedersen [et al.] // *J.Feline Med Surg.* – 2019. – №21(4). – PP. 271-281.

## ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ УРОВНЯ мРНК NOS2 И ГЕНОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ Notch НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОГО ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ

<sup>1</sup>ЛЕБЕДЕВА Е.И., <sup>1</sup>ЩАСТНЫЙ А.Т., <sup>2</sup>КРАСОЧКО П.А., <sup>3</sup>БАБЕНКО А.С.

<sup>1</sup>УО «Витебский ордена Дружбы народов государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

<sup>1</sup>УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

*Проведена оценка взаимосвязи между мРНК Nos2 и генами Notch1, Notch2 сигнального пути Notch на разных стадиях экспериментального фиброза печени крыс Wistar с использованием непараметрической ранговой корреляции Спирмена. На всех этапах эксперимента между генами Nos2*

и *Notch2*, установлены сильные, средние и умеренные прямые корреляционные связи ( $p < 0,05$ ). Это позволяет считать, что гены *Nos2* и *Notch2* связаны и вовлекаются в процессы фиброгенеза на всех его стадиях при использовании конкретной экспериментальной модели. Не доказано взаимодействие и/или взаимное влияние уровня мРНК генов *Nos2* и *Notch2* в ходе индуцированного фиброгенеза печени. Гены *Nos2* и *Notch1* вносят вклад в прогрессирование портального и мостовидного фиброза, а также трансформации фиброза печени в цирроз. Это может свидетельствовать о реализации патологического процесса по измененной схеме с вовлечением дополнительных сигнальных путей.

**Ключевые слова:** крысы, фиброгенез, гены *Notch1*, *Notch2*, *Nos2*, корреляционные связи.

## CHANGES IN RATIO OF NOS2 mRNA LEVEL AND Notch SIGNALING GENES AT DIFFERENT STAGES OF THIOACETAMIDE-INDUCED LIVER FIBROSIS

<sup>1</sup>LEBEDEVA E.I., <sup>1</sup>SHCHASTNY A.A., <sup>2</sup>KRASOCHKO P.A. <sup>3</sup>BABENKA A.S.

<sup>1</sup>Vitebsk Order of Friendship of Peoples State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

<sup>3</sup>Belarussian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

*We evaluated the relationship between the levels of *Nos2*, *Notch1*, and *Notch2* mRNA at different stages of experimental liver fibrosis in Wistar rats. At all control points, a correlation was found between the level of *Nos2* and *Notch2* mRNA. This suggests that the *Nos2* and *Notch2* genes are associated and involved in the processes of fibrogenesis at all its stages when using a specific experimental model. The interaction and / or mutual influence of the level of *Nos2* and *Notch2* mRNA during induced liver fibrogenesis has not been proven. The *Nos2* and *Notch1* genes contribute to the progression of portal and bridging fibrosis, as well as the transformation of liver fibrosis into cirrhosis. This may indicate the implementation of the pathological process according to an altered scheme with the involvement of additional signaling pathways.*

**Keywords:** rats, fibrogenesis, *Notch1*, *Notch2*, *Nos2* genes, correlation.

**Введение.** Согласно литературным данным в настоящее время не существует эффективного лечения фиброза печени. Понимание молекулярных механизмов, регулирующих фиброгенез, поиск вовлеченных в данный процесс генов и определение биомаркеров для ранней диагностики и лечения остаются приоритетными задачами гепатологии [5, 9].

Исследования последних лет выявили связь сигнального пути Notch с развитием ряда заболеваний у человека. Показано его участие в регуляции дифференцировки жиронакапливающих клеток в миофибробластический фенотип при фиброзе печени. Тем не менее, роль сигнального пути Notch при данной патологии до конца не исследована, а сведения об уровнях экспрессии генов пути противоречивы. Отмечено, что сигнальный путь Notch связан с другими сигнальными путями такими как Wnt/ $\beta$ -catenin, Hippo, Hedgehog и TGF $\beta$  [6, 10]. Однако, взаимодействие генов сигнального пути Notch с другими генами, в частности *Nos2* немногочисленны.

Моноксид азота (NO) продуцируемый NOS2 (индуцибельная изоформа NO-синтаз) вовлечен в патогенез многих заболеваний печени включая фиброз [8]. Индукция экспрессии *Nos2*, активация фермента и последующая продукция NO представляют собой весьма сложный многостадийный процесс, который подвергается регуляции на всех уровнях. Стимулы, осуществляющие регуляцию в настоящее время до конца не изучены [4, 7].

**Цель** исследования заключалась в оценке взаимосвязи между мРНК *Nos2* и генами *Notch1*, *Notch2* сигнального пути Notch на разных стадиях экспериментального фиброза печени крыс Wistar.

**Материалы и методы исследований.** В эксперименте использовали крыс-самцов Wistar. Животных рандомизировали на 9 групп по 12 особей в каждой. Фиброгенез печени индуцировали раствором тиацетамида. Крыс выводили из эксперимента через 3 нед (точка m1), 5 нед (точка m2), 7 нед (точка m3), 9 нед (точка m4), 11 нед (точка m5), 13 нед (точка m6), 15 нед (точка m7) и 17 нед (точка m8), а интактных (точка m0) – по окончании опыта. Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019) и подробно описан в статье [2, 3].

Забор материала, пробоподготовка, протокол выделения суммарной РНК из исследуемых образцов печени, синтез кДНК на матрице суммарной РНК, последовательности специфических олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, проведение полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), нормализация данных ПЦР-РВ, оценка уровня мРНК представлены в статьях [1, 3].

Морфологическое исследование образцов печени проводили на гистологических срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, методом Маллори. Степень фиброза определяли с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G. [2].

Результаты количественных измерений оценивали с использованием программ Statistica 10.0 («StatSoft Inc.» США), IBM SPSS Statistics 23.0, Microsoft Office Excel («Microsoft Corp.», США). Выявление корреляционных взаимосвязей проводили с использованием непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Коэффициенты корреляции значимые на уровне  $p < 0,05$ .

**Результаты исследований.** Уровень экспрессии мРНК генов *Nos2*, *Notch1*, *Notch2* изучали в пуле вариантов, т.е. суммарную мРНК каждого из генов-мишеней без разделения на альтернативные варианты сплайсинга. Между генами мы учитывали только сильную, среднюю и умеренную связи. Согласно литературным данным, эндотелиоциты синусоидных капилляров и холангиоциты интактной печени экспрессируют высокие уровни мРНК генов *Notch1*, *Notch2* [6, 10]. При этом экспрессия *Nos2* в большинстве клеток печени отсутствует и индуцируется бактериальными липополисахаридами и воспалительными цитокинами. *Nos2* преимущественно экспрессируется в печеночных клетках и звездчатых макрофагах (клетки Купфера). В здоровой печени для поддержания гомеостаза небольшое количество NO синтезируется NOS3 (эндотелиальная изоформа NO-синтаз) [7, 8].

В условиях физиологической нормы между генами *Nos2* и *Notch2* установили умеренную прямую корреляционную связь ( $r=0,40$ ,  $p < 0,05$ ). При этом между генами *Nos2* и *Notch1* связь не выявлена. На всех этапах эксперимента между генами *Nos2* и *Notch2*, установлены сильные, средние и умеренные прямые корреляционные связи (таблица 1).

**Таблица 1 - Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена между уровнями экспрессии мРНК генов *Nos2* и *Notch2* в условиях моделирования фиброза и цирроза печени крыс Wistar**

Признак	Коэффициенты корреляции значимые на уровне $p < 0,05$							
	Наименование группы/нед эксперимента							
	m1/3	m2/5	m3/7	m4/9	m5/11	m6/13	m7/15	m8/17
	<i>Nos2</i>							
<i>Notch2</i>	0,47	0,82	0,62	0,52	0,79	0,77	0,81	0,60

На основании полученных результатов, а также данных литературы в ходе развития фиброза печени – либо собственно соответствующие белки, либо мРНК генов *Nos2*, *Notch1* и *Notch2* (возможно даже независимо от белковых продуктов) вовлекаются в инициацию и развитие патологического процесса. Об этом может косвенно свидетельствовать изменение количества и фенотипического профиля экспрессирующих данные маркеры клеток. Так в ходе нарастания фибротических изменений увеличивается количество холангиоцитов (протоковая реакция) и уменьшается количество синусоидов и как следствие эндотелиоцитов синусоидных капилляров [2]. При этом наблюдается рост числа клеток звездчатых макрофагов [7]. Общий уровень мРНК гена *Nos2* увеличивается непропорционально росту числа клеток Купфера. Наряду с этим уровень мРНК гена *Notch2* практически также реагирует на увеличение числа холангиоцитов и уменьшение числа эндотелиоцитов синусоидов, что, по-видимому, и приводит к обнаружению средней и сильной корреляции, отмеченной в таблице 1. Пока что у нас нет оснований связывать эти маркеры на уровне мРНК. Мы не можем объяснить взаимное влияние или конкретную роль динамики уровня мРНК генов *Nos2* и *Notch2* в процессах инициации и развития фиброза печени. Следует отметить, что сильные связи выявлены на стадиях мостовидного фиброза (нед, точка m1, F1) и на фоне нодулярной перестройки печени крыс (11-15 нед, точки m5- m7) – в это время протекает процесс смены фенотипа макрофагов.

Интересно, что между уровнем мРНК генов *Nos2* и *Notch1* корреляционные связи выявлены только в двух временных точках. На стадии портального и мостовидного фиброза F3/F4 (7 нед, точка m3) установлена умеренная прямая корреляционная связь ( $r=0,44$ ,  $p < 0,05$ ). В начале процесса трансформации фиброза в цирроз (9 нед эксперимента, точка m4, степень фиброза F4/F5) отметили среднюю прямую корреляционную связь ( $r=0,56$ ,  $p < 0,05$ ). Как мы уже отмечали ранее, в ходе трансформации интактной ткани число эндотелиоцитов синусоидов, экспрессирующих *Notch1* и *Notch2* уменьшается, а число холангиоцитов растет. Это компенсирует падение уровня мРНК *Notch2*, но не влияет на падение уровня мРНК *Notch1*. По-видимому, холангиоциты в отличие от синусоидов не экспрессируют *Notch1* или уровень этого маркера в холангиоцитах значительно ниже.

Отсутствие корреляции между уровнем мРНК генов *Nos2* и *Notch1* в других временных точках может свидетельствовать о том, что они задействованы в других процессах к настоящему времени до конца не изученных. На исчезновение и восстановление связей оказывают влияние смена сигналов от

микроокружения и ряд других факторов. Вероятно, связь между генами *Nos2* и *Notch1* также вносит вклад в прогрессирование фиброза.

**Закключение.** Полученные результаты позволяют считать, что гены *Nos2* и *Notch2* связаны и вовлекаются в процессы фиброгенеза на всех его стадиях при использовании конкретной экспериментальной модели. Не доказано взаимодействие и/или взаимное влияние уровня мРНК генов *Nos2* и *Notch2* в ходе индуцированного фиброгенеза печени. Гены *Nos2* и *Notch1* вносят вклад в прогрессирование портального и мостовидного фиброза, а также трансформации фиброза печени в цирроз. Это может свидетельствовать о реализации патологического процесса по измененной схеме с вовлечением дополнительных сигнальных путей.

#### **Литература.**

1. Лебедева, Е. И. Изменения уровня экспрессии мРНК гена *nos2* в печени крыс при индуцированном фиброгенезе / Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный // Сборник научных трудов 2-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине»: Под редакцией: А. В. Силина, Л. В. Гайковой. ФГБОУ ВО СЗ им. Мечникова Минздрава России, 2-3 декабря 2021 г. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. Мечникова, 2021. – С. 143–151.
2. Лебедева, Е. И. Морфометрические показатели синусоидных капилляров, междольковых вен и междольковых артерий на разных стадиях экспериментального фиброза печени / Е. И. Лебедева // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2022. – Том 11, № 3. – С. 32-38.
3. Щастный, А. Т. Роль уровня мРНК генов сигнального пути *Notch* при индуцированном фиброгенезе печени крысы / А. Т. Щастный, Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко // Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №2. – С. 25-37.
4. Ahmad N. Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects / N. Ahmad, M.Y. Ansari, T.M. Haqqi // J. Cell. Physiol. – 2020. – Vol. 235, № 10. – P. 6366-6376.
5. Ai L. Key genes in the liver fibrosis process are mined based on single-cell transcriptomics / L. Ai, Q. Wang, K. Cheng // Biochem Biophys Res Commun. – 2022. – Vol. 598. – P. 131-137.
6. Disruption of myofibroblastic *Notch* signaling attenuates liver fibrosis by modulating fibrosis progression and regression / Z. Yue [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2021. – Vol. 17, N 9. – P. 2135-2146.
7. Kashfi K. Macrophage Reprogramming and Cancer Therapeutics: Role of iNOS-Derived NO / K. Kashfi, J. Kannikal, N Nath // Cells. – 2021. – Vol. 10, № 11. – P. 3194.
8. Kashfi K. Nitric oxide in cancer and beyond / K. Kashfi // Biochem. Pharmacol. – 2020. – Vol. 176. – P. 114006.
9. Kisseleva, T. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression / T. Kisseleva, D. Brenner // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. – 2021. – Vol. 18, N 3. – P. 151-166.
10. Novel Insights on *Notch* signaling pathways in liver fibrosis / M. M. Ni [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2018. – Vol. 826. – P. 66-74.

## **САРКОЦИСТОЗ ДИКИХ ВОДОПЛАВАЮЩИХ ПТИЦ И ЕГО РЕГИСТРАЦИЯ НА ВОДОЕМАХ МИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

**ЛЯХ Ю.Г., БИЛЕЦКИЙ О.Р., МИРУКТАМОВ Ж.Х.**

УО «Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Поскольку дикие водоплавающие птицы для обитания используют как водную среду, так и прибрежные территории, включая сельскохозяйственные угодья, то в таком случае, места локализации паразитов имеет достаточно широкое распространение в территориальном масштабе. Особенно это касается распространения саркоцистоза среди диких видов уток, которые, ввиду своих биологических особенностей имеют кормовые станции как на водоемах, так и в их прибрежных территориях. Эти территории являются местами обитания их дефинитивных хозяев – плотоядных как диких, так и домашних.

Исследования по установлению степени распространения саркоцистоза среди диких водоплавающих птиц являются актуальными и позволят разработать мероприятия по снижению его проявления и регистрации.

**Ключевые слова:** инвазионная патология, саркоцистоз, водоплавающие птицы, диагностика паразитозов, сезонная охота.